

Aus der Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Eine Punktmutation in der 5'-flankierenden Region reduziert die
Transkription des Surfactant Protein B (SP-B) Gens in H441-
Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Meyn

aus Hamburg

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Krüll
 2. Prof. Dr. med. St. Hippenstiel
 3. Prof. Dr. med. Günther

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnisse	5
1.1	Abbildungsverzeichnis	5
1.2	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	8
2.1	Surfactant: Aufbau und Synthese	8
2.2	Funktionen des Surfactants	8
2.3	SP-B und seine Bedeutung für die Lungenfunktion	10
2.4	5'-flankierende Region des SP-B Gens	11
3	Fragestellung	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Material	14
4.1.1	Geräte	14
4.1.2	Chemikalien	15
4.1.3	Nukleotide, DNA-Größenstandards	15
4.1.4	Enzyme	15
4.1.5	Oligonukleotide	15
4.1.6	Plasmide	15
4.1.7	Fertigsysteme	16
4.1.8	Gele	16
4.1.9	Puffer und Lösungen	16
4.1.10	Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	17
4.1.11	Nährmedien und Lösungen für Zellkulturen	18
4.1.12	Bakterienstämme	18
4.1.13	Zelllinien	18
4.1.14	Verwendete Internet-Adressen	18
4.2	Methoden	19
4.2.1	Patientengut	19
4.2.2	Isolierung der genomischen DNA	19
4.2.3	Agarosegelelektrophorese	19
4.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
4.2.5	Reinigung der PCR-Produkte	21
4.2.6	Restriktionsanalyse	21
4.2.7	Acrylamidgelelektrophorese	23
4.2.8	Sequenzierung	23
4.2.9	Converted PCR	23
4.2.10	Zellbiologische Methoden	24
4.2.11	Nukleäre Extrakte	25
4.2.12	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	26
4.2.13	Klonierung	27
4.2.14	Transfektion und Reporterassay	30
4.2.15	Statistische Methoden	31
5	Ergebnisse	32
5.1	Isolierung der DNA, PCR, Restriktionsverdau	32
5.2	Sequenzierung	34
5.3	Converted PCR	34
5.4	EMSA	36
5.5	Transfektionsassay	37

6	<i>Diskussion</i>	39
6.1	Polymorphismus?	39
6.2	Funktionelle Bedeutung der Mutation	39
6.3	Klinische Bedeutung der Punktmutation	41
7	<i>Zusammenfassung</i>	44
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	45
9	<i>Anhang</i>	49
9.1	Erklärung	49
9.2	Lebenslauf	50

1 Verzeichnisse

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens

Abb. 2: Repräsentatives Agarosegel einer DNA-Isolierung

Abb. 3: Repräsentatives Agarosegel für die PCR mit den Primern 1 und 2

Abb. 4: Sequenzierung der Proben 15 und 43

Abb. 5: Converted PCR zum schnellen Screenen bzgl. der Mutation

Abb. 6: Repräsentatives Gel von insgesamt drei EMSA-Versuchen

Abb. 7: Transfektionsassay in H441 Zellen

1.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BSA	bovine serum albumine = Rinderserumalbumin
bzgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	Carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
et al.	und andere (et aliter)
G	Guanin
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansäure]
HNF-3	hepatic nuclear factor-3
inkl.	inklusive
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
min	Minuten
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

N-terminal	Aminoterminal
O ₂	Sauerstoff
p _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Stromgebiet
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
RA	retinoic acid = Retinsäure
RAR	retinoic acid receptor = Retinsäurerezeptor
RARE	retinoic acid response element
RDS	Respiratory distress syndrome
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sec	Sekunden
SP-B	Surfactant Protein B
Tab.	Tabelle
TAFII135	transcription factor II 135
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFIIH	transcription factor II H
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTF-1	thyroid transcription factor-1
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

2 Einleitung

2.1 Surfactant: Aufbau und Synthese

Surfactant steht für „**surface active agent**“. Es handelt sich dabei um eine oberflächenaktive Substanz, die von den alveolären Typ-II-Zellen und den Clara-Zellen des Bronchiolarepithels gebildet wird. Zu etwa 90% besteht Surfactant aus Lipiden und zu etwa 10% aus Proteinen. Die Proteine setzen sich aus den bisher vier identifizierten Surfactantproteinen A, B, C und D (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) zusammen.

Die gesamte alveoläre Oberfläche der reifen menschlichen Lunge wird von einer dünnen Flüssigkeitsschicht bedeckt, auf der sich der Surfactant als einschichtige Lipid-Protein-Schicht in Form eines Monolayers befindet. Die Halbwertszeit des Surfactants beträgt etwa 14-24 Stunden. Nach Synthese in den Typ-II-Zellen werden die Phospholipide und Proteine in lamellären Körpern gespeichert und von hieraus in den Alveolarraum sezerniert. Dort findet eine Umwandlung in das tubuläre Myelin statt. Es handelt sich dabei um eine hochorganisierte, gitterähnliche Struktur, die durch ein System dichtgepackter, rechtwinkliger Tubuli gekennzeichnet ist. Sie ist die unmittelbare Vorstufe der funktionellen Surfactantschicht. Der Abbau erfolgt durch Makrophagen und die Typ-II-Zellen, wobei ein Recycling einzelner Surfactantkomponenten stattfindet.

2.2 Funktionen des Surfactants

Die Hauptfunktion des Surfactants ist die Herabsetzung der Oberflächenspannung der Alveolen, die ohne Surfactant bei niedrigen Lungenvolumina kollabieren würden (erstmalig 1957 von Clements beschrieben [1]). Surfactant verhindert somit endexpiratorisch den alveolären Kollaps und erleichtert inspiratorisch die Lungenexpansion. Die Oberflächenspannung kommt dadurch zustande, daß intermolekulare Anziehungskräfte versuchen, die Oberfläche der Alveole zu verkleinern (Retraktion des Lungengewebes). Diese Kräfte sind nach dem *LaPlace-Gesetz*¹ um so größer, je kleiner der Durchmesser der Alveole ist. Dadurch müssten kleinere Alveolen zugunsten größerer zusammenfallen. Der Oberflächenspannung wirkt der Surfactant

¹ LaPlace-Gesetz: $P=2 \times T/r$, P=Innendruck, T=Oberflächenspannung, r=Radius

jedoch durch eine Reduktion nahe Null entgegen. In den kleineren Alveolen wird dies dadurch erreicht, daß die Phospholipide dichter gepackt sind als in den größeren.

Eine weitere wichtige Funktion des Surfactants ist die lokale Immunabwehr der Lunge. Allein die Tatsache, daß der Surfactant die gesamte alveoläre Oberfläche bedeckt, läßt vermuten, daß eine derartige Funktion vorliegt. Denn in dieser Position stellt die Lipid-Protein-Schicht die erste Kontaktfläche der Lunge mit eingeatmeten Erregern dar. Zwar sind bzgl. der immunologischen Funktion noch viele Fragen offen, aber bereits 1973 konnten in vitro Versuche zeigen, daß für das intrazelluläre Abtöten von Bakterien durch Makrophagen das sog. „alveolar lining material“ eine wichtige Rolle spielt [2]. Später wurde gezeigt, daß u. a. der im „alveolar lining material“ vorhandene Surfactant dafür verantwortlich ist [3, 4].

Eindrücklich zeigt sich die Bedeutung des Surfactants für die Lungenfunktion anhand des Respiratory Distress Syndrome (RDS). Es handelt sich um die häufigste Todesursache in der Neonatalperiode, die ursächlich durch einen Surfactantmangel bedingt ist. Da die Bildung des Surfactants intrauterin erst ab der 23. Entwicklungswoche beginnt und dessen Konzentration erst ab der 32. Woche ausreichend hoch ist, steigt mit abnehmendem Gestationsalter die Inzidenz des RDS. Bei einem Surfactantmangel entwickeln sich in den Lungen der Frühgeborenen unmittelbar nach der Geburt zunehmende diffuse Atelektasen. Die alveoläre Minderbelüftung führt zu einer Hypoxie und zu einem Anstieg des CO₂-Partialdrucks. Die Folgen sind eine systemische Hypotension und Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße, die eine pulmonale Minderperfusion sowie die Ausbildung intrapulmonaler Shunts und eines Rechts-Links-Shunts auf Vorhofebene (Foramen ovale) bzw. über den Ductus arteriosus nach sich ziehen. Dadurch wird der pulmonale Metabolismus erheblich eingeschränkt. Azidose, Hypoxie und der veränderte Lungenstoffwechsel inhibieren wiederum die postnatal einsetzende de novo Synthese von Surfactant.

Ein weiteres Beispiel ist das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Ursächlich liegt zwar kein Surfactantmangel vor, im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zur Ausbildung eines proteinreichen Ödems, das bei Beteiligung des alveolären

Kompartimentes zu einer schweren Störung der Surfactantfunktion führt. Diese führt wiederum zu einer Abnahme der Compliance und zur Ausbildung von Atelektasen, die für die weitere Pathogenese von Bedeutung sind.

2.3 SP-B und seine Bedeutung für die Lungenfunktion

SP-B wird durch ein aus 10 Introns und 11 Exons bestehendes Gen auf Chromosom 2 codiert, wobei Exon 6 und 7 das reife Protein codieren, das aus 78 Aminosäuren besteht und hydrophob ist. Das primäre Translationsprodukt hat ein Molekulargewicht von 42.000 Dalton und wird durch posttranslationale Modifikationen am carboxy- und aminoterminalen Ende auf ein Gewicht von 8000 Dalton reduziert.

Trotz seines im Vergleich zu den Lipiden geringeren Anteils spielt SP-B für die Surfactantfunktion eine entscheidende Rolle. So ist SP-B an der Formation der lamellären Körper und des tubulären Myelins beteiligt und damit wichtig für die Bildung des Surfactants. Zudem fördert und beschleunigt SP-B die Adsorption, Ausbreitung, Vermischung und Stabilisierung von Phospholipiden, was im Rahmen des Atemzyklus unter wechselnden Anforderungen äußerst wichtig ist.

Die Bedeutung von SP-B für die Lungenfunktion lässt sich anhand von in vivo Untersuchungen an Tiermodellen demonstrieren. So weisen mit monoklonalen Antikörpern gegen SP-B behandelte neugeborene Kaninchen, eine deutlich reduzierte Lungencompliance auf, einhergehend mit Entzündungen, Läsionen und reduzierten Tidalvolumina [5, 6]. Besonders eindrücklich sind Untersuchungen an homozygoten SP-B knock-out Mäusen, die unmittelbar nach der Geburt sterben [7]. Aber auch heterozygote SP-B knock-out Mäuse mit einer 50%igen Reduktion des SP-B Gehaltes weisen Veränderungen der Lungenfunktion auf. So sind eine erniedrigte Lungencompliance, ein mildes Airtrapping und eine Prädisposition gegenüber einem hyperoxischen Lungenschaden festzustellen [7, 8, 9].

Vielleicht noch deutlicher wird die Bedeutung von SP-B bei Betrachtung der hereditären SP-B Defizienz. Es handelt sich um eine Erkrankung, die ohne Lungentransplantation innerhalb des ersten Lebensjahres aufgrund eines Lungenversagens des

Termingeborenen zum Tode führt [10]. In etwa 60% der Fälle liegt ursächlich eine homozygote Insertion von 2 Basen in Exon 4 (121ins2 Mutation) zugrunde, die einen Rasterschub auslöst [11,12]. Dieser führt zu einer vorzeitigen Termination der Translation, so daß kein funktionsfähiges SP-B gebildet werden kann.

Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit von SP-B stellt die Behandlung des unter 2.2 beschriebenen RDS durch Surfactantpräparate dar. Die Behandlung des RDS mit Surfactant ohne Zusatz von SP-B weist einen signifikant schlechteren Therapieerfolg auf als die Behandlung mit Surfactant, das SP-B enthält [13]. Passend dazu konnte in Tierstudien gezeigt werden, daß Surfactantpräparate, die SP-B und SP-C enthalten, eine signifikant schnellere und größere Verbesserung der Lungenfunktion bedingen als Präparate, die keines dieser Proteine enthalten [14, 15]. Ähnliches konnten Eijking et al. zeigen [16]. Sie behandelten Surfactant-defiziente Ratten einerseits mit Surfactantpräparaten, die Antikörper gegen SP-B und SP-C enthielten und andererseits mit Präparaten ohne Antikörper. Im ersten Fall konnte im Gegensatz zum zweiten Fall keine normale Lungenfunktion hergestellt werden.

2.4 5'-flankierende Region des SP-B Gens

Die Transkription des SP-Gens wird durch die 5'-flankierende Region gesteuert und reguliert. Eine Reihe von regulatorischen Elementen in der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens sind bereits identifiziert worden (s. Abb. 1). Eine Region umfasst die Basenpaare von Nukleotid -107 bis -79 und gehört zum Promotor. Sie enthält zwei Bindungselemente (cis-aktive Elemente, Bindungscluster) für den Transkriptionsfaktor TTF-1 (Thyroid transcription factor-1) und ein Bindungselement für den Transkriptionsfaktor HNF-3 (Hepatic nuclear factor-3) [17]. Eine weitere Region ist der stromaufwärts gelegene Enhancerbereich, der zwischen Nukleotid -458 und -380 lokalisiert ist. Hier befinden sich drei cisaktive Elemente für TTF-1 und drei für den Transkriptionsfaktor RAR (Retinsäurerezeptor), die als RARE (retinoic acid receptor element) bezeichnet werden.

Für die Transkription des SP-B Gens ist die Enhancerregion mit ihren RAREs und TTF-1 Bindungselementen funktionell äußerst wichtig. Das zeigen Transfektionsanalysen, bei denen Mutationen der cisaktiven Elemente von TTF-1 zu einem signifikanten

Rückgang der Expressionsrate von SP-B führen [18]. Ein weiterer Hinweis sind in vitro Untersuchungen der SP-B Expression bei mutierten RAREs, die zu einer vollständigen Aufhebung oder zu einer deutlichen Reduktion eines stimulatorischen Effektes von Retinsäure (RA) auf die SP-B Expression führen [19]. In Übereinstimmung mit diesen beiden Untersuchungen ist auch die Arbeit von Yang et al. an transgenen Mauslinien mit fehlender Enhancerregion des SP-B Gens zu sehen, die eine starke Reduktion der SP-B Expression in den Typ-II-Zellen und einen vollständigen Verlust in den Bronchiolarzellen aufweisen [20].

Bei der Regulation der Genexpression wird einerseits einer Interaktion der RAREs und der TTF-1 Bindungselemente, andererseits einer Interaktion von Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle zugeschrieben. So konnten Naltner et al. zum einen zeigen, daß eine in vitro Mutation der TTF-1 Bindungselemente zu einer starken Reduktion oder vollständigen Aufhebung der Stimulation der SP-B Expression durch RA führt. Zum anderen fanden sie Hinweise, daß es unter Bildung eines Komplexes bestehend aus TTF-1, RAR und Coaktivatoren (SRC-1, TIF2, ACTR, CBP, p160) zu einer maximalen Stimulation der SP-B Expression durch RA über alle RAREs und TTF-1 Elemente kommt [19]. Passend dazu gelang Yan et al. ein direkter Nachweis einer Protein-Protein Interaktion von TTF-1 und RAR [21]. Die Regulation der Transkription ist wichtig für eine korrekte räumliche und zeitliche Expression des SP-B Gens und damit für die zellspezifische Genexpression.

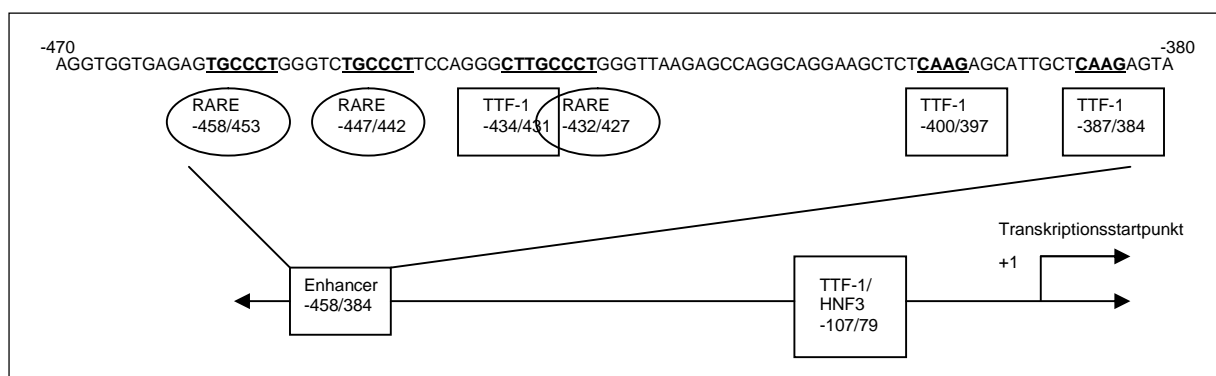


Abb. 1: Schema der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens
Die Zahlen geben die Position der Consensussequenz des jeweiligen Transkriptionsfaktors an

3 Fragestellung

Es ist bekannt, daß der Gehalt von SP-B mRNA in humanen Lungen individuell sehr unterschiedlich ist [22]. Dies könnte genetisch bedingt sein. Zahlreiche Polymorphismen des SP-B Gens sind bisher beschrieben worden. Diese sind einerseits über einen vorzeitigen Translationsabbruch oder eine veränderte Aminosäurezusammensetzung mit einer veränderten Funktion von SP-B assoziiert. Andererseits führen sie über eine reduzierte mRNA Stabilität zu einer Reduktion des mRNA Gehaltes von SP-B [23]. Neben der mRNA-Stabilität könnte eine individuell unterschiedliche Transkription des SP-B Gens für den individuell unterschiedlichen mRNA Gehalt verantwortlich sein. Polymorphismen in der 5'-flankierenden Region sind eine mögliche Ursache für eine individuell unterschiedliche Transkription des SP-B Gens. Denn wie unter 2.4 beschrieben, können Veränderungen der cisaktiven Elemente in der 5'-flankierenden Region zumindest in vitro zu einer signifikanten Reduktion der Expression des SP-B Gens führen. Untersuchungen zu funktionellen Bedeutungen von in vivo Mutationen der 5'-flankierenden Region existieren bislang noch keine.

Das Ziel der vorgesehenen Untersuchungen war es daher, in einem ersten Schritt genetische Polymorphismen in der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens zu identifizieren und in einem zweiten Schritt deren funktionelle Bedeutung für die Transkription zu untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

CO ₂ -Brutschrank „Function line“	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	BioRad, München
„Sub-cell GT“	
„Mini-sub cell GT“	
„Proteau II xi cell“	
Heizblock „Thermostat 5320“	Eppendorf, Hamburg
LICOR-Laserscanner „Odyssey“	LICOR Biosciences, USA
Luminometer	Berthold, Bad Wildbad
PCR-Maschinen	BioRad, München
„Thermocycler“	
„TGradient“	
Photometer „Uvikon XL“	BIO-Tek, Bad Friedrichshall
Schüttelinkubator	Edmund Bühler, Tübingen
UV-Lampe „Gene Genius“	Syngene, USA
Waagen	
„Sartorius 2254“	Sartorius, Göttingen
„Mettler PM 2000“	Mettler, Göttingen
Wasserentionisierungsanlage	Millipore, Eschborn
„Milli Q UF Plus“	
Wasserbad „Shake Temp SW 23“	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
„Biofuge fresco“	
„Megafuge 1.0 R“	

4.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Gaithersburg, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

4.1.3 Nukleotide, DNA-Größenstandards

Alle verwendeten Leitern wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder BioLabs (USA) bezogen, die Desoxyribonukleotide (dNTPs) von Promega (Mannheim, Deutschland).

4.1.4 Enzyme

Proteinase K, QIAGEN (Hilden, Deutschland)

Restriktionsendonukleasen:

Alu I, Ban II, Bgl II, Fok I, Hae III, Hha I, Hinf I, Hpa II, Nci I, Nhe I, Pst I,
Sfi I, Taq I, Promega (Mannheim, Deutschland)
Xba I, Biolabs (USA)

Taq-Polymerasen:

AmpliTaq, Perkin Elmer (USA)
RedTaq, Sigma (Karlsruhe, Deutschland)

T4 DNA Ligase, BioLabs (USA)

4.1.5 Oligonukleotide

Die gelabelten Oligonukleotide für die EMSA-Versuche wurden bei der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland), alle anderen verwendeten Oligonukleotide bei der Firma Roth (Karlsruhe) bestellt.

4.1.6 Plasmide

CMV- β -gal-Plasmid, BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Deutschland)
pGL3-Promotor Vector, Promega (Mannheim, Deutschland)

4.1.7 Fertigsysteme

BioRad Assay System, BioRad (München, Deutschland)

Bright-Glo Luciferase Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)

EndoFree Plasmid Kit QIAGEN (Hilden, Deutschland)

PolyFect Transfection Reagent QIAGEN (Hilden, Deutschland)

QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN (Hilden, Deutschland)

QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN (Hilden, Deutschland)

4.1.8 Gele

Acrylamidgel 5-10% (nicht denaturierend)

5-10 ml 40% (38:2) Acrylamid, 4 ml 10x TBE, 26-31 ml H₂O,

400 µl APS 10%, 40 µl Temed

Agarosegel 1,2%-3%

1,2g-3 g Agarose, ad 100 ml H₂O

4.1.9 Puffer und Lösungen

1x EMSA-Puffer

20 mM HEPES (pH 7,9), 70 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA,

12% Glycerol, 1 µg poly (dl-dC)

Hypotoner Puffer

10 mM HEPES (pH 7,9 bei 4°), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT,

0,2 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 25 µg/ml Leupeptin

PCR-Puffer (magnesiumfrei), Perkin-Elmer (USA)

Puffer 1 (low salt buffer)

20 mM HEPES (pH 7,9 bei 4°C), 1,5 mM MgCl₂, 0,02 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,2

mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 25 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol

Puffer 2 (high salt buffer)

20 mM HEPES (pH 7,9 bei 4°C), 1,5 mM MgCl₂, 1 M KCl, 0,5 mM DTT,

0,2 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 25 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM EDTA,

25 % Glycerol

1x T4 DNA Ligase Puffer:

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA

50x TAE Puffer Stammlösung

242 g Tris Base, 57,1 ml Eisessig, 37,2 g Na₂EDTA, H₂O bis 1000 ml

10x TBE Puffer Stammlösung

108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0,
H₂O bis 1000 ml

10x TGE Puffer

0,25 M Tris Base, 1,9 M Glycin, 10 mM EDTA, H₂O bis 1000 ml

4.1.10 Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen

Ampicillin-Stammlösung

50 mg/ml in H₂O

1x LB-Agar

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 20 g Agar, pH 7,0 mit 5 N NaOH, H₂O
bis Endvolumen 1000 ml, autoklavieren

