Aus dem Institut für Tierpathologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Expressionsanalyse, zelluläre Lokalisierung und proteinbiochemische Charakterisierung des porzinen CLCA-Homologen pCLCA4a - Unterschiede zu seinen Orthologen bei Mensch und Maus?

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tanja Grötzsch

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3581

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Friederike Stumpff
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
cystic fibrosis, animal models, pigs, mice, chloride, ion transport, messenger RNA, gene expression, protein, polymerase chain reaction, antibody testing, immunohistochemistry, immunoblotting, immunoprecipitation tests

Tag der Promotion: 29.01.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-270-0
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2013
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

2 Forschungsstand **4**

2.1 Die CLCA (*chloride channel regulators, calcium-activated)* - Familie 4

2.1.1 Proteinstruktur und Proteinprozessierung 5

2.1.2 Expressionsvielfalt der CLCA-Proteine 7

2.1.3 Funktionsdiversität der CLCA-Proteine 10

2.1.3.1 Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit der CLCA-Proteine 10

2.1.3.2 Eigenständige Chloridkanäle oder Modulatoren von Chloridkanälen? 11

2.1.3.3 Funktion als Adressine 11

2.1.3.4 Funktion als Apoptoseregulatoren 12

2.1.4 Biomedizinische Relevanz der CLCA-Proteine 13

2.1.4.1 Rolle der CLCA bei der Zystischen Fibrose 14

2.1.4.2 Rolle der CLCA beim Asthma 17

2.1.4.3 Rolle der CLCA bei der recurrent airway obstruction (RAO) des Pferdes 18

2.1.5 Die porzinen CLCA-Homologen 19

2.1.5.1 Charakterisierung der porzinen *CLCA*-Genomstruktur 19

2.1.5.2 pCLCA1 21

2.2 Bedeutung von Tiermodellen in der translationalen Forschung 22

2.2.1 Bislang verwendete Tiermodelle in der Zystische Fibrose-Forschung 23

2.2.2 Das Schweine-Modell in der Zystische Fibrose-Forschung 27

3 Material und Methoden **31**

3.1 Erstellung eines phylogenetischen Baumes 31

3.2 *In silico*-Analysen zur Vorhersage der Signalpeptidsequenz, Transmembrandomänen und Glykosylierungsstellen 31

3.3 Untersuchungsmaterial und Probengewinnung 32

3.4 Generierung spezifischer Antikörper gegen pCLCA4a 33

3.5 Probenaufbereitung für nachfolgende Untersuchungen 34
3.5.1 Paraffineinbettung und Herstellung von Gewebeschnitten 34
3.5.2 Anfertigung von Kryostatschnitten 35
3.5.3 Aufbereitung der Proben für molekularbiologische Untersuchungen 35
3.5.3.1 Allgemeine Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen 35
3.5.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA 35
3.5.3.3 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA 36
3.5.4 Herstellung von Organlysaten und Ermittlung der Proteinkonzentrationen 37
3.6 Polymerase-Kettenreaktion zum organspezifischen Nachweis von pCLCA4a auf RNA-Ebene und zur Amplifizierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a 38
3.7 Klonierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a in den Vektor pcDNA3.1(+) 41
3.7.1 Differenzierung zu pCLCA4b 47
3.8 Gewinnung von spezifischem Protein nach heterologer Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem pCLCA4a-Plasmid 48
3.8.1 Zelllyse und Gewinnung des Proteins mittels Immunopräzipitation 50
3.8.2 Gewinnung des Proteins mittels Ethanolpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand sowie Zelllyse 51
3.9 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese 52
3.10 Westernblotanalyse 53
3.11 Bestimmung des Glykosylierungsmusters 55
3.12 Laser Capture Microdissection zur Proteomanalyse 55
3.13 Immunhistochemischer Nachweis des pCLCA4a-Proteins 57
3.14 Allgemein verwendete Puffer, Lösungen und Chemikalien 59
4 Ergebnisse 62
4.1 Phylogenetische Einordnung 62
4.2 Die pCLCA4a-Proteinstruktur nach *in silico*-Analysen 63
4.2.1 Potenzielle Signalsequenzen 63
4.2.2 Potenzielle Transmembrandomänen 64

4.2.3 Potenzielle Asparagin-Glykosylierungsstellen und die mutmaßliche Spaltstelle 66

4.3 Das gewebliche mRNA-Expressionsmuster von pCLCA4a 67

4.4 Die Sequenz des Offenen Leserahmens von pCLCA4a 70

4.5 Proteinbiochemische Charakteristika von pCLCA4a 70

4.5.1 Kriterien der Antikörpergenerierung 70

4.5.2 Detektion des amino-terminalen und des carboxy-terminalen Spaltprodukts von pCLCA4a in Zelllysat und Zellkulturüberstand sowie Nachweis der posttranslationalen Spaltung 71

4.6 Die gewebliche Verteilung von pCLCA4a in den Organen des Schweins 73

4.7 Das Asparagin-Glykosylierungsmuster von pCLCA4a 77

4.8 Zelluläres Expressionsmuster des pCLCA4a-Proteins 80

5 Diskussion 85

6 Zusammenfassung 98

7 Summary 100

8 Abbildungsverzeichnis 102

9 Tabellenverzeichnis 104

10 Literaturverzeichnis 105

Publikationsverzeichnis 123

Danksagung 124

Eidesstattliche Erklärung 125

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	**Abb**ildung
AHR	(engl.: ***a**irway **h**yper**r**esponsiveness*) Atemwegshypersensitivität
APS	**A**mmonium**p**er**s**ulfat
Aqua dest.	(lat.: ***aqua dest**illata*) destilliertes Wasser
Aqua bidest.	(lat.: ***aqua bidest**illata*) zweifach destilliertes Wasser
AS	**A**mino**s**äure
ATP	**A**denosin**t**ri**p**hosphat
BAC	(engl.: ***b**acterial **a**rtificial **c**hromosome*)
BAL	**B**ronchio**a**lveoläre **L**avage
bp	**B**asen**p**aare
β-ME	**β**-**M**ercapto**e**thanol
CaMKII	(engl.: ***ca**lmodulin **m**ediated protein**k**inase **II***) Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	(engl.: ***c**yclic **a**denosine **m**ono**p**hosphate*) zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	(engl.: ***c**omplementary **d**esoxyribo**n**ucleid **a**cid*) komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	(engl.: ***c**ystic **f**ibrosis*) Zystische Fibrose
CFTR	(engl.: ***c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane conductance **r**egulator*)
CLCA	(engl.: ***ch**loride channel regulators, **c**alcium-**a**ctivated*) Kalzium-aktivierte Chloridkanal Regulatoren
COB	**C**hronisch-**o**bstruktive **B**ronchitis
COPD	(engl.: ***c**hronic **o**bstructive **p**ulmonary **d**isease*) Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
C-Terminus	Carboxy (**C**)-**Terminus**
Cys	**Cys**tein
DAB	3,3‘-**Di**amino**b**enzidintetrahydrochlorid

DEPC	**D**i**e**thyl**p**yro**c**arbonat
DIDS	4, 4‘-**Di**isothiocyanatostilbene-2, 2‘-**Di**sulfon**s**äure
DMEM	**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium
DNase	**D**esoxyribo**n**ukle**ase**
DTT	**D**i**t**hio**t**hreitol
DOC	**D**es**o**xy**c**holsäure (Natriumsalz)
EDTA	**E**thylen**d**iamin**t**etra**a**cetat
EF-1alpha (EF-1α)	**E**longations**f**aktor **1alpha**
EK	**E**nd**k**onzentration
engl.	**engl**isch
ER	**E**ndoplasmatisches **R**etikulum
rER	**r**aues **E**ndoplasmatisches **R**etikulum
et al.	(lat.: ***et al**ii*) und andere
Fa.	**F**irm**a**
FKS	**F**etales **K**älber**s**erum
x *g*	x Erdbeschleunigung (**g** = 9,81 m/s^2)
IL	**I**nter**l**eukin
in-situ	lat. für „am (Ursprungs-) Ort“
IP	**I**mmuno**p**räzipitation
LCM	(engl.: ***l**aser **c**apture **m**icrodissection*) Lasermikrodissektion
lat.	**lat**einisch
Lu-ECAM-1	(engl.: ***lu**ng-**e**ndothelial **c**ell **a**dhesion **m**olecule **1***) Lungen-Endothelzelladhäsionsmolekül-1
MHC	(engl.: ***m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex*) Haupthistokompatibilitätskomplex

mRNA	(engl.: ***m**essenger **ribo**nucleic **a**cid*) Boten-Ribonukleinsäure
N	Asparagi**n**
N-Terminus	Amino (**N**)-**Terminus**
NFA	(engl.: ***nif**lumic **a**cid*) Nifluminsäure
NPPB	5-**N**itro-2-(3-**P**henyl-**P**ropyl-Amino)-**B**enzoesäure
NTC	(engl.: ***no t**emplate **c**ontrol*) Negativkontrolle
ORF	(engl.: ***o**pen **r**eading **f**rame*) Offener Leserahmen
PAS	(engl.: ***p**eriodic **a**cid-**s**chiff*), Färbemethode zum Nachweis von Mukopolysacchariden
PBS	(engl.: ***p**hosphate **b**uffered **s**aline*) Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	(engl.: ***p**olymerase **c**hain **r**eaction*) Polymerase Kettenreaktion
PKA	**P**rotein**k**inase **A**
RAO	(engl.: ***r**ecurrent **a**irway **o**bstruction)* wiederkehrende Atemwegsobstruktion
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ***ribo**nucleic **a**cid*)
RNase	**R**ibo**n**ukle**ase**
RT-PCR	(engl.: ***r**everse **t**ranscription - **p**olymerase **c**hain **r**eaction*) Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion
SDL	(engl.: ***s**pecific **d**eterminating **l**oop)* spezifische Determinierungsschleife
SDS-PAGE	**S**odium-**D**odecyl-**S**ulfat-**P**oly**a**crylamid-**G**el**e**lektrophorese
T	**T**hymin
TEMED	N,N,N',N'-**Te**tra**me**thylethylene**d**iamine
Tm	(engl.: ***m**elting **t**emperature*) Schmelzpunkt
TM	(engl.: ***t**rade**m**ark*) Warenzeichen
TTBS	(engl.: ***t**ween containing **t**ris-**b**uffered **s**aline*) Tween-haltige, Tris-gepufferte Salzlösung

1 Einleitung

Der porzine CLCA-Vertreter pCLCA4a ist ein Mitglied der CLCA (engl.: *chloride channel regulators, calcium-activated)* - Familie, die Anfang der 1990er Jahre entdeckt wurde. Bislang ist es gelungen, 17 Mitglieder in sechs verschiedenen Spezies zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie induzieren unter anderem eine Ca^{2+}-abhängige Chloridleitfähigkeit in transient transfizierten Säugetierzellen und scheinen die Anionenströme anderer bislang unbekannter Proteine indirekt zu beeinflussen. Ebenso scheinen CLCA-Proteine in Pathomechanismen bei Krankheiten mit sekretorischen Dysfunktionen wie der Mukoviszidose (Zystische Fibrose, engl.: *cystic fibrosis*, CF) und dem Asthma involviert zu sein. Die CF ist eine tödlich verlaufende Erbkrankheit beim Menschen, bei der durch eine gestörte Chloridionensekretion die Zusammensetzung der Sekrete in den exokrinen Drüsen verändert wird. Dies führt unter anderem zu einem progressiven Lungenleiden (Riordan et al., 1989).

Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie stehen aber auch im Verdacht als Tumorsuppressoren zu funktionieren (Elble und Pauli, 2001), andere CLCA-Vertreter hingegen könnten die Adhäsion invasiver Tumorzellen vermitteln (Abdel-Ghany et al., 2001, 2002 und 2003). Das Verteilungsmuster der einzelnen Mitglieder innerhalb des Organismus ist ebenso komplex wie ihre postulierte Funktionaliät. So variiert das Expressionsmuster der CLCA-Proteine innerhalb der Homologen einer Spezies und differiert ebenfalls im Vergleich zu ihren eng verwandten Orthologen in anderen Spezies. Bezüglich der Transmembranstruktur wird die Existenz zweier strukturell unterschiedlicher Gruppen von CLCA-Proteinen postuliert. Demnach besitzt die eine Gruppe eine carboxy-terminale Transmembrandomäne, bei der lediglich der Amino (N) -Terminus partiell sezerniert wird. Bei der anderen Gruppe handelt es sich um vollständig sezernierte Proteine, die folglich keine Transmembrandomäne aufweisen (Elble et al., 2006; Gibson et al., 2005). Die Einordnung in einer dieser beiden Gruppen ist für ein weiteres Verständnis zum Funktionsmechanismus des jeweiligen CLCA-Proteins von Bedeutung. Die vielfältigen Eigenschaften der CLCA-Proteine in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen bergen eine hohe biomedizinische Relevanz und machen sie für viele Wissenschaftler zu einem interessanten Forschungsthema. Auch in dieser Arbeit werden sie Gegenstand der Analyse sein.

Jüngste Studien postulierten für den humanen pCLCA4a-Orthologen hCLCA4 eine potenzielle Modulatorfunktion bei der CF (Ritzka et al., 2004). Für den membranverankerten murinen Orthologen mCLCA6 konnte eine zelluläre Kolokalisation mit dem murinen

CFTR-Chloridkanal (engl.: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)* beschrieben werden (Bothe et al., 2008), was ebenfalls für eine Modulatorfunktion bei der phänotypischen Ausprägung der CF sprechen könnte. Interessanterweise weicht das Expressionsmuster dieser beiden eng verwandten Orthologen erheblich voneinander ab. Während hCLCA4-mRNA unter anderem signifikant im oberen Respirationstrakt exprimiert ist, fehlt seinem murinen Orthologen mCLCA6 hingegen die Expression in diesem Organsystem völlig. Lediglich im Darmtrakt sind beide Orthologe übereinstimmend vertreten (Agnel et al., 1999; Evans et al., 2004; Bothe et al., 2008). Diese speziesübergreifenden Expressionsvarianten bringen möglicherweise ebenso unterschiedliche Funktionsweisen nahe verwandter Proteine in verschiedenen Spezies mit sich. Dadurch wird die speziesübergreifende Übertragbarkeit von Daten erheblich eingeschränkt. Dies ist im Rahmen der translationalen Forschung zu beachten. Denn die Etablierung geeigneter Tiermodelle, die in der Lage sind, humane Krankheitsbilder möglichst exakt nachzuahmen, ist für diesen Forschungszweig von entscheidener Bedeutung. Mittels der bisher genutzten CF-Mausmodelle ist es nur unzureichend gelungen, die humane CF-Klinik widerzuspiegeln. Insbesondere wird der für die CF-Forschung so wichtige respiratorische CF-Phänotyp von *CFTR*-knockout-Mausmodellen nicht widergespiegelt (Elferink und Beuers, 2009). Kürzlich generierte CF-Schweine hingegen zeigen alle wichtigen humanen CF-Organveränderungen (Khansaheb et al., 2011; Rogan et al., 2010; Ostedgaard et al., 2011; Itan et al., 2011; Cho et al., 2011). Somit werden CFTR-genveränderte Schweine eventuell ein bedeutsames Tiermodell für die humane CF darstellen. Die möglicherweise größere Homologie zwischen pCLCA4a und hCLCA4 würde das Schwein als Tiermodell zur Erforschung der Rolle von CLCA-Proteinen bei der CF durchaus geeigneter erscheinen lassen als die Maus.

Innerhalb dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass ein porziner Orthologe zu hCLCA4 bzw. mCLCA6 als funktionelles Protein exprimiert wird. Aufgrund der genetisch engen Verwandtschaft zwischen den drei Orthologen bestehen bezüglich des Expressionsmusters und der proteinbiochemischen Charakteristika Ähnlichkeiten. Hypothetisiert wird weiter, dass der Mensch und das Schwein dabei viel größere Übereinstimmungen aufweisen als der Mensch und die Maus.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, für den porzinen CLCA-Vertreter pCLCA4a einerseits sein mRNA-Expressionsmuster mit Hilfe der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion zu ermitteln und andererseits nach Generierung spezifischer anti-pCLCA4a-Antikörper mittels Immunhistochemie ein gewebespezifisches Expressionsmuster des Proteins bei gesunden Schweinen zu ermitteln. Darüber hinaus wurde das Glykosylierungsmuster und der sekretorische Weg des pCLCA4a-Proteins durch die Zelle proteinbiochemisch bestimmt. Zusätzliche computergestützte Analysen sollten klären, ob pCLCA4 in die Gruppe der Ein-

Transmembran-CLCA-Proteine eingzuordnen ist oder ob es sich um ein vollständig sezerniertes Protein handelt. Die ermittelten Daten zu dem neuen Mitglied pCLCA4a wurden schließlich mit denen der bekannten humanen und murinen Orthologen verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass pCLCA4a und hCLCA4 übereinstimmende Expressionen im Respirations- und im Darmtrakt aufweisen. mCLCA6 fehlt dagegen die Expression im Respirationstrakt. Desweiteren handelt es sich bei pCLCA4a um ein posttranslational gespaltenes Protein, das mit einer Transmembrandomäne membranverankert vorliegt.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse zu pCLCA4a, das möglicherweise eine ebenso hohe biomedizinische Bedeutung im CF-Schweinemodell besitzen könnte wie sein orthologer Vertreter hCLCA4 bei der humanen CF, bieten eine solide Basis für nachfolgende Studien zur Bedeutung dieses Proteins als Modulator der Chloridleitfähigkeit im porzinen Tiermodell und erlauben möglicherweise Rückschlüsse auf die Rolle von hCLCA4 bei der humanen CF.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wird dem Leser zunächst einleitend der aktuelle Forschungsstand zum Thema nähergebracht. Auf dieser Basis werden nachfolgend die angewendeten molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden und die erzielten Ergebnisse zur Charakterisierung von pCLCA4a erläutert. Die gewonnenen Erkenntnisse werden schließlich hinsichtlich ihrer daraus resultierenden Konsequenzen diskutiert.

2 Forschungsstand

2.1 Die CLCA (*chloride channel regulators, calcium-activated)* - Familie

Anfang der 90er Jahre wurden die CLCA-Proteine entdeckt. Zwei Forschungsgruppen identifizierten unabhängig voneinander jeweils einen bovinen CLCA-Homologen. Während Ran und Benos ein ~38 kDa großes Protein (p38) mit den Eigenschaften eines epithelialen Chloridkanals aus der bovinen Trachea isolierten (Ran und Benos 1991), entdeckte die Arbeitsgruppe um Zhu ein lungenspezifisches endotheliales Zell-Adhäsion-Molekül (engl.: *lung endothelial cell adhesion molecule*, Lu-ECAM-1; Zhu et al., 1991). Cunningham und Mitarbeiter klonierten später den Chloridkanal bCLCA1 alias bCaCC aus der bovinen Trachea und sprachen ihm eine Cl^--Leitfähigkeit zu, die durch Ca^{2+} und die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (engl.: *calmodulin mediatedproteinkinase II,* CaMKII) vermittelt wird (Cunningham et al., 1995). Elble und Mitarbeitern ist es später gelungen, bCLCA2 alias Lu-ECAM-1 aus dem bovinen Aortenendothel zu klonieren und seine cDNA-Sequenz zu identifizieren (Elble et al., 1997). Erst die Sequenzvergleiche zwischen den beiden unterschiedlichen Proteinen Lu-ECAM-1 alias bCLCA2 und bCaCC alias bCLCA1 zeigten ihre hohe Sequenzhomologie (92% cDNA-Identität und 88% Aminosäuren-Identität). Die Analysen ließen vermuten, dass Endothelzellen einen Chloridkanal exprimieren, der mit dem in der Trachea verwandt ist. Elble und Kollegen spekulierten weiter, dass Adhäsionsmoleküle auch eine Chloridleitfähigkeit vermitteln können (Elble et al., 1997). Dies deutete auf die Entdeckung einer neuen, bislang unbekannten Genfamilie hin.

Verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Forschungsschwerpunkten beschäftigten sich fortan mit der neu entdeckten Genfamilie. Um die Namensgebung zu vereinheitlichen, wurde eine systematisierte Nomenklatur etabliert (Gruber et al., 2000). Die CLCA-Vertreter wurden mit dem Anfangsbuchstaben der Spezies, aus der sie kloniert worden waren, benannt (engl.: b, bovine; m, murine; h, human; p, porcine; e, equine und r, rat) und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung beziffert (Winpenny et al., 2009). Die aktuelle Nomenklatur der CLCA-Kandidaten lässt demnach bezüglich ihrer Bezifferung keine direkte Vergleichbarkeit zwischen den CLCA-Orthologen in den verschiedenen Spezies zu. So ist beispielsweise mCLCA6 der murine Orthologe zu pCLCA4a, nicht mCLCA4. Mittlerweile sind über 40 Vertreter in verschiedenen Spezies bekannt.