1x LB-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0 mit 5 N NaOH,
H₂O bis Endvolumen 1000 ml, autoklavieren

1x LB-Selektionsagar

LB-Agar + Ampicillin 50 mg filtersterilisiert

GTE-Lösung

50 mM Glucose, 25 mM Tris Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA

Kaliumacetatlösung

29,5 ml Eisessig, KOH bis pH 4,8, H₂O bis 100 ml Gesamtmenge

NaOH/SDS-Lösung

0,2 M NaOH, 1%SDS

SOC-Medium

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, autoklavieren, vor Gebrauch

Zugabe von 10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄, 1 ml 2 M Glucoselösung

4.1.11 Nährmedien und Lösungen für Zellkulturen

All-trans Retinsäure

Amphotericin 0,1 mg/ml

DMSO, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fetales Kälberserum, PAA (Pasching, Österreich)

L-Glutamin, PAA (Pasching, Österreich)

PBS, Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Penicillin 100 U/ml, Sigma (Karlsruhe, Deutschland)

RPMI 1640, Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Trypsin, PAA (Pasching, Österreich)

4.1.12 Bakterienstämme

XL-1 blue competent cells (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

4.1.13 Zelllinien

NCI H441, American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)

4.1.14 Verwendete Internet-Adressen

<http://www.firstmarket.com/cgi-bin/cutter>

<http://searchlauncher.bcm.mc.edu/multi-align/multi-align.html>

4.2 Methoden

4.2.1 Patientengut

Zur Gewinnung von DNA wurde 53 Patienten des Klinikums Marburg 10 ml venöses Blut abgenommen, das durch Zusatz von Citrat ungerinnbar gemacht wurde. Durch Lagerung bei -20°C waren die Proben längere Zeit verfügbar. Jeder Probe wurde zur Anonymisierung eine spezifische Nummer zugeordnet. Die Patienten befanden sich auf verschiedenen Stationen aufgrund unterschiedlicher medizinischer Indikationen und wurden zufällig ausgewählt. Die zur Aufnahme führenden Erkrankungen waren zu 80% pulmonaler Ursache, wobei 28% eine COPD, 13% ein Bronchialkarzinom und 10% eine Pneumonie darstellten. Die restlichen pulmonalen Erkrankungen setzten sich aus interstitiellen Lungenerkrankungen, Asthma bronchiale, pleuralen Erkrankungen und Schlafapnoe zusammen. 20% der Patienten waren aus nicht pulmonalen Gründen im Krankenhaus. Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission des Klinikums Marburg erfolgte die Blutabnahme nach schriftlicher Aufklärung über Art und Umfang des Projektes mit durch Unterschrift dokumentiertem Einverständnis der Patienten.

4.2.2 Isolierung der genomischen DNA

Die Isolierung der DNA aus den Leukozyten erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits laut Angaben des Herstellers. Verifiziert wurde das Ergebnis durch Auftrennung von 5 µl des gewonnenen Eluates auf einem 1,2%igem Agarosegel.

4.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung linearer DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Die Agarose bildet eine Netzstruktur, durch welche Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode wandern. Große Fragmente wandern dabei langsamer als kleine.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose durch Erhitzen im Mikrowellenherd in Wasser gelöst, nach Abkühlen auf etwa 60°C in einen Träger gegossen und ein passender Kamm zur Bildung von Probetaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels auf einer horizontalen Fläche, wurde der Kamm entfernt, der Träger in die mit TAE und Ethidiumbromid gefüllte Gelkammer eingesetzt und die mit Ladepuffer (1/6 des Gesamtvolumens) versetzten Proben in die Taschen pipettiert. Da das

Auflösungsvermögen eines Gels hauptsächlich von der Dichte des Agarosenetzwerkes und damit von der Konzentration des Agarosegels abhängt, wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente Agarosegele mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Diese schwankten zwischen 1,2% und 3%. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 120 V für ein bis zwei Stunden. Die DNA-Banden ließen sich aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA bei UV-Licht (312 nm) visualisieren. Zur Größeneinordnung der DNA-Fragmente wurden passende DNA-Größenstandards (sog. „Leitern“) mit Angaben der DNA-Fragmentgröße in Basenpaaren (bp) verwendet.

4.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation eines 1019 bp umfassenden Teilstücks der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens erfolgte mit Hilfe der PCR. Dazu wurde mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primern 1 und 2 gearbeitet. Bei ihrer Konstruktion wurde Bezug genommen auf die von Pilot-Matias veröffentlichte Sequenz von SP-B [24]. Nach Lieferung mussten die Primer zur Herstellung einer Stammlösung in PCR-Puffer ohne $MgCl_2$ gelöst werden, so daß sich eine Konzentration von 100 pmol/ μ l ergab. Für die PCR wurden die Primer jeweils im Verhältnis 1:10 mit sterilem, destilliertem Wasser verdünnt.

Reagenzien	Menge	Konditionen
Puffer	10 μ l	1) 95°C für 2 min
Mg^{2+}	6 μ l	2) 37 Zyklen: 95°C für 50 sec
dNTPs	5 μ l	60°C für 50 sec
Primer 1	4 μ l	72°C für 50 sec
Primer 2	4 μ l	
Taq	0,5 μ l	
H ₂ O	65,5 μ l	
DNA	5 μ l	

Tab.1: PCR-Ansatz mit den Primern 1 und 2

Primer 1: 5' - AGC CCC ATC TCT TTT CAT CA - 3'

Primer 2: 5' - CAC TGC AGC AGG TGT GAC TC - 3'

Das Ansetzen der einzelnen Proben erfolgte ausschließlich auf Eis. Wie in Tab. 1 angegeben, wurden $MgCl_2$, dNTPs und die jeweiligen Primer in Puffer und destilliertem Wasser im aufgeführten Mengenverhältnis gelöst. Wegen der relativ hohen Gefahr der Degradation durften die Primer nur möglichst kurz aufgetaut bleiben. Nach Hinzufügen der Taq-Polymerase und gutem Mischen wurden die einzelnen Proben anschließend im PCR-Thermocycler unter den aufgeführten Konditionen inkubiert. Die anschließende

Überprüfung, ob die Sequenzen auch wirklich amplifiziert wurden, erfolgte durch Auftrennung von jeweils 5 µl der Proben auf einem 1,2%igem Agarosegel.

Für die richtige Wahl der Annealingtemperatur war es zweckmäßig, PCRs mit einem sog. „Gradienten“ durchzuführen. Dazu wurden PCR-Ansätze mit einer beliebigen genomischen DNA im PCR-Cycler jeweils einer um zwei Grad abweichenden Annealingtemperatur ausgesetzt. Anhand der Qualität der einzelnen Banden war zu erkennen, bei welcher Annealingtemperatur die Amplifikation optimal lief.

Um sicherzustellen, daß nicht mit kontaminierten Komponenten gearbeitet wurde, erfolgte bei jeder Versuchsreihe das Ansetzen einer Probe ohne DNA (Negativkontrolle). Bei der Visualisierung der Versuchsreihe war auf dem Gel bei nicht kontaminierten Proben in der Reihe dieser Negativkontrolle keine Bande zu erwarten.

4.2.5 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR purification Kit nach Herstellerangaben. Mit dieser Methode konnten die PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt werden. Zur Überprüfung der erfolgreichen Reinigung wurden 5 µl der Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt.

4.2.6 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme spalten DNA an ganz bestimmten, meist palindromischen Sequenzen. Wird durch eine Mutation einer oder mehrerer Basen diese Sequenz verändert, so schneidet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutationen neue Restriktionsstellen entstehen. Genomische DNA-Abschnitte aus zwei verschiedenen, genetisch nicht identischen Individuen können also nach einem Restriktionsverdau mit demselben Enzym Fragmente unterschiedlicher Länge aufweisen (sog. „Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus“ = RFLP).

Für die RFLP-Analyse der mit den Primern 1 und 2 amplifizierten und anschließend gereinigten 53 Proben wurden die in Tab. 2 aufgeführten Restriktionsenzyme verwendet. Hierzu mußten die Proben in eine Lösung aus BSA, Puffer und destilliertem Wasser überführt werden, bevor dann das jeweilige Enzym hinzugegeben wurde. Tab.

3 zeigt einen Reaktionsansatz für ein beliebiges Restriktionsenzym. Um eine vollständige Spaltung sicher zu gewährleisten, wurde Enzym im Überschuss zugegeben. Die Aktivität eines Restriktionsenzym ist wie folgt definiert: 1 U Enzym spaltet alle vorhandenen spezifischen Spaltstellen in 1 µg DNA in einer Stunde bei seiner optimalen Inkubationstemperatur.

Enzym	Konditionen	Erkennungssequenz
Alu I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..AG▼CT..3' 3'..TC▲GA..5'
Ban II	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..G(A/G)GC(T/C)▼C..3' 3'..C▲(T/C)CG(A/G)G..5'
Hae III	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..GG▼CC..3' 3'..CC▲GG..5'
Fok I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..GGATG(N) ₉ ▼..3' 3'..CCTAC(N) ₁₃ ▲..5'
Hha I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..GCG▼C..3' 3'..C▲GCG..5'
Hinf I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..G▼ATC..3' 3'..CTNA▲G..5'
Hpa II	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..C▼CGG..3' 3'..GGC▲C..5'
Nci I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..CC▼(C/G)GG..3' 3'..GG(G/C)▲CC..5'
Pst I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..CTGCA▼G..3' 3'..G▲ACGTC..5'
Sfi I	Verdau für 3 h bei 50°C	5'..GGCC(N) ₄ ▼NGGCC..3' 3'..CCGGN▲(N) ₄ CCGG..5'
Taq I	Verdau für 3 h bei 65°C	5'..T▼CGA..3' 3'..AGC▲T..5'

Tab. 2: Für die Restriktionsanalysen verwendete Enzyme

Reagenzien	Menge
Puffer X	5 µl
BSA	5 µl
Enzym Z	3 U = y µl
H ₂ O	(20-y) µl
DNA	10 µl

Tab. 3: Ansatz für einen Verdau mit einem beliebigen Enzym Z aus Tab. 2

Puffer X ist der für das jeweilige Enzym empfohlene Puffer laut Herstellerangaben

Die Darstellung der Ergebnisse des jeweiligen Verdau erfolgte durch die Gelelektrophorese. Da für den Verdau mit Hae III, Alu I, Ban II und Hinf I neben größeren Fragmenten von 200 bp bis 500 bp auch kleinere Stücke von nur etwa 10 bp bis 20 bp zu erwarten waren, mußte hier ein Gel ausgewählt werden, mit dem sowohl große als auch kleine Fragmente in guter Qualität dargestellt werden können. In diesen Fällen wurde ein nicht denaturierendes Acrylamidgel verwendet. Für den Verdau mit den anderen Enzymen reichte es aus, die Gelelektrophorese mit einem 2-3%igem Agarosegel durchzuführen.

4.2.7 Acrylamidgelelektrophorese

Zur Herstellung eines Acrylamidgels wurde zunächst 40%iges (38:2) Acrylamid mit 10x TBE, APS 10% und Wasser gemischt. Nach Zugabe von Temed begann die Polymerisation des Gels, so daß nach kurzem Durchmischen das Gel in einen vertikalen Träger gegossen und der Kamm zur Bildung der Probetaschen eingesetzt werden konnte. Nach etwa einer Stunde war das Gel erstarrt und wurde vertikal in die mit TBE und Ethidiumbromid befüllte Gelkammer plziert. Nach einer Vorlaufzeit von einer Stunde bei 200 V zur Ausrichtung der Polymere, wurden die mit einem Ladepuffer (1/6 des Gesamtvolumens) versetzten Proben in die Taschen pipettiert. Verwendet wurden Gele mit einer Konzentration zwischen 5 und 10 %. Die Proben wurden je nach Acrylamidkonzentration und Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente bei 140 bis 200 V zwischen 4 und 8 h aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte wie bei den Agarosegelen unter dem UV-Licht-Betrachter. Zur Größeneinordnung wurde ein DNA-Größenstandard aufgetrennt.