2.1.1 Proteinstruktur und Proteinprozessierung

Anfängliche Untersuchungen zur Transmembran (TM)-Topologie der CLCA-Proteine favorisierten ein 4-Transmembran-Modell (Cunningham et al., 1995). Nachfolgende Studien des Homologen hCLCA1 unterstützten zunächst dieses Modell (Gruber et al., 1998a). Für den zweiten humanen CLCA-Homologen wurde ein 5-TM-Modell angenommen mit einer Cystein-reichen, amino-terminalen Domäne (Gruber et al., 1999c). Gemäß der durchgeführten SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool,* SMART) - Vorhersagen widerlegten Whittaker und Hynes die bisher angenommenen TM-Modelle (Whittaker und Hynes, 2002). Ihren Analysen nach besitzen die CLCA-Mitglieder nur eine TM-Domäne nahe des Carboxy (C)-Terminus und eine zentrale, extrazelluläre von-Willebrand-A-Domäne (VWA-Domäne). Die Rolle der konservierten VWA-Domäne ist bislang unbekannt. Spekuliert wird entweder ein modulierender Einfluss auf die Funktion oder eine Mitwirkung der Domäne bei der Interaktion von Bindungspartnern (Whittaker und Hynes, 2002). Jüngere Studien postulieren zwei Strukturheterologe innerhalb der CLCA-Familie (Elble et al., 2006; Gibson et al., 2005). Zu der ersten Gruppe gehören membranverankerte Proteine mit einer TM-Domäne. Elble und Mitarbeiter führten Strukturanalysen an hCLCA2 durch, bei welchem ein carboxy-terminales, 22 AS langes, hydrophobes Segment als einzige transmembrandurchspannende Helix gilt (Elble et al., 2006). Die membranverankerte Domäne hat die Form einer α-Helix oder eines GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Ankers. Weitere Vertreter, für die ein Ein-TM-Strukturmodell angenommen wird, sind beispielsweise mCLCA5 (Braun et al., 2010) und mCLCA6 (Bothe et al., 2008). Zu der anderen Gruppe zählen Mitglieder wie hCLCA1, mCLCA3 und pCLCA1, bei denen nach Expression in humanen Zelllinien beide Spaltprodukte ins Medium sezerniert werden, demzufolge bilden diese Proteine gar keine TM-Domäne (Gibson et al., 2005; Mundhenk et al., 2006; Plog et al., 2009). Ein weiteres Charakteristikum der CLCA-Proteine ist eine konservierte Cystein-reiche Region, die im Amino (N)-Terminus gelegen ist. Die Funktion dieser Domäne ist bisher noch unbekannt. Pawlowski vermutete, dass diese Region eine Zink-Metalloprotease-Domäne beinhaltet mit einem HExxH-Motiv (Pawlowski et al., 2006). Mit Ausnahme von hCLCA2 und mCLCA5 beinhaltet die VWA-Domäne eine MIDAS (engl.: *metal ion–dependent adhesion site*). Interessanterweise wurde für hCLCA2 β_4-Integrin als potenzieller Bindungspartner identifiziert, welcher unabhängig von der MIDAS interagiert. Offensichtlich ist bei diesem Vertreter eine Konsensusregion (F(S/N)R(I/L/V)(S/T)S) innerhalb des SDL (*specificity-determining loop)* das β-Bindungsmotiv. Für mCLCA1, mCLCA5 und bCLCA2 konnten ebenfalls β_4-Integrin-Bindungssstellen identifiziert werden (Abdel-Ghany et al., 2002 und 2003). Carboxy-terminal der VWA-Region befindet sich eine weitere typische Sequenz der

CLCA-Proteine. Nach Vorhersagen der Sekundärstruktur durch die *JPRED 3 software* ist diese reich an β-Faltblattstrukturen und beinhaltet eine Fibronectin Typ III (FnIII)-Domäne (Cole et al., 2008). FnIII-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, die mit der Superfamilie der Immunglobuline interagieren. Bisher konnten hierfür allerdings noch keine Bindungspartner identifiziert werden, auch ihre Funktion ist bislang ungeklärt (zusammengefasst von Patel et al., 2009). Innerhalb der CLCA-Primärstruktur konnten zudem Phosphorylierungsstellen für die CaMKII erkannt werden (Gruber et al., 2000; Fuller et al., 1994).

Den CLCA-Familienmitgliedern sind während der Proteinprozessierung typische posttranslationale Proteinmodifikationen gemeinsam. Elble und Mitarbeiter, die hCLCA2 charakterisierten, sagten ein 943 AS langes Vorläuferprotein voraus. Charakteristisch ist eine amino-terminale Signalsequenz mit einer hydrophoben zentralen Region (Elble et al., 2006). Diese Sequenz markiert das Protein für den Transport in den Innenraum des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dort wird die Signalsequenz abgespalten. Im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) erfährt das Vorläuferprotein (~128 kDa) eine erste Modifikation in Form von Asparagin (N)-glykosidischen Verknüpfungen mit Oligosacchariden. Die CLCA-Homologe besitzen zwischen fünf und acht Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen. Eine zweite Modifizierung in Form einer posttranslationalen Spaltung um AS 680 des glykosylierten Vorläuferproteins (~141 kDa) resultiert in der Entstehung eines größeren amino-terminalen Spaltprodukts (~109 kDa) und eines kleineren carboxy-terminalen Produkts (~35 kDa), welches membranverankert bleibt (Elble et al., 2006). Für viele CLCA-Vertreter wurde das Phänomen der postranslationalen Spaltung beschrieben (Anton et al., 2005; Cunningham et al., 1995; Brouillard et al., 2005; Elble et al., 1997 und 2006; Evans et al., 2004; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 2002; Gruber et al., 1998a; Leverkoehne und Gruber, 2002; Plog et al., 2009). Interessanterweise variiert der Ort der Spaltung innerhalb der CLCA-Vertreter. So erfährt beispielsweise hCLCA2 die Spaltung erst an der Zellmembran (Elble et al., 2006), wohingegen die murinen Orthologen mCLCA5 (Braun et al., 2010), mCLCA6 (Bothe et al., 2008) und mCLCA3 (Mundhenk et al., 2006) bereits im ER gespalten werden. Offensichtlich scheint es diesbezüglich speziesspezifische Unterschiede zu geben. Huan und Mitarbeiter beobachteten bei dem murinen CLCA4-Vertreter eine interne Sequenz (LL und RxR), die das Protein ins ER leitet. Dort wird das Vorläuferprotein in ein ~90 kDa und ein ~40 kDa Fragment gespalten (Huan et al., 2008). Der präzise Mechanismus der Spaltung ist bislang noch nicht definiert, ebenso ist die Bedeutung dieser Spaltung unklar. Patel und Mitarbeiter hielten, wie auch schon Pawlowski und sein Forscherteam zuvor (Pawlowski et al., 2006), eine Beteiligung der Zink-Metalloprotease-Domäne für möglich, wodurch die CLCA-Proteine die Fähigkeit zur Autoproteolyse erhielten (Patel et al., 2009). Erst kürzlich durchgeführte Studien an mCLCA3 konnten diese Hypothese untermauern (Bothe et al., 2011). Die Spal-

tung des Vorläuferproteins war Zn^{2+}-abhängig und konnte mittels Metalloprotease-Inhibitoren aufgehoben werden. Bothe und Kollegen vermuteten für mCLCA3 sowie auch für seine humanen und porzinen Orthologen (hCLCA1 und pCLCA1) eine autoproteolytische Aktivität, die die Spaltung dieser CLCA-Vertreter zur Folge hat. Außerdem konnten sie die exakte Spaltposition für mCLCA3 zwischen AS 695 und 696 lokalisieren (Bothe et al., 2011). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei einigen CLCA-Vertretern beide Spaltprodukte ko-immunpräzipitiert werden konnten und daher miteinander assoziiert blieben. Diese enge Assoziation konnte bisher für hCLCA1 und seinen murinen Orthologen mCLCA3 bestätigt werden (Gruber et al. 1998a; Mundhenk et al., 2006). Im Fall von hCLCA2 wurde diese Ko-Immunpräzipitation jedoch nicht beobachtet (Gruber et al. 1999c). Für dieses Phänomen fehlen bisher weiterführende Untersuchungen, die die Natur und die Bedeutung dieser Assoziation aufklären.

2.1.2 Expressionsvielfalt der CLCA-Proteine

Die zelluläre und subzelluläre Gewebeexpression der CLCA-Proteine ist innerhalb einer Spezies sehr vielfältig und variiert ebenfalls innerhalb der eng verwandten CLCA-Orthologen. Zusammen mit der Proteinstruktur kann die Gewebeverteilung jedoch wichtige Hinweise auf die jeweilige Funktionalität geben. Bisherige Studien haben zum überwiegenden Teil ihre Daten auf mRNA-Ebene erhoben, aber auch auf Proteinebene wurden Aussagen zum zellulären Verteilungsmuster getroffen (siehe Referenzen in Tabelle 1). Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die bekannten humanen, murinen und porzinen CLCA-Vertreter geben und listet die dazugehörige Gewebeexpression und ihre postulierte Funktion auf. Anschließend wird im nachfolgenden Kapitel 2.1.3 ein umfassenderer Überblick über die postulierte Funktionsvielfalt der CLCA-Proteine gegeben.