4.2.8 Sequenzierung

Acht zufällig ausgewählte, mit den Primern 1 und 2 amplifizierte und anschließend gereinigte DNA-Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma Seqlab in Göttingen geschickt.

4.2.9 Converted PCR

Es handelt sich bei der converted PCR um eine PCR mit Primern, die an wenigen Stellen nicht passende Basen tragen, sog. „mismatched Primer“. Die Primer sind jedoch so spezifisch, daß sie auf jeden Fall an der gewünschten Stelle binden. Die amplifizierten Produkte enthalten dann eine leicht veränderte Basensequenz. Je nach

Wahl der manipulierten Basen kann man dadurch Sequenzen amplifizieren, die Schnittstellen für bestimmte Enzyme enthalten. Im Falle einer Mutation im Bereich dieser Schnittstelle, wird die amplifizierte Sequenz nicht geschnitten werden können. So wurde es möglich, die 53 DNA-Proben auf die mittels Sequenzierung identifizierte Mutation hin zu untersuchen.

Reagenzien	Menge	Konditionen
Puffer	10 µl	1) 95°C für 2 min
Mg ²⁺	6 µl	2) 37 Zyklen: 95°C für 30 sec
dNTPs	5 µl	60°C für 30 sec
Primer 3	4 µl	72°C für 30 sec
Primer 4	4 µl	
Red-Taq	0,5 µl	
H ₂ O	65,5 µl	
DNA	5 µl	

Tab 4: PCR-Ansatz mit den Primern 3 und 4 für eine converted PCR

Primer 3: 5' – GGA AGC TCT CAA GAG CAT TGC T – 3'

Primer 4: 5' – GAG AGG GGT GGA GGG CAT CT – 3'

Für die converted PCR wurden die Primer 3 und 4 verwendet, wobei Primer 3 einen mismatched Primer mit einer falschen Base darstellte. Dadurch entstanden bei der PCR Amplifikate, die durch das Restriktionsenzym Xba I im Falle der Wildtypsequenz geschnitten und im Falle der Mutationsequenz nicht geschnitten werden konnten. Die Präparation der Primer sowie das Ansetzen der einzelnen Proben entsprach der unter 4.2.4 beschriebenen Methode. Tab. 4 sind die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten, die Konditionen und die Sequenzen der Primer 3 und 4 zu entnehmen. Als Matrize dienten die mit den Primern 1 und 2 gewonnenen Amplifikate, da die converted PCR mit der isolierten genomischen DNA als Matrize nicht erfolgreich war. Außerdem wurde als Taq-Polymerase die Red-Taq-Polymerase verwendet. Der Restriktionsverdau mit Xba I erfolgte entsprechend der unter 4.2.6 dargelegten Methode.

4.2.10 Zellbiologische Methoden

Das Arbeiten mit der verwendeten Zelllinie erfolgte an Sterilbänken. Alle Glas- und Metallgefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert. Lösungen wurden, soweit möglich, vor Gebrauch bei 120 °C und einem Druck von 3 bar für mindestens 20 min autoklaviert

oder mit einem 0,2 µm Filter sterilisiert. Die verwendeten Zellkulturschalen, Kunststoffzentrifugenröhrchen und Plastikpipetten wurden bereits steril geliefert.

Gearbeitet wurde mit der Adenokarzinom-Zelllinie NCI H441 (H441-Zellen). Diese stammt vermutlich von Clara-Zellen der Lunge ab und wächst adhärent. Es wurden Zellen der 56. Passage erworben. Sie waren in flüssigem Stickstoff bei -180°C bzw. bei Anlieferung auf Trockeneis gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen zunächst unter dem Bunsenbrenner leicht angetaut und anschließend in RPMI-Medium, 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, Penicillin (100 U/ml), Amphotericin B (0,1 mg/ml) und 2 mM L-Glutamin aufgelöst. Im nächsten Schritt wurde die Lösung 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert, die sich im Pellet befindlichen Zellen in 5 ml RPMI-Medium überführt und in einer mit 10 ml RPMI-Medium gefüllten 100mm Schale zur Kultivierung ausgesät. Die Kultivierung fand in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C statt. Das Kulturmedium wurde alle 2-4 Tage erneuert.

Einmal wöchentlich bzw. bei einer geschätzten Zelldichte von 50-70% erfolgte das Passagieren der Zellen mit dem Zweck der Ausdünnung. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml Trypsin, gutes Durchmischen und Bebrütung für 5 min bei 37°C im Brutschrank in Lösung gebracht. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gehemmt. Je 5 ml der Lösung konnten nun in 3 mit 10 ml RPMI-Medium befüllte Schalen überführt werden. Nach 24 Stunden wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen auf der Schalenoberfläche adhärent wuchsen.

4.2.11 Nukleäre Extrakte

Für die unter 4.2.12 beschriebenen EMSA-Versuche wurden nukleäre Extrakte benötigt, deren Extraktion aus den H441-Zellen erfolgte. Diese wurden bis zu einer etwa 70%igen Konfluenz kultiviert, was durch Betrachtung unter dem Mikroskop abgeschätzt wurde. Das Nährmedium wurde entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und mechanisch von der Oberfläche der Kulturschalen entfernt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min und 4°C wurde das entstandene Zellpellet in 500 µl hypotonen Puffer resuspendiert und die Lösung für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellmembranen wurden anschließend durch Verwendung eines Dounce-

Glashomogenisators und anschließendes Vortexen für 30 sec zerstört. Die freigesetzten Zellkerne konnten nun durch Zentrifugation bei 16000 U/min und 4°C für 5 min und anschließende Resuspension des entstandenen Pellets in 100 µl Puffer 1 isoliert werden. Anschließend erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von 100 µl Puffer 2 unter ständigem Schütteln, die Inkubation bei 4°C für 30 min und letztendlich eine Zentrifugation bei 16000 U/min und 4°C für 20 min, um letzte zelluläre Bestandteile durch Verwerfen des entstandenen Pellets entfernen zu können.

Die Konzentrationsbestimmung der nukleären Extrakte erfolgte nach dem Bioradassay, die Aufbewahrung nach Aliquotierung durch Einfrieren bei -80°C.

4.2.12 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Mit Hilfe dieser *in vitro* Methode ist es möglich, die Bindungsaktivitäten eines Transkriptionsfaktors an unterschiedlichen DNA-Sequenzen zu analysieren. Dazu werden die zu untersuchenden DNA-Sequenzen in Form von doppelsträngigen und mit radioaktiven oder fluoreszierenden Markern gelabelten Oligonukleotiden mit nukleären Extrakten inkubiert. Im elektrischen Feld eines Acrylamidgels wandern die Oligonukleotide mit entsprechenden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus dem nukleären Extrakt aufgrund der Proteinbindung langsamer als die Oligonukleotide ohne Bindungsstellen. Außerdem zeigen Oligonukleotide mit veränderter Sequenz im Bereich der Bindungsstellen und dadurch bedingter reduzierter Bindungsaktivität gegenüber Oligonukleotiden mit korrekter Sequenz eine abgeschwächte Signalintensität. Der Nachweis der Spezifität einer Bande für die Bindung eines bestimmten Transkriptionsfaktors aus dem nukleären Extrakt an die Oligonukleotide kann durch Zugabe von Kompetitoren in Form von nichtmarkierten spezifischen und nichtspezifischen Oligonukleotiden im Überschuß erfolgen. Somit war es möglich, die gefundene Mutation im Hinblick auf die Bindungsaktivität von TTF-1 im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* zu untersuchen.

Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Diese umfassten die Consensussequenz der zwei am weitesten stromabwärts gelegenen TTF-1 Cluster der Enhancerregion von SP-B. Tab. 5 sind die Sequenzen der markierten Oligonukleotide mit der Wildtyp- und der Mutationssequenz in Sense- und Antisenseform zu entnehmen. Ebenfalls zu entnehmen sind die

Sequenzen der nichtmarkierten spezifischen und unspezifischen Oligonukleotide in Sense- und Antisenseform, die auch von der Firma Metabion bezogen wurden. Zur Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide wurden jeweils 5 µl der komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide (je 500pmol/µl) in 5 µl 1x PCR-Puffer und 35 µl Wasser gelöst, in einem PCR-Cycler 1 h inkubiert (für jeweils 15 Minuten bei 85°C, 65°C, 37°C und schließlich 21°C) und anschließend auf Eis gelagert.

Oligonukleotid mit Mutation	Sense 5' – CTC TCA AGA GCA TTG <u>CTC AAA</u> AGT AG - 3' Antisense 5' - CTA CTT <u>TTG</u> AGC AAT GCT CTT GAG AG - 3'
Oligonukleotid mit Wildtypsequenz	Sense 5' – CTC TCA AGA GCA TTG <u>CTC AAG</u> AGT AG - 3' Antisense 5' - CTA CTC <u>TTG</u> AGC AAT GCT CTT GAG AG - 3'
Spezifischer Inhibitor	Sense 5' – CTC TCA AGA GCA TTG <u>CTC AAG</u> AGT AG - 3' Antisense 5' - CTA CTC <u>TTG</u> AGC AAT GCT CTT GAG AG - 3'
Unspezifischer Inhibitor	Sense 5' – GCA TTG CTA TCC AGT AGA GGG - 3' Antisense 5' – CCC TCT ACT GGA TAG ACC TGC - 3'

Tab. 5: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Die Consensussequenzen für TTF-1 sind jeweils unterstrichen

Für die EMSA-Ansätze wurden jeweils 0,2 ng Oligonukleotide mit 10 µg der nukleären Extrakte in 20 µl EMSA-Puffer bei 37°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Protein-Komplex auf ein 5%iges nicht denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen und für 4 h bei 200 V aufgetrennt. Da die fluoreszierenden Marker unter Licht innerhalb kurzer Zeit ihre fluoreszierende Eigenschaft verlieren, mußten das Ansetzen, die Inkubation und die elektrophoretische Auftrennung in der Dunkelkammer stattfinden. Die Auswertung erfolgte mit dem Odyssey-Scanner von LICOR.

4.2.13 Klonierung

Für die unter 4.2.14 beschriebenen Transfektionsversuche wurden entsprechende Vektorkonstrukte mit Sequenzen der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens in Form der Wildtyp- und der Mutationssequenz kloniert. Dazu wurde jeweils eine entsprechende DNA-Probe nach der unter 4.2.4 beschriebenen Methode der PCR amplifiziert. Diese Amplifikate dienten jeweils als Matrize für eine converted PCR, durch die Amplifikate mit spezifischen Restriktionsstellen erzeugt wurden. Dies erlaubte eine Ligation mit dem PGL3 Promotor Vektor, nachdem dieser durch einen

Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen linearisiert worden war und die Amplifikate ebenfalls durch die entsprechenden Enzyme verdaut worden waren.

Die Sequenz der Primer für die converted PCR sind Tab. 6 zu entnehmen. Primer 5 enthielt am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Enzym Nhe I, Primer 6 eine für das Enzym Bgl II. Damit umfassten die Amplifikate die Region von Nukleotid -484 bis -340 der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens und damit die gesamte Enhancerregion einschließlich aller TTF-1 Bindungselemente und RAREs. Tab. 6 zeigt auch den Ansatz für eine entsprechende PCR mit Mengenverhältnissen und Konditionen.