Tabelle 1: Gewebeexpression mit vermuteter Funktion und Referenz der bekannten humanen, murinen und porzinen CLCA-Vertreter. Die Farben fassen jeweils die Orthologen zusammen: blau: hCLCA1 / pCLCA1 / mCLCA3; braun: hCLCA2 / pCLCA2 / mCLCA5; grau: hCLCA3 / mCLCA1/2/4; pCLCA3; grün: hCLCA4 / pCLCA4a/b / mCLCA6; mCLCA 7 und 8 sind noch nicht eindeutig zugeordnet

CLCA-Vertreter	Gewebe (zellulär / subzellulär)	Methode	Postulierte Funktion	Referenz
hCLCA1 alias hCaCC-1	Dünndarm, Dickdarmmukosa (basale Kryptenepithelzellen und Becherzellen)	*In-situ*-Hybridisierung, Northern Blot	Cl^--Leitfähigkeit Tumorsup-pressor	Gruber et al., 1998a
	Darm, Uterus, Magen, Hoden, Niere, fetale Milz	RNA Dot Blot-Hybridisierung		Agnel et al., 1999
hCLCA2 alias hCaCC	Lunge, Trachea, Brustdrüse	Northern Blot, RT-PCR	Cl^--Leitfähigkeit Tumorsup-pressor Adressin	Gruber et al., 1999c
	Trachea, Uterus, Prostata, Niere	RNA Dot Blot-Hybridisierung		Agnel et al., 1999
	Korneaepithel	qPCR		Itoh et al., 2000
	Nasenschleimhaut	RT-PCR		Mall et al., 2003
	Kornea, Haut, Larynx, Vagina, Oesophagus (basale Epithelzellen)	Immunhisto-chemie (IHC)		Connon et al., 2004
hCLCA3 (Pseudogen)	Lunge, Trachea, Brustdrüse, Milz, Thymus	RT-PCR	bislang ungeklärt	Gruber et al., 1999a
hCLCA4 alias hCaCC-2	Gehirn, Trachea, Magen, Hoden, Darmtrakt, Harnblase, Brustdrüse, Prostata, Uterus, Speicheldrüse	RNA Dot Blot-Hybridisierung	Cl^--Leitfähigkeit	Agnel et al., 1999
pCLCA1	Ileum (Kryptenepithel und Mikrovilli-epithel), Trachea (submuköse Drüsen und Epithel), Speicheldrüsen: Gl. sub-lingualis, Gl. mandibularis, Gl. parotis	RT-PCR, *In-situ*-Hybridisierung	Cl^--Leitfähigkeit	Gaspar et al., 2000; Loewen et al., 2002b
	Darmtrakt, Nasenschleimhaut, Trachea, Bronchi, Oesophagus, Lunge, Magen: Pars glandularis, Konjunktiva, Pankreas, Gl. parotis (in muzinproduzierenden Zellen)	RT-PCR, Immunoblot-ting, IHC, Westernblot (WB)		Plog et al., 2009
pCLCA2	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Plog et al., 2009
pCLCA3 (Pseudogen)	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Plog et al., 2009
pCLCA4a/b	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Plog et al., 2009
mCLCA1 alias mCaCC	Brustdrüse, respiratorische und intestinale Epithelien, Pankreas, Gallenblase, Niere, Kornea, Haut (Keratinozyten), Uterus, Nebenhoden, Spermatogonien 2. Ordnung, lymphatische Gewebe	Northern-Blot, RT-PCR, *In-situ*-Hybri-disierung	Adressin	Gruber et al., 1998b
	Milz, Knochenmark, Darm, Trachea, Gehirn, Lymphknoten	RT-PCR		Leverkoehne et al., 2002

Tabelle 1 (fortgeführt): Gewebeexpression mit vermuteter Funktion und Referenz der bekannten humanen, murinen und porzinen CLCA-Vertreter. Die Farben fassen jeweils die Orthologen zusammen: blau: hCLCA1 / pCLCA1 / mCLCA3; braun: hCLCA2 / pCLCA2 / mCLCA5; grau: hCLCA3 / mCLCA1/2/4; pCLCA3; grün: hCLCA4 / pCLCA4a/b / mCLCA6; mCLCA 7 und 8 sind noch nicht eindeutig zugeordnet

CLCA-Vertreter	Gewebe (zellulär / subzellulär)	Methode	Postulierte Funktion	Referenz
mCLCA1 alias mCaCC	Lymphknoten (Endothelzellen), Milz, Thymus (Stromazellen)	SDS-PAGE, Immunoblotting, Massenspektrometrie	Adressin	Furuya et al., 2010
mCLCA2 alias mCaCC2	Brustdrüse, Darm, Trachea, Thymus, Samenblasendrüse, Harnblase, Gallenblase, Nebenhoden, fetales Gewebe	RT-PCR		Leverkoehne et al., 2002
mCLCA1 / mCLCA2	Gl. parotis, Unterkieferspeicheldrüse (luminale Membran der Ausführungsgänge), exokrine Pankreas (Azini), Magen (Parietalzellen), Niere (proximale und distaleTubuli), Dünndarmkrypten	IHC	Cl^--Leitfähigkeit, Tumorsuppressor	Roussa et al., 2010
mCLCA3 alias Gob-5	Darm (Becherzellen), Magen, Uterus und Trachea	*In-situ*-Hybridisierung, Northern Blot	Synthese, Kondensation und Sekretion von Muzinen	Komiya et al., 1999
	Uterus (muzinöse Zellen), Magen (Nebenzellen), Respirations- und Intestinaltrakt (Bronchial- und Trachealdrüsen, Becherzellen der Krypten und der oberen Zotten)	IHC, Immunelektronenmikroskopie		Leverkoehne und Gruber, 2002
mCLCA4	Glatte Muskelzellen an großen Herzgefäßen und Lunge, Aorta, Lunge, Uterus, Harnblase, Magen, Oesophagus, Dünndarm, Kolon, Skelettmuskulatur	*In-situ*-Hybridisierung, RT-PCR	Cl^--Leitfähigkeit	Elble et al., 2002; Huan et al., 2008
mCLCA5	Auge, Milz	RT-PCR	Cl^--Leitfähigkeit, Adressin, Tumorsuppressor	Evans et al., 2004
	Keratinozyten (Körnerschicht), Thymus, Zervix, Oesophagus, Magen (Pars nonglandularis), weicher Gaumen	q-PCR, IHC, Immunelektronenmikroskopie		Braun et al., 2010
mCLCA6 und Splicevariante **mCLCA6sv** (Exon 8 und Teile von Exon 10 fehlen)	Magen, Darm, Auge, Milz, Leber	RT-PCR	Cl^--Leitfähigkeit	Evans et al., 2004
	Dünn- und Dickdarm (Microvilli von Enterozyten)	IHC, Immunoblotting		Bothe et al., 2008
mCLCA7	Darm	RT-PCR	bislang ungeklärt	Al-Jumaily et al., 2007
mCLCA8 (Pseudogen)	unbekannt			

2.1.3 Funktionsdiversität der CLCA-Proteine

2.1.3.1 Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit der CLCA-Proteine

Bereits ihr Name *chloride channel regulators, calcium-activated* suggeriert eine charakteristische Ca^{2+}-Abhängigkeit des Chloridstroms. Erste elektrophysiologische Versuche wurden an dem bovinen CLCA-Vertreter bCLCA1 durchgeführt (Ran und Benos, 1992, 1991). Später durchgeführte Studien an bCLCA1 durch Cunningham und Kollegen kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Cunningham et al., 1995). Der Offene Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) von bCLCA1 wurde in Xenopus-Eizellen und in COS-7 Zellen (Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops)* exprimiert und anschließend elektrophysiologisch untersucht. Es wurde eine Anionenselektive Leitfähigkeit von: I^-> NO^{3-}> Br^- >Cl^- mit einem auswärtsgerichteten Strom gemessen. Cunningham und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das Protein als CaMKII-aktivierter Anionenkanal wirkt (Cunningham et al., 1995). bCLCA1 verhielt sich in *Xenopus*-Eizellen sensitiv gegenüber 100 µM DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2´-stilbenedisulfonic acid) und 1 mM Dithiothreitol (DTT) und zeigte auch ohne Zugabe von Ca^{2+} eine Leitfähigkeit. Zugaben von Nifluminsäure (engl.: *niflumic acid*, NFA) und zyklischem Adenosinmonophosphat (engl.: *cyclic adenosine monophosphate,* cAMP*)* zeigten jedoch keinen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte in der Säugetierzelllinie COS-7 eine Chloridleitfähigkeit nur nach Zugabe von Ca^{2+} beobachtet werden. Diese konnte durch eine Ca^{2+}-Erhöhung mittels des Kalziumionophors Ionomycin verstärkt werden. Auch bestand hier eine Nifluminsäure-Sensitivität.

Auch bei anderen CLCA-Vertretern wurde eine zeit- und spannungsunabhängige Ca^{2+}-abhängige Chloridleitfähigkeit gemessen. Der in HEK 293-Zellen transfizierte murine Vertreter mCLCA6, der murine Orthologe zu pCLCA4a und hCLCA4, sowie mCLCA5 erzeugten in elektrophysiologischen Experimenten einen auswärtsgerichteten Chloridstrom, welcher durch das Kalziumionophor Ionomycin potenziert wurde und durch NFA inhibiert werden konnte (Evans et al., 2004). Ähnliche Experimente hatten zuvor bereits Gaspar und Mitarbeiter an pCLCA1 durchgeführt und erzielten gleiche Ergebnisse (Gaspar et al., 2000). Auch mCLCA1, der murine Homologe zu bCLCA1, Lu-ECAM-1 (bCLCA2) und hCLCA3, war gegenüber Ca^{2+} sensitiv und konnte durch DTT, DIDS, Tamoxifen und NFA gehemmt werden (Gandhi et al., 1998). Die genauen Regulationsmechanismen der CLCA-vermittelten Leitfähigkeit sind bis heute unklar.

2.1.3.2 Eigenständige Chloridkanäle oder Modulatoren von Chloridkanälen?

Für einige CLCA-Vertreter in unterschiedlichen Spezies (bCLCA1/2, hCLCA2, mCLCA1/2/6) konnte wie bereits erwähnt (siehe 2.1.3.1) mittels elektrophysiologischer Messtechniken bei Transfektion in differenten Zelllinien zweifelsfrei eine Steigerung der Chloridleitfähigkeit beobachtet werden (Cunningham et al., 1995; Elble et al., 1997; Gruber et al., 1999c; Roussa et al., 2010; Evans et al., 2004). Obwohl es sich bei den genannten CLCA-Vertretern um integrale Membranproteine handelt, wird bislang diskutiert, ob Proteine mit nur einer Transmembrandomäne in der Lage sind, Poren zur Bildung eines eigenständigen Ionenkanals auszubilden (Eggermont, 2004). Spekuliert wird daher, dass es sich bei den CLCA-Proteinen um Signalproteine handeln könnte, die als Modulatoren oder als Teilproteine eines anderen Kanals bei der Cl^--Leitfähigkeit mitwirken (Patel et al., 2009). Die Regulations- und Funktionsmechanismen im Einzelnen sind bislang noch unbekannt. Bei den CLCA-Vertretern hCLCA1 und mCLCA3 handelt es sich um vollständig sezernierte Proteine (Gibson et al. 2005; Mundhenk et al., 2006), die folglich nicht membranverankert sind. Für diese Vertreter konnte damit die Funktion als eigenständiger Kanal ausgeschlossen werden (Gibson et al., 2005; Mundhenk et al., 2006; Huan et al., 2008). Gleiches gilt für deren sezernierten porzinen Orthologen pCLCA1 (Gaspar et al., 2000; Plog et al., 2009). Der bei Hyperexpression nachweisbare auswärtsgerichtete Chloridstrom dieser drei Proteine (Gruber et al., 1998a; Hamann et al., 2009; Winpenny et al., 2009; Loewen et al., 2002a/b) dürfte daher durch die modulierende Wirkung der sezernierten Proteine auf andere Chloridkanäle zurückzuführen sein. Postuliert wird eine modulierende Wirkung auf andere Chloridkanäle, bei denen die sezernierten CLCA-Homologen möglicherweise als extra-zelluläre Signalmoleküle wirken. Die genaue Funktionsweise und die interagierenden Partner sind auch hier noch unbekannt (Hamann et al., 2009; Gibson et al., 2005).

2.1.3.3 Funktion als Adressine

Eine Voraussetzung für die organspezifische Metastasierung maligner Tumorzellarten in entfernte Organe bzw. Gewebe ist unter anderem die gezielte Interaktion der Tumorzellen mit endothelialen Adhäsionspartnern (Engers und Gabbert, 2000). Einigen CLCA-Vertretern (hCLCA2, mCLCA5, mCLCA1 und bCLCA2) wurden Eigenschaften Ca^{2+}-abhängiger Adhäsionsmoleküle zugeordnet (Abdel-Ghany et al., 2001, 2002 und 2003). Zelladhäsions-moleküle vermitteln zudem als Signalmoleküle die Interaktion zwischen benachbarten Zellen und der umgebenen Matrix und sorgen für den mechanischen Zusammenhalt von Geweben (Kohn und Liotta, 1995). Eine Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E (epithelial) - Cadherin führte zu einer Auflösung der Zellkontakte, wodurch entartete Zellen die Möglichkeit zur Migration in andere Gewebe bekamen (Deep et al., 2011). Aber auch bei

der Tumorzellanheftung spielen Adhäsionsmoleküle, besonders die endothelialen Integrine, eine entscheidende Rolle und ermöglichen durch eine Interaktion mit invasiven Tumorzellen die Entstehung von Metastasen (Heyder et al., 2005). Bei dieser Rezeptor-vermittelten Interaktion scheinen oben genannte CLCA-Vertreter involviert zu sein. Die an der Oberfläche pulmonaler Endothelzellen exprimierten CLCA-Proteine besitzen innerhalb ihrer 90- und 35 kDa Untereinheit ein funktionales β_4-Integrin-Bindingungsmotiv mit der Erkennungssequenz (F(S/N)R(I/L/V)(S/T)S). Diese β_4-Bindungsdomäne der CLCA-Proteine ist innerhalb der VWA-Domäne lokalisiert (Aquilina et al., 2002). Durch ihre Befähigung Adhäsionsmoleküle wie β_4-Integrin zu binden agieren diese Vertreter funktionell als vaskuläre Adressine. hCLCA1 hingegen besitzt ein unterbrochenes Bindungsmotiv und ist daher nicht in der Lage β_4-Integrin zu binden. Die Interaktion der beiden Bindungspartner löst eine intrazelluläre Signalkaskade in den Tumorzellen aus, die letztendlich die Zellproliferation in den Tumorzellen stimuliert (Abdel-Ghany et al., 2002). Die Forschergruppe um Abdel-Ghany identifizierte die Bindungsdomäne für β_4-Integrin innerhalb der CLCA-Proteine. Generierte monoklonale Antikörper gegen bCLCA2, hCLCA2 und β_4-Integrin konnten die CLCA-vermittelte Tumorzelladhäsion nachweislich inhibieren. Ähnliche Forschungsschwerpunkte verfolgten zuvor Elble und Mitarbeiter und erreichten den gleichen Effekt (Elble et al., 1997). bCLCA2 alias Lu-ECAM-1 verdankt seinen früheren Namen der Tatsache, dass es eine Vermittlerrolle bei der Adhäsion metastasierender Melanomzellen an das Lungenendothel einnahm. Spezifische Antikörper gegen die interagierenden Partner verhinderten diesen Prozess (Elble et al., 1997; Zhu et al., 1991).

2.1.3.4 Funktion als Apoptoseregulatoren

Einigen CLCA-Vertretern wurden regulatorische Eigenschaften bei der Apoptose zugeordnet. Lee und Mitarbeiter entdeckten einen Einfluss der CLCA-Vertreter bei der Involution der Milchdrüse (Lee et al., 1999). Während unter physiologischen Bedingungen die mCLCA1-Expression in der laktierenden Milchdrüse über mCLCA2 dominiert, konnte bei der Involution der Milchdrüse ein umgekehrtes Verhältnis beobachtet werden. Elble und Pauli untersuchten später das Verhalten von mCLCA1 und mCLCA2 in der murinen Zelllinie HC11, einer spontan immortalisierten BALB/c-Mamma-Zelllinie (Elble und Pauli, 2001). Sie konnten eine positive Korrelation zwischen der Apoptoserate und der mCLCA2-Expression beobachten. Dies unterstützte die Hypothese von Lee, der eine Hochregulation von mCLCA2 bei Apoptosevorgängen während der Involution der Milchdrüse vermutete (Lee et al., 1999). mCLCA2 fungierte scheinbar als Promoter der Apoptose und beschleunigte bei Hochregulierung die Apoptoseabläufe sowohl in HC11-Zellen als auch in Apoptose-resistenten Tumorzelllinien (JC und CSML-0) (Elble und Pauli, 2001).

Bustin und Mitarbeiter führten Expressionsstudien mit den humanen CLCA1- und CLCA2-Homologen durch und verglichen gesundes Kolonepithel mit tumorösem Kolonepithel (Bustin et al., 2001). Die Forschergruppe fand heraus, dass in normalem Kolonepithel das mRNA-Level von hCLCA1 signifikant mit der c-myc-Transkription assoziiert ist. C-myc wird durch das Protoonkogen MYC codiert und ist an der Expressionsregulation mitbeteiligt. In Tumorgewebe, in welchem die c-myc-Expression überwiegend dysreguliert ist (Dang et al., 2006), war diese Assoziation nicht zu beobachten. Bustin und Forscherkollegen stellten fest, dass beide humanen CLCA-Mitglieder signifikant um annähernd 80% in Tumorgewebe herunterreguliert waren. Bei der Transfektion von hCLCA1 bzw. hCLCA2 in drei Tumorzelllinien (T84, HT29 und Caco2) waren hCLCA1 und hCLCA2 jeweils nur noch sehr schwach detektierbar. Für beide Vertreter ist damit eine Funktion als Tumormarker denkbar (Bustin et al., 2001). Dazu zeigten andere Studien, dass in Tumorzellen des humanen Brustdrüsengewebes die übliche hCLCA2-Expression fehlte und dass eine Überexpression des hCLCA2-Proteins die Bereitschaft der Tumorzellen zur Invasion und Tumorgeneration in Nacktmäusen minderte (Gruber und Pauli, 1999b). Für hCLCA2 wurde daher eine Funktion als Tumorsuppressor postuliert. Walia und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach viraler Transduktion immortalisierter Brustzelllinien mit einem p53-codierenden Vektor die hCLCA2-Expression in den transduzierten Zellen hochreguliert war (Walia et al., 2009). p53 ist ein Protein, dass als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen induziert, die an der Zellregulation, Apoptose oder an Reparaturmechanismen beteiligt sind (El-Deiry, 2003). Das Forscherteam stellte die Hypothese auf, dass p53 das hCLCA2-Gen als Antwort auf DNA-Schäden induziert (Walia et al., 2009). Der Tumorsuppressor p53 könnte dabei an konservierte Konsensussequenzen innerhalb des hCLCA2-Promotors binden und so die hCLCA2-Expression aktivieren. Walia und Kollegen konnten eine durch hCLCA2 beschleunigte Apotoserate in Tumorzellen (BT549) beobachten. Der exakte Funktionsmechanismus der CLCA-Proteine als Tumorsuppressoren ist jedoch noch unbekannt. Walia vermutete, dass durch den CLCA-vermittelten Chloridstrom eine Elektrolytverschiebung verursacht wird, die den intrazellulären pH-Wert senkt. Das entstandene saure Milieu wirkt als apoptotischer Stimulus und leitet dadurch die Apoptose der Zelle ein (Walia et al., 2009). Auch der murine Orthologe zu hCLCA2, mCLCA5, zeigte Eigenschaften eines Tumorsuppressors und unterdrückte das Wachstum von tumorösen Brustzellen (Beckley et al., 2004).

2.1.4 Biomedizinische Relevanz der CLCA-Proteine

Die CLCA-Proteine scheinen nicht nur unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle im Organismus einzunehmen, sondern sind scheinbar ebenso bei pathologischen Prozessen, die mit einer sekretorischen Dysfunktion einhergehen, von hoher biomedizinischer

Relevanz. Zu den Krankheiten mit sekretorischen Dysfunktionen zählen die Zystische Fibrose (engl.: *cystic fibrosis*, CF), das Asthma bronchiale und die rezidivierende Atemwegsobstruktion (engl.: *recurrent airway obstruction,* RAO) beim Pferd. Nachfolgend werden diese Krankheiten kurz charakterisiert und die jeweilige Bedeutung der CLCA-Proteine erläutert.

2.1.4.1 Rolle der CLCA bei der Zystischen Fibrose

Die CF oder auch Mukoviszidose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung beim Menschen, deren Verlauf tödlich ist. Zugrunde liegt ein genetischer Defekt des *CFTR* (engl.: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) - Gens (Riordan et al., 1989). Dabei besteht die häufigste Mutation des *CFTR*-Gens in einer spezifischen Deletion von drei Basenpaaren, die ein Fehlen der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des Proteins bewirkt (Kerem et al., 1989; Matsui et al., 1998). Das *CFTR*-Gen codiert für ein integrales Membranprotein, welches funktionell einen cAMP-abhängigen Anionenkanal darstellt (Sheppard und Welsh, 1999). Das CFTR-Protein ist vorwiegend apikal in sekretorischen Epithelzellen von Lunge, Darm, Bauchspeicheldrüse, Schweißdrüsen, Leber, Niere und Geschlechtsorganen exprimiert (Riordan et al., 1989). Dort spielt der CFTR-Kanal eine fundamentale Rolle bei der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes an epithelialen Grenzflächen durch eine Chloridsekretion und Beeinflussung der Natriumabsorption (Stutts et al., 1995; Frizzell, 1995; Johnson et al., 1995). Das defekte oder zu gering exprimierte CFTR-Protein erfüllt seine Aufgabe als Chloridkanal nur noch unzureichend, was zu einer Störung des transepithelialen Chloridionentransports und somit des Wasser- und Elektrolythaushalts führt. Die insuffiziente Chloridionensekretion provoziert eine passive Rückresorption von Na^+ und H_2O, was zu einer stark erhöhten Viskosität der Sekrete führt (Boucher, 2007; Donaldson und Boucher, 2007). Konträr dazu konnten aktuelle elektrophysiologische *in vitro*-Experimente zeigen, dass in humanen respiratorischen Epithelzellen die Natriumabsorption trotz einer fehlenden bzw. eingeschränkten Chloridsekretion bei der CF nicht ansteigt (Itani et al., 2011). Neueren Studien nach ist jedoch nicht nur der Chloridionen- und Natriumionentransport beim CF-Basisdefekt gestört, sondern ebenso ist die CFTR-gesteuerte HCO_3^--Sekretion fehlerhaft. Für die normale Zusammensetzung des Mukus ist jedoch die Konzentration an Bicarbonationen gleichermaßen von Bedeutung und soll an dieser Stelle nicht außer Acht gelassen werden (Quinton, 2010; Ishiguro et al., 2012).