Reagenzien	Menge	Konditionen
Puffer	10 µl	1) 95°C für 2 min 2) 45 Zyklen: 95°C für 50 sec 60°C für 50 sec 72°C für 50 sec
Mg ²⁺	6 µl	
dNTPs	5 µl	
Primer 5	4 µl	
Primer 6	4 µl	
Taq	0,5 µl	
H ₂ O	65,5 µl	
DNA	5 µl	

Tab. 6: Converted PCR für die Klonierungsversuche

Primer 5: 5' – ATT TGC TAG CGG GAA AAG GTA AGG AG - 3'

Primer 6: 5' – AGC CTA GAT CTT CCC CTC CCA TC – 3'

Enzym	Konditionen	Erkennungs-Sequenz
Nhe I	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..G▼CTAGC..3' 3'..CGATC▲G..5'
Bgl II	Verdau über Nacht bei 37°C	5'..A▼GATCT..3' 3'..TCTAG▲A..5'

Tab.7: Verwendete Enzyme für die Klonierungsversuche

Reagenzien	Menge
Puffer B	5 µl
BSA	5 µl
Nhe I / Bgl II	0,5 µl / 0,5 µl
H ₂ O	19 µl
DNA	10 µl

Tab. 8: Ansatz für einen Verdau mit den Enzymen Nhe I und Bgl II

Tab. 7 und 8 sind der Ansatz und die Konditionen für einen Verdau mit den Enzymen Nhe I und Bgl II zu entnehmen. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Restriktionsendonukleasen durch Inkubation der Proben bei 65°C für 20 min inaktiviert. Der Erfolg des Restriktionsverbaus wurde durch Auftragen auf ein Agarosegel überprüft. Durch Vergleich der Helligkeitsintensitäten der Amplifikate und des linearisierten Vektors konnte das Mengenverhältnis zueinander abgeschätzt werden. Das war wichtig für die anschließende Ligation der Amplifikate mit dem Vektor, bei der

ein Mengenverhältnis von 2:1 bis 3:1 von Amplifikat zu Vektor angestrebt wurde. Tab. 9 zeigt den Ansatz mit Konditionen für eine solche Ligation.

Reagenzien	Menge	Konditionen
pGL3 DNA	1 µl x µl	Inkubation bei 15°C über Nacht
T4 DNA Ligase	1 µl	
Ligationspuffer	2 µl	
H ₂ O	(16-x) µl	

Tab.9: Ligationsansatz

Klonierung der geschnittenen Amplifikate in den linearisierten Vektor. Angestrebt wurde ein Verhältnis von Amplifikat zu Vektor von 2:1 bis 3:1. Entsprechend ist die Menge der DNA mit x bezeichnet.

Die Transformation des jeweiligen Vektorkonstruktes erfolgte in kompetente Zellen von E. coli XL1-Blue. Die Klonidentität wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde zunächst 5 ml steriles LB Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung 5 min bei 4000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet anschließend in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lysierung der Zellen wurde die Lösung nun mit 200 µl NaOH/SDS-Lösung vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Denaturierung und das Fällen der Zellwände erfolgte durch Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8), gutes Vortexen für 2 sec und Inkubation für 5 min auf Eis. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min und Raumtemperatur mußte anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt werden. Zur Fällung der DNA wurden 800 µl 95%iges Ethanol hinzugegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min und Raumtemperatur mußte die im Pellet enthaltene DNA durch Hinzugabe von 1 µl 70%igem Ethanol und anschließende Trocknung im Vakuum behandelt werden. Das Pellet wurde nun in 100 µl Wasser resuspendiert. 10 µl davon wurden für den Restriktionsverdau mit NheI verwendet. Die Proben, die Plasmid-DNA der erwarteten Größe enthielten, wurden nach Reinigung (s. 4.2.5) einer DNA-Sequenzierung (s. 4.2.8) unterzogen.

Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte mittels UV-Spektrometrie. Dazu wurden 5 µl einer Probe mit 295 µl Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt. Die optische Dichte bei 260 nm wurde gegen Wasser als

Referenz gemessen und die Nukleinsäurekonzentration nach folgender Formel berechnet: $c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \xi \times \text{VF}$ (c stellt die Nukleinsäurekonzentration dar, OD_{260} ist die optische Dichte bei 260 nm, ξ ist der Extinktionskoeffizient und beträgt 0,05 für doppelsträngige DNA, VF ist der Verdünnungsfaktor).

Zur Herstellung einer Glycerolstocklösung wurden die XL-1 Zellen nach Inokulation in autoklaviertem LB-Medium zunächst im Schüttelinkubator bei 250 rpm über Nacht aerob kultiviert. Am Folgetag wurden 200 μl autoklaviertes Glycerol mit 800 μl der Bakterienlösung in autoklavierten Tubes gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

4.2.14 Transfektion und Reporteragenassay

Als Transfektion bezeichnet man den Transfer von DNA in eukaryote Zellen. Beim transienten Gentransfer nehmen die transfizierten Zellen vorübergehend die fremde DNA in ihren Zellkern auf, ohne diese ins Chromosom zu integrieren. Stellen die Gene ein Plasmid mit einem Reporteragen und einer zu untersuchenden Enhancerregion dar, so kann dieser Zeitraum zur Untersuchung der Enhancerregion genutzt werden. So war es möglich, *in vitro* die Bedeutung der Mutation für die Transkription zu untersuchen.

Wie unter 4.2.13 beschrieben, wurden entsprechende Vektorkonstrukte mit der Wildtyp- bzw. Mutationssequenz kloniert und standen nach Lysierung der XL-1 Zellen und der anschließenden Reinigung der Plasmide durch das EndoFree Plasmid Kit für die folgenden Versuche zur Verfügung. Zur Transfektion wurde das Polyfect transfection reagent nach Angaben des Herstellers für HeLa-Zellen verwendet, wobei 1 μg des jeweiligen Vektorkonstruktes und 1 μg des CMV- β -gal-Plasmides als interner Kontrollvektor in die H441-Zellen kotransfiziert wurden. Diese wurden dazu einen Tag vor der Transfektion in 60 mm Petrischalen bis zu einer Dichte von 50% neu kultiviert (s. 4.2.10). Die Luciferase- und die β -Galaktosidaseaktivität wurden nach 2 Tagen Inkubation gemessen. Die Luciferase katalysiert eine Biolumineszenzreaktion, in der das Substrat Luciferin mit ATP zu einem Zwischenprodukt umgesetzt wird, das unter Oxidation zur Emission von Licht führt. Die emittierten Lichtsignale wurden im Luminometer gemessen und als RLUs (relative light units) angezeigt. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde ebenfalls im Luminometer bestimmt. Hierdurch war es möglich, die Werte der Luciferaseaktivität verschiedener Ansätze trotz möglicher Abweichungen der Transfektionseffizienz zu normalisieren und miteinander zu vergleichen. Die Zelllysisierung und der Luciferaseassay erfolgten durch Verwendung des Bright-Glo

Luciferase Assay Systems. Vor der jeweiligen Messung mußte zunächst eine Eichung des Gerätes durchgeführt werden, um die Hintergrundaktivität zu eliminieren. Dazu wurde eine erste Messung an einer leeren Luminometersäule durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Retinsäure auf das Expressionsverhalten der beiden Vektorkonstrukte wurde das Medium durch frisches RPMI-Medium mit 10^{-5} M Retinsäure (RA) oder einer Kontrolle mit DMSO einen Tag nach der Transfektion ersetzt. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation wurden dann die Luciferase- und die β -Galaktosidaseaktivität nach oben beschriebener Methode gemessen.

4.2.15 Statistische Methoden

Die Transfektionseffizienz wurde anhand der β -Galactosidaseaktivität normalisiert. Dazu wurde der gemessene Wert der Luciferaseaktivität einer Probe ins Verhältnis zum gemessenen Wert der β -Galactosidaseaktivität derselben Probe gesetzt. Multiple Transfektionen (N=5-12) wurden durchgeführt und die Resultate als Werte mit Standardabweichungen (+/- SD) aufgeführt. Die statistischen Analysen erfolgten nach dem Mann-Whitney-Test.

5 Ergebnisse

5.1 Isolierung der DNA, PCR, Restriktionsverdau

Zunächst bestand das Ziel der Arbeit darin, mittels Restriktionsenzymverdau nach einer Mutation in der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens zu suchen. Dazu wurde zunächst die genomische DNA der 53 Proben isoliert und zur Verifizierung auf einem Agarosegel dargestellt. Exemplarisch ist in Abb. 2 für die Proben 22-31 solch eine Auftrennung zu sehen.

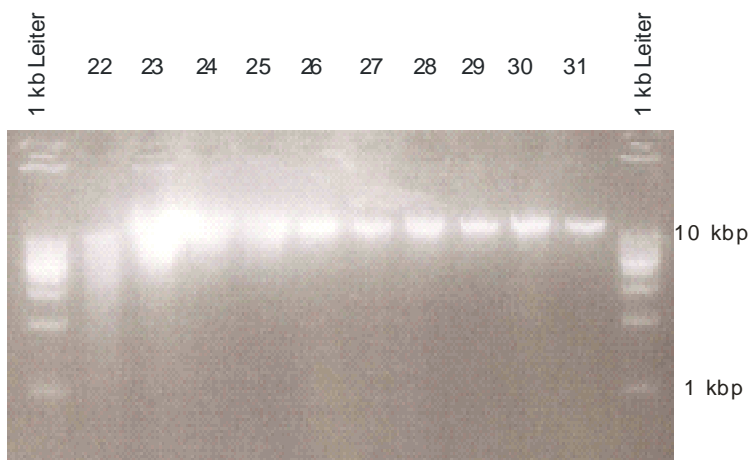


Abb. 2: Repräsentatives Agarosegel einer DNA-Isolierung

Laufzeit 1h bei 120 V, die Proben laufen bei 10 kb, Probe 22 ist degradiert, vermutlich durch häufiges Auftauen, Probe 23 und 24 sind überladen

Nach der DNA-Isolierung wurde mittels PCR ein 1019 bp umfassendes Teilstück der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens amplifiziert, das die Region -980 bis +39 ab Transkriptionsbeginn umfaßte. Nach mehreren Optimierungsprozeduren, die die unter 4.2.4 beschriebene Gradientenmethode und Anpassungen der Mengenverhältnisse umfassten, gelang es, reproduzierbar gute Amplifikationsergebnisse zu erzielen. Die Darstellung erfolgte auf einem Agarosegel. Abb. 3 zeigt beispielhaft eine Darstellung für die Proben 21-29. Insgesamt einmal im Rahmen der Arbeit war auf der Spur der Negativkontrolle eine Bande zu sehen. Nach konsequentem Ersatz aller PCR-Komponenten wurde eine weitere Kontamination nie wieder festgestellt.

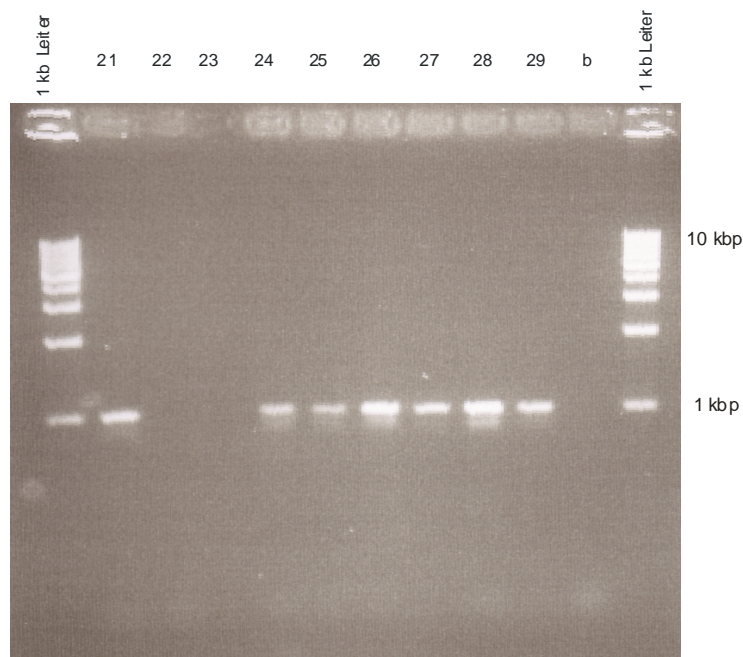


Abb.3: Repräsentatives Agarosegel für eine PCR mit den Primern 1 und 2

Laufzeit 1h bei 120 V, b steht für blank = Negativkontrolle, die Proben 22 und 23 wurden aus unbekanntem Gründen nicht amplifiziert, wie erwartet laufen die übrigen Proben bei etwa 1 kb

Die Amplifikate konnten nun für einen Restriktionsverdau genutzt werden. Zuvor wurden diese zum Zwecke der Konzentration gereinigt, was sich durch die Darstellung eindeutig hellerer und schärferer Banden verifizieren ließ. Außerdem konnten unsauber begrenzte Banden am Unterrand des Gels in ihrer Intensität deutlich reduziert werden. Bei diesen handelte es sich um Primerdimere, die sich aus den überschüssigen Primern bei der PCR bildeten. Der Restriktionsverdau wurde mit den in Tab. 2 (s. 4.2.6) aufgeführten Enzymen durchgeführt. Je nach Enzym waren zwischen 2 und 8 Banden zu erwarten. Primär wurde mit den Enzymen gearbeitet, die viele Fragmente erwarten ließen. Im Falle einer Mutation war damit die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß sich diese durch einen RFLP nachweisen ließ. Durch die Verwendung hochprozentiger Agarose- bzw. Acrylamidgele konnte gewährleistet werden, daß selbst bei wenigen großen Fragmenten eine gute Auftrennung stattfand bzw. große und kleine Fragmente sauber dargestellt wurden. Leider konnte mit keinem der verwendeten Enzyme ein RFLP nachgewiesen werden. Bei allen verwendeten Enzymen zeigte sich für alle 53 Proben jeweils das gleiche Schnittmuster, so daß davon auszugehen war, daß zumindest in den geschnittenen Bereichen keine Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Proben vorlagen.

5.2 Sequenzierung

Bei einem negativen Ergebnis der Restriktionsanalysen und der weiterhin bestehenden Annahme des Vorhandenseins von Mutationen in der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens, wurden mehrere zufällig ausgewählte Proben einer Sequenzierung unterzogen. Von insgesamt 8 untersuchten Proben zeigte sich bei zwei Proben tatsächlich eine Mutation. In beiden Proben konnte an Position -384 vor Transkriptionsbeginn eine Punktmutation nachgewiesen werden. Guanin war in beiden Fällen durch Adenin ersetzt. Diese Punktmutation befand sich genau in der Consensussequenz der 3'-gelegenen Bindungsstelle für TTF-1 der Enhancerregion des SP-B Gens. Die Consensussequenz war von CAAG zu CAAA mutiert. Dieses Ergebnis konnte durch Wiederholung der Sequenzierung bestätigt werden. In Abb. 4 ist der entscheidende Abschnitt der Sequenzierung dargestellt.

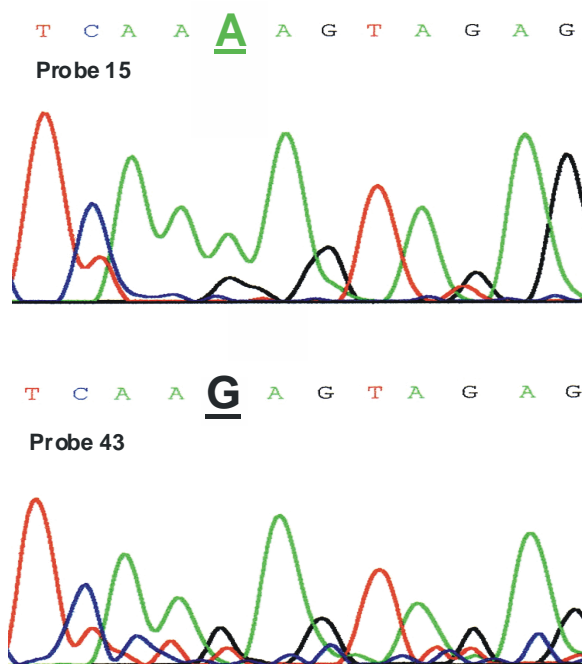


Abb. 4: Sequenzierung der Proben 15 und 43
In Probe 15 ist die Punktmutation zu erkennen (A statt G)

5.3 Converted PCR

Der Nachweis einer Mutation führte zur Frage der Häufigkeit in dem zur Verfügung stehenden Probenkollektiv. Dazu bot sich die Methode der converted PCR an. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, eine Schnittstelle für das Enzym Xba I in den Amplifikaten der Wildtypsequenz zu erzeugen. Im Falle der Mutationssequenz war für das Enzym aufgrund der Punktmutation keine Erkennungssequenz vorhanden, so daß

die entsprechenden Amplifikate nicht geschnitten werden konnten. Bei Verwendung der genomischen DNA als Amplifikationsmatrize für die converted PCR konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Daher wurde diese als nested PCR durchgeführt. Als Amplifikationsmatrizen dienten hierfür die mit den Primern 1 und 2 amplifizierten Sequenzen. Aufgrund unbefriedigender Ergebnisse bei Verwendung der Taq-Polymerase wurde die Red-Taq-Polymerase benutzt.

Auch bei dieser PCR waren wieder mehrere Optimierungsprozeduren notwendig, um gute Amplifikationsergebnisse zu erzielen. Schließlich war so ein schnelles Screenen bzgl. der Häufigkeit der Punktmutation möglich. Es zeigte sich bei 15 Proben eine Heterozygotie (28%) und bei einer Probe eine Homozygotie (2%) für die Mutationssequenz. Bei 37 Proben war eine Homozygotie für den Wildtyp (70%) nachzuweisen. Abb. 5 zeigt beispielhaft für einige Proben das Ergebnis dieser Untersuchungen. Zu beachten ist dabei, daß die heterozygote Mutation 3 Banden aufweist, da aufgrund der Heterozygotie bei der PCR Matrizen mit der Mutations- und der Wildtypsequenz amplifiziert werden. Die Amplifikate mit der Mutationssequenz werden beim Verdau mit Xba I nicht geschnitten und zeigen sich folglich durch eine Bande bei 110 bp. Die Amplifikate mit der Wildtypsequenz hingegen werden in ein 88 und ein 22 bp Fragment geschnitten und werden damit durch zwei Banden repräsentiert.

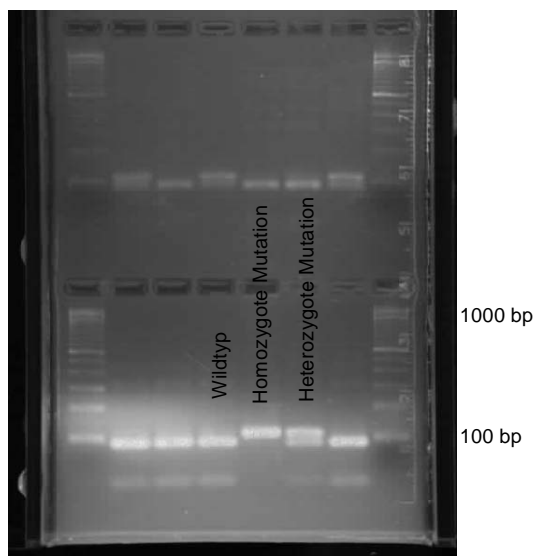


Abb. 5: Converted PCR zum schnellen Screenen bzgl. der Mutation

Die heterozygote Mutation zeichnet sich durch 3 Banden (22, 88 und 110 bp) aus, die homozygote Mutation durch eine Bande bei 110 bp. Beim homozygoten Wildtyp sind zwei Banden(22 und 88 bp) zu erwarten.

5.4 EMSA

Da sich die gefundene Mutation an einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor TTF-1 befand, wurde mit Hilfe der EMSA-Methode untersucht, welchen Einfluß die Mutation in vitro auf die Bindungsaktivität von TTF-1 hat. Die verwendeten Oligonukleotide umfassten die Consensussequenz der ersten und zweiten TTF-1 Bindungsstelle der Enhancerregion des SP-B Gens und zeigten DNA-Protein-Komplexe mit nukleären Extrakten der H441-Zellen. Nur ein Komplex war allerdings spezifisch für die Bindung von TTF-1, da dieser Komplex bei Zugabe von spezifischer, unmarkierter Kompetitions-DNA in 100 molarem Exzess nahezu verschwand. Im Gegensatz dazu verursachte die nichtspezifische, unmarkierte Kompetitions-DNA nur eine geringe Reduktion der Formation des DNA-Protein-Komplexes. Schwache Banden mit höherer und niedrigerer Mobilität wiesen keine Spezifität auf. Die verwendeten Oligonukleotide mit der Mutationssequenz wiesen gegenüber denen mit der Wildtypsequenz eindeutig eine verminderte Bindungsaktivität auf. Diese Verminderung muß zwar als moderat beschrieben werden, ließ sich aber mehrfach reproduzieren. Abb. 6 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines EMSA-Versuches.

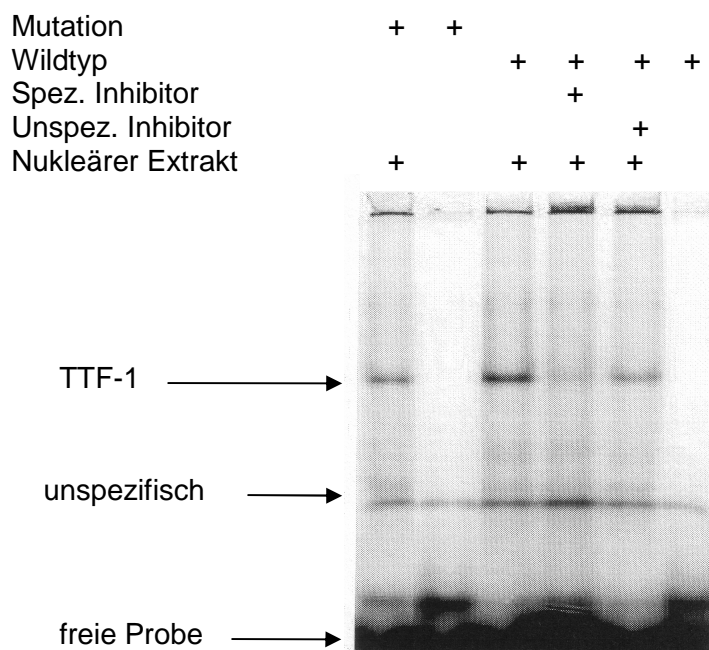


Abb. 6: Repräsentatives Gel von insgesamt drei EMSA-Versuchen

Es wurden Oligonukleotide verwendet, die den Wildtyp und die Mutation repräsentierten. Die Mutationssequenz wies einen Wechsel der Consensussequenz für TTF-1 von CAAG zu CAAA auf. Die mutierte Sequenz zeigt einen schwächeren Protein-DNA Komplex als der Wildtyp.