Die gemeinhin akzeptierte Erklärung für die Ausprägung der CF ist die „Niedrige-Volumen-Hypothese“: Das bedeutet, dass durch ein reduziertes Flüssigkeitsvolumen des Oberflächensekrets im Respirations- und Intestinaltrakt die mukoziliare Clearence beeinträchtigt ist (Matsui et al., 1998). Darüber hinaus kommt es zu einer systemischen Exokrinopathie mit einer Überproduktion von zähem Schleim, die im weiteren Verlauf zu exzessiven

Entzündungsreaktionen führt (Davies et al., 2007). Die Folge sind zystisch-fibrotische Veränderungen in zahlreichen Organen. Andersen beschrieb diesen Pathomechanismus im Pankreas und prägte damit den heute verwendeten Begriff *Zystische Fibrose* (Andersen, 1938). Die phänotypische Ausprägung der CF beim Menschen ist aufgrund des breiten Verteilungsmusters der CFTR-Kanäle im Organismus sehr vielfältig. Die häufigste und schwerwiegenste Problematik bei der humanen CF ist das progressive Lungenleiden. Dieses verursacht in höchstem Maße (95%) die hohe Morbidität und Mortalität bei den Betroffenen. Durch die stetig eingeschränkte Lungenfunktion werden langfristig sekundäre Infektionen der Lunge mit einem breiten Erregerspektrum begünstigt (*Respiratorisches-Synzytial-Virus*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia*). Die mikrobielle Kolonisation bewirkt durch ständig provozierte Entzündungsreaktionen eine irreversible Schädigung der Lungenfunktion (Davidson et al., 1995; Govan und Nelson, 1992; Oppenheimer und Esterley, 1975). Zudem können CF-Patienten Pankreatitiden, Diabetes mellitus, sekundäre biliäre Zirrhosen, Gallensteine, Obstipationen und Infertilität (bei männlichen Patienten) entwickeln (Moskowitz et al., 2008). Bei Neugeborenen ist ein Mekoniumileus charakteristisch (Rowntree und Harris, 2003). Trotz der stetig verbesserten symptomatischen Therapiemöglichkeiten nimmt diese schwere Erkrankung einen tödlichen Verlauf. Die maximale Lebenserwartung liegt bei 50 Jahren, aber gerade einmal 50 % der CF-Patienten erreichen das 18. Lebensjahr (Rowe et al., 2005).

Die Vorstellung, dass andere apikale Chloridkanäle diesen genetischen Defekt zumindest teilweise kompensieren können, scheint hier ein vielversprechender therapeuthischer Ansatz. Eine „alternative“ Chloridleitfähigkeit in CF-Epithelien wurde bereits beobachtet. Einige Studien haben gezeigt, dass eine CFTR-unabhängige, DIDS-sensitive, Ca^{2+}-aktivierte Chloridleitfähigkeit den primären CFTR-Defekt zumindest teilweise kompensieren konnte (Ritzka et al., 2004; Leverkoehne et al. 2006; Young et al., 2007). Ihre molekulare Basis ist bislang jedoch noch unbekannt (Bronsveld et al., 2000; Clarke et al., 1994; Eggermont, 2004). In der Vergangenheit wurden bereits die CLCA-Proteine als Modulatoren der Chloridsekretion diskutiert. Sie scheinen sowohl die endogene Ca^{2+}-aktivierte Chloridleitfähigkeit als auch die cAMP-aktivierte Chloridleitfähigkeit benachbarter Ionenkanäle zu beeinflussen (Loewen et al., 2002b und 2004; Hamann et al., 2009). Für hCLCA1 konnte eine Überexpression in der Bronchialschleimhaut von CF-Patienten bereits nachgewiesen werden (Hauber et al., 2004). Parallel zum Anstieg des hCLCA1-mRNA-Levels stieg die Expression des IL-9-Rezeptors und der PAS (engl.: *periodic acid-schiff)* - positiven schleimproduzierenden Epithelzellen an. Ritzka und Mitarbeitern ist es gelungen die Hypothese zu untermauern, dass die *CLCA*-Genfamilie tatsächlich eine alternative Chloridleitfähigkeit bei der CF hervorrufen kann (Ritzka et al., 2004). Mittels DNA-Mikrosatelliten identifizierten sie den

humanen *CLCA*-Genort mit einem überlappenden Expressionsmuster des *hCFTR*-Genorts. Dieser codiert für einen CFTR-unabhängigen residualen Mediator der Chloridleitfähigkeit in gastrointestinalen Epithelien bei CF-Patienten. Zur Erforschung der Rolle der CLCA bei der CF verglichen Leverkoehne und ihr Forscherteam das CLCA-mRNA-Level bei CF-Mausmodellen mit dem bei Wildtyp-Mäusen (Leverkoehne et al., 2006). Bei den *CFTR*-Genveränderten Tieren konnte eine deutliche Überexpression von mCLCA2 und mCLCA3 verzeichnet werden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg von mCLCA3-exprimierenden Becherzellen bei den CF-Mäusen beobachtet. Leverkoehne und Mitarbeiter vermuteten, dass die Überexpression von mCLCA3 durch die Becherzellhyperplasie bedingt und nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen sei. Für beide Vertreter wurde eine modulierende Rolle bei der CF postuliert (Leverkoehne et al., 2006; Young et al., 2007). Leverkoehne und Gruber nahmen bereits für mCLCA3, das in muzinproduzierenden Becherzellen lokalisiert ist, eine regulatorische Wirkung bei der Mukusproduktion an (Leverkoehne und Gruber, 2002). Vorangegangene Studien bestätigten den modulierenden Effekt dieses CLCA-Vertreters: In BALB/c-Mäusen mit einer hohen mCLCA3-Expression war der Lungenphänotyp weit weniger stark ausgeprägt als bei C57BL/6-Mäusstämmen mit einem niedrigeren mCLCA3-Level (Chung et al., 2001). Konträre Studien zeigten jedoch, dass die mCLCA3-Expression auf Proteinebene im Kolonepithel bei *cftr−/−*Mäusen reduziert ist. Brouillard vermutete daher, dass die CLCA-Expression CFTR-abhängig ist (Brouillard et al., 2005). Ähnliche Entdeckungen machten Young und Kollegen (Young et al., 2007), die eine reduzierte mCLCA3-Expression im intestinalen Epithel bei CF-Mäusen trotz angestiegender Becherzellzahl feststellten. Für den Maushomologen mCLCA6, der große Sequenzhomologien zu pCLCA4a und pCLCA4b besitzt, konnte eine Kolokalisation mit den murinen CFTR-Kanälen im Kryptenepithel des Kolons beschrieben werden. Dies könnte auch für diesen Vertreter eine direkte oder indirekte Rolle beim transepithelialen Chloridtransport bedeuten. Damit könnte dieser Vertreter ebenfalls eine Modulatorfunktion beim gestörten Ionentransport der CF einnehmen (Bothe et al., 2008).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die CLCA-Mitglieder, insbesondere hCLCA1 und mCLCA3, durchaus als aussichtsreiche Kandidaten für die Aktivierung der „alternativen“ Chloridleitfähigkeit bei der CF in Betracht kommen. Ebenso wurde für den humanen Orthologen zu pCLCA4a und pCLCA4b, hCLCA4, eine Modulatorfunktion bei der CF bereits vermutet (Ritzka et al., 2004). Die Rolle der porzinen CLCA bei der CF ist jedoch bislang noch gänzlich unerforscht.

2.1.4.2 Rolle der CLCA beim Asthma

Das Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, welche sowohl beim Menschen als auch bei Kleintieren auftritt. Die durch eine bronchiale Hyperreaktivität hervorgerufene Entzündungsreaktion geht mit einer vermehrten Mukusproduktion und Bronchokonstriktion einher und führt symptomatisch zu einer akuten Atemnot mit einem charakteristischen expiratorischen Stridor (Busse und Lemanske, 2001). Die komplexe Immunpathogenese des Asthma bronchiale ist bisher noch nicht gänzlich erforscht. Bislang hielt man eine Dysregulation zwischen Typ1- und Typ2-T-Helferzellen (TH1-Zellen und TH2-Zellen), mit einer Prädominanz der TH2-Zellen für hauptverantwortlich. Diese verursachen, ausgelöst durch ihre Entzündungsmediatoren (Zytokinmuster: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und Lymphotoxin-α), die überschießende Immunantwort beim Asthma (Busse und Lemanske 2001; Patel et al, 2009; zusammengefasst von Loewen und Forsyth, 2005). Das Forscherteam um Akbari identifizierte in den Lungen von Asthmapatienten jedoch neben den TH2-Zellen eine überwiegende Anzahl einer neuen Subpopulation der T-Zellen, die invarianten Natürlichen-Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen; Akbari et al., 2006). Diese Zellen exprimieren einen konservierten (invarianten) T-Zell-Rezeptor, der durch Bindung an ein MHC-ähnliches Molekül (engl.: *major histocompatibility complex,* MHC) in der Lage ist eine Allergen-induzierte Atemwegshypersensitivität (engl.: *airway hyperresponsiveness*, AHR) auszulösen.