5.5 Transfektionsassay

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Punktmutation *in vitro* zu einer abgeschwächten Bindungsaktivität gegenüber der Wildtypsequenz führt, sollte nun untersucht werden, welche funktionelle Bedeutung diese Mutation *in vitro* hat. Es konnte vermutet werden, daß eine abgeschwächte Bindungsaktivität zu einer reduzierten Enhanceraktivität führt.

Für die funktionellen Untersuchungen der Punktmutation verwendeten wir Transfektionsassays mit einer Reportergenkonstruktion, die die gesamte Enhancerregion des SP-B Gens umfasste, basierend auf einem Luciferasereportervektor. Der SV40-Promoter dieses Vektors reflektierte in früheren Untersuchungen verlässlich die Funktionen der cisaktiven Elemente der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens [18]. Die Sequenz der Enhancerregion umfasste Nukleotid -484 bis -340. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diese Region den größten Teil der Enhanceraktivität bei der Transkription des SP-B Gens ausmacht [18, 19, 21]. Es wurden jeweils multiple Transfektionen mit den zwei Vektorkonstrukten (Mutation und Wildtyp) durchgeführt und die Transfektionseffizienz durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. In allen Versuchen war die Standardabweichung kleiner als 20%. Für die Mutation zeigte sich gegenüber dem Wildtyp eine Reduktion der Reportergenaktivität auf 53% mit einer Standardabweichung von $\pm 8,1$. Dieses Ergebnis war mit einem $P < 0,01$ statistisch signifikant.

Da sich cisaktive Elemente für RAR in enger Nachbarschaft zu denen für TTF-1 befinden und eine enge Interaktion beider Elemente beschrieben wurde [21], lag es nah, den Einfluß von Retinsäure (RA) auf die Reportergenaktivität zu untersuchen. Nach der Inkubation mit RA wiesen sowohl der Wildtyp als auch die Mutation eine Steigerung der Reportergenaktivität auf. Diese war für den Wildtyp 1,6-fach, für die Mutation 1,7-fach. Allerdings waren diese Ergebnisse bei einem $P > 0,05$ statistisch nicht signifikant. Das Konstrukt mit der Mutationssequenz zeigte jedoch auch in diesen Versuchen immer noch eine reduzierte Aktivität (64,7% $\pm 8,5$) gegenüber dem Konstrukt mit der Wildtypsequenz, die mit einem $P < 0,01$ statistisch signifikant war.

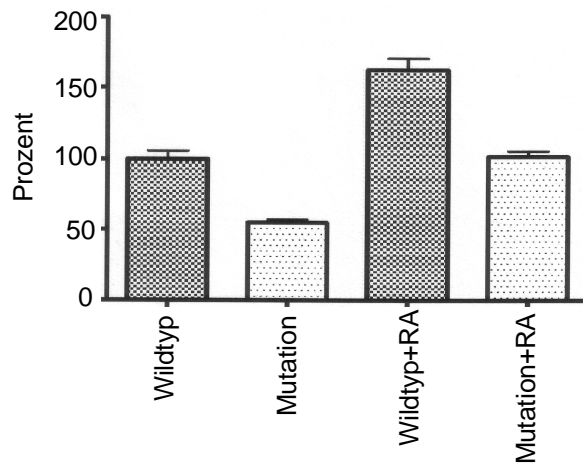


Abb. 7: Transfektionsassay in H441 Zellen

Gegenüber dem Wildtypkonstrukt zeigt das Mutationskonstrukt eine reduzierte Transkriptionsaktivität (Säule 1 und 2). Eine Behandlung mit Retinsäure (RA) erhöht die Transkriptionsaktivität in beiden Fällen nach 48h Inkubation (Säule 1 und 3 bzw. 2 und 4). Gegenüber dem Wildtypkonstrukt zeigt das Mutationskonstrukt auch unter RA-Stimulation eine reduzierte Transkriptionsaktivität (Säule 3 und 4).

6 Diskussion

6.1 Polymorphismus?

Wir identifizierten eine Mutation in der transkriptionell wichtigen 5'-flankierenden Region des SP-B Gens, für die sich in 28% eine Heterozygotie und in 2% eine Homozygotie in dem untersuchten Patientenkollektiv zeigte. Dies entspricht einer Frequenz von 16% für das Mutationsallel und von 84% für das Wildtypallel. Dieses Ergebnis ist den Veröffentlichungen des Fred Hutchinson Cancer Research Centers (<http://pga.mbt.washington.edu/>) sehr ähnlich, in denen eine Verteilung von 14% für das Mutationsallel und von 86% für das Wildtypallel beschrieben wurde.

Aufgrund der kleinen Patientenzahl von 53 kann keine endgültige statistische Aussage über die Häufigkeit dieser Mutation in der Bevölkerung gemacht werden. Insbesondere die Frage, ob es sich um einen Polymorphismus handelt, bleibt ungeklärt. Definitionsgemäß wird von einem Polymorphismus ab einer Häufigkeit von 1% pro 100.000 Einwohner gesprochen. Um das herauszufinden, müßte ein wesentlich größeres Patientenkollektiv untersucht werden. Da die Frequenz des mutierten Allels in dem untersuchten Patientenkollektiv immerhin 16% beträgt und die Patienten rein zufällig ausgewählt wurden, kann zumindest vermutet werden, daß es sich um einen Polymorphismus handelt.

6.2 Funktionelle Bedeutung der Mutation

Die Mutation beinhaltet eine einzelne Basenpaarmutation an Position -384 ab Transkriptionsbeginn. Damit liegt sie in dem am weitesten stromabwärts gelegenen TTF-1 Bindungscluster der Enhancerregion und führt zu einer Änderung der Consensussequenz von CAAG zu CAAA. Aufgrund dieser Lokalisation war eine funktionelle Bedeutung der Mutation im Rahmen der Transkription zu vermuten. Dafür sprach die immens wichtige Bedeutung von TTF-1 in der Regulation und zellspezifischen Expression des SP-B Gens [17, 18, 19, 21, 25, 26, 27]. Außerdem war zum einen bekannt, daß ein Fehlen der Enhancerregion in transgenetischen Mausmodellen zu einem vollständigen Verlust bzw. zu einer signifikanten Reduktion der Transkriptionsaktivität der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens in den Bronchiolarzellen bzw. den Typ-II-Zellen führt [20]. Zum anderen zeigten in vitro

Untersuchungen von Yan et al., daß Basenpaarveränderungen in den verschiedenen TTF-1 Bindungselementen zu einem vollständigen Verlust oder zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptionsaktivität führen [18].

In den durchgeführten EMSA-Experimenten ging die Mutation mit einer verminderten Bindung von TTF-1 einher und bestätigte damit die Vermutung, daß die veränderte Consensussequenz zu einer verminderten Bindungsaktivität von TTF-1 führt. TTF-1 gehört zur Familie der Nkx2-Proteine. Diese sind gekennzeichnet durch eine Homöodomäne, mit der sie an cisaktive Elemente binden können. Im Falle von TTF-1 wird die Bindungsaktivität durch den Kontakt zwischen dem Homöodomänen-Motiv und der Consensussequenz CAAG bestimmt. Fabbro et al. untersuchten verschiedene Mutationen der Basenpaare in der Consensussequenz und um diese herum [28]. Dabei fanden sie eine Reduktion der Bindungsaffinität von TTF-1 von ungefähr 50% bei einer Punktmutation von CAAG zu CAAA. Das Ergebnis der Untersuchungen von Fabbro et al. ist damit dem Ergebnis der EMSA-Untersuchungen sehr ähnlich.

Um die funktionelle Bedeutung der Punktmutation zu untersuchen, führten wir Transfektionsversuche durch. Diese zeigten eine etwa 50%ige Reduktion der Reporterogenaktivität des Mutationskonstruktes gegenüber dem Wildtypkonstrukt. Dieses Ergebnis ist den Ergebnissen der Untersuchungen von Yan et al. sehr ähnlich [18]. Sie zeigten bei einer in vitro Mutation der gesamten Consensussequenz des am weitesten stromabwärts gelegenen TTF-1 Bindungsclusters ebenfalls eine 50%ige Reduktion der Reporterogenaktivität.

Hingegen sind die Ergebnisse der Transfektionsassays mit Retinsäure (RA) nicht ganz stimmig mit ähnlichen Untersuchungen von Naltner et al. [19]. Wie in der Einleitung unter 2.4 beschrieben, konnten Naltner et al. zeigen, daß die Stimulation der Expression des SP-B Gens durch RA abhängig von den TTF-1 Bindungselementen ist. So führt eine Mutation der TTF-1 Bindungselemente zu einer reduzierten oder vollständig aufgehobenen Stimulation durch RA. Wir führten daher die Transfektionsversuche alternativ unter Inkubation mit RA durch. Sowohl das Wildtyp- als auch das Mutationskonstrukt zeigten eine ähnliche Stimulation der Genexpression, die etwa 1,7fach war. Eine signifikante Reduktion der Expressionsaktivität des Mutationskonstruktes gegenüber dem Wildtypkonstrukt war auch unter der Behandlung

mit RA nachweisbar. Diese Ergebnisse entsprechen nicht ganz denen von Naltner et al., die eine stärkere Empfänglichkeit des Wildtypkonstruktes gegenüber eines Mutationskonstruktes für eine Stimulation durch RA nachwies. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Tatsache, daß Naltner et al. die gesamte 5'-flankierende Region inkl. SP-B Promotor für ihre Transfektionsversuche verwendet haben. Da jedoch die Ergebnisse für die isolierte Enhancerregion und für die gesamte 5'-flankierende Region in den Transfektionsuntersuchungen von Yan et al. gut miteinander korrelierten [18], beschränkten wir uns auf die isolierte Enhancerregion.

Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Möglichkeit, daß eine einzelne Punktmutation nur einen relativ kleinen Einfluß auf die Steigerung der Expressionsaktivität nach Stimulation durch RA hat. Wie in der Einleitung unter 2.4 beschrieben, sind viele Kofaktoren und insgesamt sechs Bindungselemente (drei TTF-1 Elemente und drei RAREs) an der Stimulation durch RA beteiligt. Es ist daher vorstellbar, daß nur eine große Veränderung der Consensussequenz eine signifikante Reduktion der Aktivität dieses Komplexes verursacht, so wie es durch Naltner et al. demonstriert werden konnte [19]. Ohne RA-Stimulation besitzen die TTF-1 Bindungselemente möglicherweise eine größere Bedeutung für eine Steigerung der Transkriptionsaktivität, da sie dann alleine die Enhancerfunktion vermitteln und sich folglich eine kleine Veränderung schwerer auswirken kann.