Einige CLCA-Proteine scheinen ebenso in die Pathogenese des Asthma involviert zu sein. Hierfür ist jedoch die TH2-Antwort ausschlaggebend. Zhou und sein Forscherteam experimentierten mit IL-9-transgenen Mäusen und stellten fest, dass die TH2-Antwort offenbar die mCLCA3-Expression induziert. Ebenso konnte für den humanen Orthologen hCLCA1 eine vermehrte Expression beim humanen Asthma festgestellt werden (Zhou et al., 2001). Hoshino und Mitarbeiter bekräftigten diese Annahme und beobachteten eine Überexpression des *MUC5AC*-Gens und eine vermehrte Mukusproduktion nach *in vitro*-Transfektion von hCLCA1 in NCI-H292-Zellen (mucoepidermoide Karzinom-Zelllinie in der humanen Lunge; Hoshino et al., 2002). Die genaue Funktionsweise der CLCA bei der AHR und der Mukusproduktion ist noch ungeklärt. Anscheinend aktiviert IL-13 den Ca^{2+}-induzierten Ionenstrom bei den beiden Orthologen (Atherton et al., 2003; Danahay et al., 2002). Die Expression von hCLCA1 und seinem murinen Orthologen mCLCA3 in muzinproduzierenden Zellen des Respirations- und Intestinaltraktes lässt bereits einen Zusammenhang dieser Kandidaten mit der Mukusproduktion vermuten (Gruber et al., 1998a; Leverkoehne und Gruber, 2002). Loewen und Forsyth vermuteten eine potenzielle Rolle der überexprimierten CLCA-Proteine (hCLCA1 und mCLCA3) bei der Mukuskondensation (Loewen und Forsyth, 2005). Für diese ist ein saures Milieu nötig, welches durch eine H^+-Adenosintriphosphat (ATP)ase gewährleistet ist (Espinosa et al., 2002). Loewen und Forsyth spekulierten, dass zur Aufrecht-

erhaltung der Elektroneutralität parallel dazu ein auswärtsgerichteter Cl^--Strom durch mCLCA3 induziert wird (zusammengefasst von Loewen und Forsyth, 2005). Möglich scheint ebenso eine Rolle der CLCA als Promotoren der Rehydrierung kondensierten Mukus. Später fanden Patel und sein Forscherteam heraus, dass mCLCA3 bei der Expression in respiratorischem Epithel eine Becherzellhyperplasie hervorruft, aber nicht die AHR induziert. Interessanterweise wurde dieses Phänomen auch bei *mClca3*-knockout-Mäusen beobachtet, bei denen ein weiteres CLCA-Familienmitglied, mCLCA5, identifiziert werden konnte, welches stellvertretend für mCLCA3 eine Becherzellhyperplasie hervorrufen konnte (Patel et al., 2006). Von medizinischer Bedeutung könnte die Tatsache sein, dass die CLCA-Expression im respiratorischen Epithel bei Asthmapatienten stark ansteigt und beide Spaltprodukte der sezernierten CLCA-Proteine im Mukus der Bronchoalveolären Lavage (BAL) detektierbar sind. Patel sieht damit für hCLCA1 eine Rolle als Biomarker (Patel et al., 2009). Des Weiteren konnten Zhou und Mitarbeiter die Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion durch den Anionenkanalblocker NFA blockieren, somit ist für die CLCA auch ein therapeutisches Potenzial erkennbar (Zhou et al., 2002).

2.1.4.3 Rolle der CLCA bei der recurrent airway obstruction (RAO) des Pferdes

Bei der RAO oder auch chronisch-obstruktiven Bronchitis (COB) handelt es sich um eine equine Lungenerkrankung, welche dem humanen Asthma sehr ähnlich ist, sich aber von der humanen irreversiblen chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (engl.: *chronic obstructive pulmonary disease,* COPD*)* unterscheidet (Robinson, 2001). Im Vordergrund steht bei diesem Krankheitsbild eine reversible Hypersensitivitätsreaktion, die, ausgelöst durch verschiedene inhalierte Allergene in der Umgebung der Pferde, eine ausgeprägte respiratorische Insuffizienz erzeugt (Clarke, 1987). Ähnlich wie beim Asthma werden eine übersteigerte Entzündungsreaktion in Verbindung mit einer Becherzellmetaplasie mit vermehrter Schleimproduktion und eine Bronchokonstriktion beobachtet (Davis und Rush, 2002). Der genaue immunpathologische Werdegang ist auch bei dieser Erkrankung wie beim Asthma noch nicht hinreichend aufgeklärt. Studien haben aber gezeigt, dass es, vergleichbar mit dem humanen Asthma, zu einer ungehemmten TH2-Immunantwort kommt (Leguillette, 2003). Damit stellt die RAO beim Pferd ein geeignetes Forschungsmodell für das humane Asthma dar.

Auch in dieses Krankheitsgeschehen sind CLCA-Proteine involviert. Eine entsprechende Mitbeteiligung konnte dem ersten untersuchten equinen CLCA-Vertreter zugeordnet werden: eCLCA1, der sezernierte Orthologe zum murinen mCLCA3 und humanen hCLCA1, ist hauptsächlich in muzinproduzierenden Zellen lokalisiert (Anton et al., 2005). Anton und Mitarbeiter konnten eine Überexpression von eCLCA1 bei Pferden mit RAO feststellen. Nachfolgende

Studien zeigten später, dass diese Überexpression primär mit der Zunahme der eCLCA1 exprimierenden Becherzellen zusammenhängt und nicht durch eine transkriptionelle Heraufregulation bedingt ist (Range et al., 2007). Die Untersuchungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen der eCLCA1-Expression in Becherzellen von gesunden und RAO erkrankten Pferden. Dies spricht gegen die Hypothese einer primär regulatorischen Wirkung der CLCA auf die Becherzellmetaplasie, wie sie von Nakanishi und Mitarbeitern zuvor angenommen wurde (Nakanishi et al., 2001).

2.1.5 Die porzinen CLCA-Homologen

2.1.5.1 Charakterisierung der porzinen *CLCA*-Genomstruktur

Plog und Mitarbeiter haben die porzinen *CLCA*-Genorte in einer Studie umfassend beschrieben (Plog et al., 2009). Die Genomstrukturen der *CLCA*-Gene in Säugetieren sind in der DNA-Datenbank GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) archiviert. Es wurden geeignete BAC (engl.: *bacterial artificial chromosome*) - Klone ausgewählt, um die porzinen *CLCA*-Gene abzudecken. So konnte ein theoretischer Vergleich zwischen den porzinen und humanen *CLCA*-Genorten angestellt werden. Nach Abgleich mit dem humanen *CLCA*-Genort, welcher auf Chromosom 1p22.31 lokalisiert ist (Gruber et al., 1998a), konnte der porzine *CLCA*-Genlocus mit den porzinen BAC-Sequenzen auf Chromosome 4q25 ermittelt werden. Anschließend konnten die entsprechenden BAC auf dem porzinen Genom durch die *pig fingerprint contig map* (www.ensembl.org) lokalisiert werden. Vier BAC-Klone (CH242-32G22, CH242-148M17, CH242-252F2, CH242-483E7) einschließlich der flankierenden Gene *ODF2L* und *SH3GLB1* decken den porzinen *CLCA*-Genort mit insgesamt 315 kb Sequenzlänge ab. In der GenBank sind die vier BAC-Klone unter den Schlüsselnummern CU695058, CU694822, CU695038 und CU469041 aufgelistet. Die Struktur des *CLCA*-Genlocus mit den entsprechenden BAC wurde durch das CHORI *BACPAC resources center* (http://bacpac.chori.org/) katalogisiert. Eine Sequenzanalyse erfolgte durch das Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK). Die ermittelten porzinen mRNA-Sequenzen wurden durch einen Vergleich mit den porzinen BAC und mRNA-Sequenzen anderer Spezies, unter Berücksichtigung der Exon-Intron-Struktur in den verschiedenen Spezies und potenzieller Splicestellen innerhalb der BACs, mittels des Sequenzanalyse-Programms *BioEdit* (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) abgeleitet. Die korrespondierenden Proteinsequenzen konnten durch *in silico*-Translationen der mRNA-Sequenzen abgeleitet werden. Die *CLCA*-Gene wurden durch einen Vergleich von mRNA-Sequenzen verschiedener Säugetiere (Schwein, Mensch, Rind, Maus und Hund) mit den porzinen BAC auf der Contig-Karte lokalisiert. Für das Schwein konnten dadurch fünf *CLCA*-Gene identifiziert werden: *pCLCA1*

(ortholog zu *mClca3* und *hCLCA1*), *pCLCA2* (ortholog zu *mClca5* und *hCLCA2*), *pCLCA3* (ortholog zu *mClca1/2/4* und *hCLCA3*) *pCLCA4a* und *pCLCA4b* (ortholog zu *mClca6* und *hCLCA4*). Interessanterweise existieren bei der Maus acht CLCA-Homologe. Ritzka und Kollegen postulierten innerhalb der CLCA-Familienmitglieder bereits die Existenz spezies-spezifischer Unterschiede zu ihren direkten Orthologen (Ritzka et al., 2003). Plog und Mitarbeiter stellten eine Genduplikatur des vierten porzinen Vertreters *pCLCA4* in *pCLCA4a* und *pCLCA4b* fest, die weder bei seinem humanen Orthologen *hCLCA4* (Agnel et al., 1999) noch bei seinem murinen Orthologen *mClca*6 (Evans et al., 2004; Bothe et al., 2008) vorkommt und daher beim Schwein einzigartig ist. Beide *pCLCA4*-Genvarianten scheinen für ein funktionales Protein zu codieren. Ob diese Mutation der Gen-Kopie evolutionär bedingt ist und möglicherweise funktionelle Differenzen in sich birgt, bleibt zu untersuchen. Für den murinen Orthologen zu pCLCA4, mCLCA6*,* haben Evans und Kollegen interessanterweise eine funktionelle mCLCA6-Splicevariante beschrieben (Evans et al., 2004). Diese codiert für ein Protein, welches im Magen und Darm exprimiert wird. Nach Sequenzanalysen unterscheidet sich diese mCLCA6-Splicevariante von der mCLCA6-Wildtypvariante durch ein Fehlen von Exon 8 und Teilen des Exons 10. Dies hat einen Frameshift innerhalb des offenen Leserahmens zur Folge, wodurch eine neue Sequenz des Exons 9 generiert wird, Exon 9a. Dennoch zeigte diese neue Splicevariante ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wie sein wildtypischer Gegenpart. Bislang ist unklar ob und in welcher Hinsicht sich die mCLCA6-Splicevariante funktionell vom mCLCA6-Wildtyp unterscheidet (Evans et al., 2004). Zudem entdeckten Plog und Mitarbeiter eine Deletion von Exon 14 innerhalb des *pCLCA3*-Gens. Daraus resultieren mehrere Stoppcodons im offenen Leserahmen von pCLCA3, wodurch ein vorzeitiger Translationsabbruch bewirkt wird. Plog und Kollegen vermuteten daher für diesen Vertreter die Existenz eines Pseudogens, was ebenfalls auf seinen humanen Orthologen hCLCA3 zutrifft (Gruber und Pauli, 1999a). Die korrespondierenden murinen Orthologen *mClca1/2/4* wiederum stellen keine Pseudogene dar und codieren für funktionale Proteine (Leverkoehne et al., 2002). Die pCLCA1-BAC-Sequenz weist im Vergleich zu der veröffentlichten pCLCA1 mRNA-Sequenz (GenBank Schlüsselnummer NM_214148) zwei fehlende AS an den Positionen 525 und 526 auf (Loewen et al., 2004). Nach Klonierung und Seqenzierung des klonierten Produktes konnte die Verkürzung bestätigt werden. Plog und Forscherkollegen halten eine allelische Variation für möglich, die in vorangegangenen Studien für die Orthologen hCLCA1 und eCLCA1 ebenfalls vermutet wurde (Kamada et al., 2004; Anton et al., 2005; zusammengefasst von Plog et al., 2009).