6.3 Klinische Bedeutung der Punktmutation

Es ist bekannt, daß der Gehalt von SP-B mRNA in humanen Lungen individuell unterschiedlich ist [22, 29] und es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Umstand genetisch determiniert ist. Eine individuell unterschiedliche Transkription des SP-B Gens ist dafür eine mögliche Erklärung. Allerdings wird der mRNA Gehalt eines Gens auch durch andere Mechanismen reguliert. Beispiele hierfür sind die posttranskriptionelle Regulation durch die RNA-Processing-Kontrolle, durch die RNA-Transport-Kontrolle und die mRNA-Abbau-Kontrolle, die die mRNA Stabilität reguliert. Daher ist es ausgeschlossen, daß die gefundene Mutation alleine verantwortlich für den individuell unterschiedlichen SP-B mRNA Gehalt ist. Es ist jedoch denkbar, daß die Punktmutation durch den Einfluß auf die Transkription zu einem individuell unterschiedlichen Gehalt der SP-B mRNA beiträgt und damit einen individuell unterschiedlichen Gehalt von SP-B mitbedingt.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist ein vollständiges Fehlen von SP-B mit dem Leben nicht vereinbar. Dies zeigen eindrucksvoll Untersuchungen an SP-B knock-out Mäusen [7, 30] und die hereditäre SP-B Defizienz [10]. Es wird allerdings auch davon ausgegangen, daß schon eine Reduktion des SP-B Gehaltes zu einer Lungenerkrankung führen kann. Dabei wird eine kritische Menge von SP-B für die Entwicklung einer Lungenerkrankung in einem Bereich zwischen 10-25% angenommen [23, 30]. Eine offensichtliche Veränderung des Phenotyps durch die Punktmutation alleine ist daher nahezu ausgeschlossen. Denn diese verursacht in vitro eine maximale Reduktion der Expressionsaktivität von 50%. Selbst wenn die SP-B Menge nur über die Transkriptionsrate gesteuert wäre, würde somit die kritische Grenze nicht erreicht werden. Bei Vorhandensein weiterer Faktoren, die ebenfalls zu einem reduzierten SP-B Gehalt führen, wäre dies allerdings vorstellbar. Umwelteinflüsse einerseits und zusätzliche Mutationen andererseits sind als solche Faktoren denkbar.

Zu den Umwelteinflüssen, die zu einem reduzierten SP-B Gehalt führen, könnte beispielsweise das Zigarettenrauchen zählen. Dafür sprechen zumindest Untersuchungen von Subramaniam et al., die den SP-B Gehalt von Ratten untersuchten, die chronisch einem Zigarettenrauch exponiert waren [31]. Gegenüber einer Kontrollgruppe waren die SP-B Mengen signifikant um bis zu 50% reduziert. Die Vermutung, daß ein erniedrigter SP-B Gehalt durch Umwelteinflüsse für eine Lungenerkrankung prädisponieren könnte, wird durch Untersuchungen von Epaud et al. [32] und Tokieda et al. [8] an transgenen Mausmodellen gestützt. So sind heterozygote SP-B (+/-) Mäuse anfälliger für eine Hyperoxie- oder LPS-induzierte Lungenerkrankung als homozygote SP-B (+/+) Mäuse. Eine Überexpression des SP-B Gens in SP-B (+/++) Mäusen inhibiert sogar eine Endotoxininduzierte Lungenentzündung.

Als Hinweis, daß mehrere Mutationen zu einer kritischen Reduktion der SP-B Menge führen können, sind die Untersuchungen von Dunbar et al. über die hereditäre SP-B Defizienz zu werten [23]. Wie unter 2.3 beschrieben ist die kongenitale SP-B Defizienz zu etwa 60% durch eine homozygote 121ins2 Mutation bedingt. Dunbar et al. konnten zeigen, daß bei anderen Mutationen einschließlich der heterozygoten 121ins2 Mutation eine weitere zusätzliche Variation zu einem Fehlen von SP-B führen kann.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die Punktmutation im Sinne einer multifaktoriellen Genese möglicherweise ein Baustein für die Entwicklung einer Lungenerkrankung ist. Ob kombinatorische Effekte zwischen der Punktmutation und anderen Mutationen oder Umweltfaktoren tatsächlich in vivo auftreten muß allerdings noch untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Surfactant Protein B (SP-B) ist ein in Typ-II-Zellen der Lunge gebildetes 8 kDa schweres Protein, das für die Funktion des Surfactants und damit für die Lungenfunktion äußerst bedeutsam ist. Ein SP-B Gehalt von unter 50% des normalen Gehaltes führt in humanen Lungen und Tiermodellen zu einer reduzierten Surfactantfunktion. Es ist bekannt, daß der Gehalt von SP-B mRNA in Lungen individuell unterschiedlich ist und es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Umstand genetisch determiniert ist. Innerhalb des SP-B Gens wurden bisher zahlreiche Polymorphismen beschrieben. Untersuchungen über Polymorphismen im Bereich der regulatorischen Elemente des SP-B Gens, der sog. 5'-flankierenden Region, wurden bisher jedoch nicht demonstriert. Wir suchten daher nach Mutationen in der 5'-flankierenden Region des SP-B Gens und konnten eine Punktmutation in der Consensussequenz des am weitesten stromabwärts gelegenen TTF-1 Bindungselementes der Enhancerregion von SP-B charakterisieren. Diese Punktmutation ist an Position -384 vor Transkriptionsbeginn lokalisiert.

In einem kleinen Patientenkollektiv (n=53) zeigte sich bei 15 Patienten (28%) eine heterozygote Mutation, bei einem Patienten (2%) konnte eine Homozygotie identifiziert werden. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Punktmutation führten wir EMSA-Versuche mit nukleären Extrakten aus H441 Zellen durch. Dabei zeigte sich eine reduzierte Bindungsaktivität der mutierten Sequenz gegenüber der Wildtypsequenz. In Reporterassays mit einem Luciferasereporter in transfizierten H441 Zellen zeigte sich eine etwa 50%ige Reduktion der Transkriptionsaktivität des Mutationskonstruktes gegenüber dem Wildtypkonstrukt. Die Stimulation durch Retinsäure führte zu einer erhöhten Reporteraktivität beider Konstrukte. Allerdings zeigte das Mutationskonstrukt gegenüber dem Wildtypkonstrukt nach wie vor eine reduzierte Transkriptionsaktivität. Aus diesen Untersuchungen schlossen wir, daß die beschriebene Punktmutation eine veränderte Transkriptionsaktivität bedingt und damit zu einem individuell unterschiedlichen Gehalt von SP-B mRNA beitragen könnte.

8 Literaturverzeichnis

1. Clements JA, Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957. 95: p. 170-172.
2. LaForce FM, Kelly WJ., Huber GL, Inactivation of Staphylococci by alveolar macrophages with preliminary observations on the importance of alveolar lining material. *Am Rev Respir Dis*, 1973. 108: p. 784-790.
3. Juers JA, Rogers RM, McCurdy JB, Cook WW, Enhancement of bacterial capacity of aveolar macrophages by human alveolar lining material. *J Clin Invest*, 1976. 58: p. 271-275.
4. O'Neill S, Lesperance E, Klass DJ, Rat lung lavage surfactant enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*, 1984. 130: p. 225-230.
5. Robertson B, Kobayashi T., Ganzuka M, Grossmann G, Li WZ, Suzuki Y, Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B. *Pediatr Res*, 1991. 30: p. 239-243.
6. Kobayashi T, Nitta K., Takahashi R, Kurashima K, Robertson B, Suzuki Y, Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *J Appl Physiol*, 1991. 71: p. 530-536.
7. Clark JC, Weaver TE, Iwamoto HS, Ikegami M, Jobe AH, Hull WM, Whitsett JA, Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 16: p. 46-52.
8. Tokieda K, Iwamoto HS, Bachurski SE, Wert SE, Hull WM, Ikeda K, Whitsett JA, Surfactant protein-B-deficient mice are susceptible to hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21: p. 463-472.
9. Tokieda K, Whitsett JA, Clark JC, Weaver TE, Ikeda K, Jobe AH, Ikegami M, Iwamoto HS, Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am J Physiol*, 1997. 273: p. L875-L882.
10. Hamvas A., Nogee LM, Mallory GB Jr, Spray TL, Huddleston CB, August A et al., Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr.*, 1997. 130: p. 231-239.

11. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR, A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*, 1994. 93: p. 1860-1863.
12. Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA, Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161: p. 973-981.
13. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T, Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*, 1980. 1: p. 55-59.
14. Hall SB, Venkitaraman AR, Whitsett JA, Holm BA, Notter RH, Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am Rev Respir Dis*, 1992. 145: p. 24-30.
15. Hafner D, Kilian U., Buhler R, Beume R, Habel R, Comparison of phospholipid-based protein-free surfactant and a natural bovine surfactant (SURVANTA) during pressure and volume-controlled ventilation in an improved rabbit fetus model. *Pulm Pharmacol*, 1993. 6: p. 15-25.
16. Eijking EP, Strayer DS, van Daal GJ, Lachmann B, Effects of anti-surfactant antibodies on the course of mild respiratory distress syndrome. *Pathobiology*, 1991. 59: p. 96-101.
17. Bohinski RJ, Di Lauro R, Whitsett JA, The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol*, 1994. 14: p. 5671-5681.
18. Yan C, Sever Z, Whitsett JA, Upstream enhancer activity in the human surfactant protein B gene is mediated by thyroid transcription factor 1. *J Biol Chem*, 1995. 270: p. 24852-24857.
19. Naltner A, Ghaffari M, Whitsett JA, Yan C, Retinoic acid stimulation of the human surfactant protein B promoter is thyroid transcription factor 1 site dependant. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 56-62.
20. Yang L, Naltner A, Kreiner A, Yan D, Cowen A, Du H, Yan C, An enhancer region determines hSP-B gene expression in bronchiolar and ATII epithelial cells in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284: p. L481-L488.
21. Yan C, Naltner A, Conkright J, Ghaffari M, Protein-protein interaction of retinoic acid receptor α and thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem*, 2001. 276: p. 21686-21691.

22. Karinch AM, Deiter G, Ballard PL, Floros J, Regulation of expression of human SP-A1 and SP-A2 genes in fetal lung explant culture. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1398: p. 192-202.
23. Dunbar AE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, Piedboeuf B, Jobin C, Guttentag S, Nogee LM, Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Ped Res*, 2000. 48: p. 275-282.
24. Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA, Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA*, 1989. 8: p. 75-86.
25. Kumar AS, Gonzales LW, Ballard PL, Transforming growth factor- β regulation of surfactant protein B gene expression is mediated by protein kinase-dependant intracellular translocation of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte nuclear factor 3. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1492: p . 45-55.
26. Kumar AS, Venkatesh V, Planer BC, Feinstein SI, Ballard PL, Phorbol ester down-regulation of lung surfactant protein B gene expression by cytoplasmic trapping of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte nuclear factor 3. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 20764-20773.
27. Yang YS, Yang MC, Wang B, Weissler JC, BR22, a novel protein, interacts with thyroid transcription factor-1 and activates the human surfactant protein B promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 24: p. 30-37.
28. Fabbro D, Tell G, Pellizzari L, Leonardi A, Pucillo C, Lonigro R, Damante G, Definition of the DNA-binding specificity of TTF-1 homeodomain by chromatographic selection of binding sequences. *Biochim Biophys Res Commun*, 1995. 213: p. 781-788.
29. Floros J, Phelps DS, deMello DE, Longmate J, Harding H, Benson B, White T, The utility of postmortem lung for RNA studies; variability and correlation of the expression of surfactant proteins in human lung. *Exp Lung Res*, 1991. 17: p. 91-104.
30. Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, Weaver TE, SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 285(3): p. L543-L549.

31. Subramaniam S, Whitsett JA, Hull W, Gairola CG, Alteration of pulmonary surfactant proteins in rats chronically exposed to cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996. 140: p. 274-280
32. Epaud R, Ikegami M, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE, Akinbi HT, Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. 28: p. 373-378.

9 Anhang

9.1 Erklärung

„Ich, Philipp Meyn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Eine Punktmutation in der 5'-flankierenden Region reduziert die Transkription des Surfactant Protein B (SP-B) Gens in H441-Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

26.05.2010

Philipp Meyn

9.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