2.1.5.2 pCLCA1

Beim Schwein sind fünf CLCA-Homologe identifiziert worden, von denen der vierte Vertreter pCLCA4 genetisch dupliziert vorliegt (Plog et al., 2009). Bisher ist nur der erste Vertreter pCLCA1 umfassend charakterisiert worden (Plog et al., 2009; Gaspar et al., 2000). Gaspar und Mitarbeiter klonierten 2000 diesen Vertreter mit Hilfe der von Gabriel 1992 generierten monoklonalen Antikörper zur Identifizierung spezifischer Proteine, die im Bürstensaum des Ileums eine Cl^--Leitfähigkeit induzieren (Gaspar et al., 2000; Gabriel et al., 1992). Durch ein Screening der porzinen intestinalen cDNA-Bibliothek konnte die vollständige 3,1 kb Nukleotidsequenz von pCLCA1 identifiziert werden. Weiter konnte eine signifikante Homologie zu mCLCA3 und hCLCA1 festgestellt werden. Anders als beim hCLCA1- und mCLCA3-Genprodukt besitzt pCLCA1 jedoch ein A-Kinase-Bindungsmotiv, welches bisher bei keinem anderen CLCA-Vertreter entdeckt wurde. Eine weitere Besonderheit ist, dass pCLCA1 als einziger CLCA-Vertreter gegenüber DIDS und DTT nicht sensibel ist. Die *in-situ*-Expression (*in-situ*: lat. für „am (Ursprungs-) Ort“) von pCLCA1 in murinen 3T3-Zellen (*3-day transfer, inoculum 3 x 10^5 cells;* Embryofibroblasten-Zellinie aus der Swiss Albino Maus) induzierte einen Ionomycin-abhängigen Chloridstrom in diesen Zellen (Gaspar et al., 2000). Studien an pCLCA1-transfizierten NIH (*National Institutes of Health*) - 3T3-Zellen gelangten zunächst zu der Annahme, dass der Anionenleitwert in das Zytoplasma erhöht wird oder dass die endogen verfügbare Chloridleitfähigkeit aktiviert wird. In den transfizierten Fibroblasten bewirkte die Aktivierung der A-Kinase keine Steigerung der Chloridströme (Loewen et al., 2002a). Loewen und Mitarbeiter transfizierten später pCLCA1 in humane Caco-2-Zellen. Diese kultivierten Zelllinien eines Dickdarm-Karzinoms besitzen eine endogene cAMP-abhängige Chloridleitfähigkeit, die mit einem hohen Anteil an CFTR-Kanälen assoziiert ist. Die Expression des pCLCA1-Proteins führte zu einem messbaren Anstieg des endogenen cAMP-sensitiven Chlorideffluxes. Loewen vermutete, dass möglicherweise spezielle akzessorische Proteine für die cAMP-Ansprechbarkeit notwendig sind, die in Fibroblasten unterexprimiert sind. Die Forschergruppe stellte die Hypothese auf, dass pCLCA1 als regulatorisches Protein agiert, welches durch Interaktion mit CLC-, CFTR-, oder ORCC-Kanälen eine Verstärkung der Chloridleitfähigkeit bewirkt (Loewen et al., 2002b). Zelluläre Expressionsanalysen detektierten diesen Vertreter in muzinproduzierenden Zellen in fast allen Organen (Plog et al., 2009; Gaspar et al., 2000; Loewen et al., 2002b). Auch sein muriner Orthologe mCLCA3 wurde in Becherzellen des Intestinaltraktes, Respirationstraktes und im Uterus nachgewiesen (Komiya et al. 1999; Leverkoehne und Gruber, 2002). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Orthologen ist, dass beide Spaltprodukte des Proteins im Medium transfizierter Zellen detektiert werden konnten. Demnach wird pCLCA1, konform mit

seinen Orthologen hCLCA1 und mCLCA3, vollständig sezerniert (Plog et al., 2009; Gibson et al., 2005; Mundhenk et al., 2006).

2.2 Bedeutung von Tiermodellen in der translationalen Forschung

Den enormen Wissenszuwachs in der Grundlagenforschung mittels geeigneter Strategien klinisch anwendbar und damit für die Menschheit profitabel zu machen, ist für die Wissenschaft von zentraler Bedeutung. Dieses Ziel verfolgt die translationale Forschung. Sie stellt somit die Schnittstelle zwischen präklinischer Forschung und der klinischen Anwendung dar (Goldblatt und Lee, 2009; Chaber et al., 1998). Die translationale Medizin beschäftigt sich mit der Übersetzung bzw. Übertragung von Modellen für die Anwendbarkeit beim Menschen. Dafür bedient sich diese Wissenschaft je nach Fragestellung *in vitro* (lat. für „im Glas“, außerhalb des Organismus) - Modellen bzw. Modellorganismen. Das wesentliche Ziel dieses Forschungsgebietes ist es ein möglichst vollständiges Bild über komplexe Vorgänge und Interaktionen im menschlichen Körper zu bekommen. Es sollen allgemeingültige und auf andere Organismen, inklusive den Menschen, übertragbare Erkenntnisse erzielt werden (Suzuki et al., 2009). Dies ist die Voraussetzung, um Pathomechanismen bei Krankheiten wie der CF zu verstehen und entsprechende therapeutische Strategien entwickeln zu können. Geeignete Modellorganismen für die Evaluierung der Wirksamkeit und Sicherheit neuer Medikamente bzw. therapeutischer Konzepte sind zweifellos von entscheidender Bedeutung für den Erfolg translationaler Forschung (Aigner et al., 2010). Die Wahl geeigneter Modelle ist vor allem von der biologischen Fragestellung abhängig. Aber auch eine kostengünstige und unkomplizierte Haltung sowie eine unkomplizierte Züchtung sind wesentliche Faktoren bei der Wahl eines geeigneten Organismus. In der biomedizinischen Forschung werden vorzugsweise Tiermodelle genutzt, die in der Lage sind, spontan oder nach genetischer Modifizierung eine bestimmte humane Erkrankung zu entwickeln und deren Phänotyp möglichst exakt widerzuspiegeln (Sive, 2011; Racay, 2002). Genetisch modifizierte Tiere bedeutet entweder transgene Organismen, bei denen ein oder mehrere Gene aus anderen Spezies in das wirtseigene Genom eingeschleust wurden, oder knockout-Tiere, bei denen ein oder mehrere Gene stillgelegt wurden. Als gezielte Genmodifikation oder auch Gentargeting (engl.: *gene targeting*) wird das gentechnische Verfahren bezeichnet, bei dem mittels homologer Rekombination gezielt Gene modifiziert werden (Thomas und Capecchi, 1987). Tiermodelle sollen so die Möglichkeit bieten den Pathomechanismus einer Krankheit in einem komplexen Organismus zu untersuchen und bieten dadurch ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Körper. So sollen zielgerichtete und wirkungsvolle Strategien entwickelt werden können. Eine größtmögliche Homologie zwischen dem Tiermodell und dem Menschen ist von

höchster Wichtigkeit. Obwohl Tiermodelle ein unschätzbares Instrument für die translationale Forschung darstellen (Racay, 2002; Houdebine, 2007), muss einschränkend erwähnt werden, dass es Tiermodellen nicht immer gelingt die phänotypischen Ausprägungen einer humanen Krankheit und deren Pathomechanismen exakt widerzuspiegeln. Meist ist dies nur annähernd möglich. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen und deren Nutzen für den Menschen müssen daher kritisch hinterfragt werden. Ebenso ist der Gebrauch tierexperimenteller Studien ethisch umstritten.

Nagermodelle sind bisher in der translationalen Forschung am weitesten verbreitet, da sie im Hinblick auf den genetischen Hintergrund mittels etablierter Technologien je nach Fragestellung mittlerweile unkompliziert genetisch standardisiert werden können. Aufgrund ihrer geringen Größe und Lebenserwartung, aber auch aufgrund teils großer anatomischer und physiologischer Unterschiede im Vergleich zum Menschen sind Nagermodelle allein für die translationale Medizin jedoch nicht ausreichend.

2.2.1 Bislang verwendete Tiermodelle in der Zystische Fibrose-Forschung

Auch für die CF-Forschung sind Tiermodelle essentiell (Scholte et al., 2004). Natürlicherweise gibt es kein Tier, das den *CFTR*-Gendefekt besitzt bzw. den CF-Phänotyp spontan ausbildet (Glavac et al., 2000). Bislang sind daher vorwiegend genmodifizierte Mäuse für die Erforschung der komplexen Pathogenese und der Entwicklung therapeutischer Strategien bei der CF eingesetzt worden. Das erste *CFTR*-knockout-Mausmodell wurde bereits 1992 generiert (Snouwaert et al., 1992). Inzwischen sind verschiedene CF-Mausmodelle hergestellt worden, die sich hinsichtlich ihrer Genmutationen und ihres Phänotyps unterscheiden (Dorin et al., 1992a; Ratcliff et al., 1993; O´Neal et al., 1993). Anfängliche Genmanipulationen verfolgten das Ziel, mittels *gene targeting* durch Deletionen bzw. Einfügen eines Stop-Kodons in das *CFTR*-Gen eine fehlerhafte Proteinprozessierung zu provozieren bzw. die Genexpression zu unterbinden. Durch diese Art der Genmanipulation wurden *CFTR*-knockout-Mausmodelle erzeugt, bei denen jegliche CFTR-Funktion fehlte. Ein weiterer Forschungsansatz war es mittels insertionaler Strategien eine Residualfunktion des CFTR-Kanals zu provozieren (Dorin et al., 1992b; O´Neal et al., 1993). Später ist es gelungen spezifische CF-typische CFTR-Mutationen, wie die ΔF508- und die G551D-Mutation, im Mäusemodell zu generieren (Van Doorninck et al., 1995; Colledge et al., 1995; Delaney et al., 1996). Beides sind Mutationen im *CFTR*-Gen, die zu den häufgsten Ursachen für den Basisdefekt der CF beim Menschen zählen. So sollte die Vergleichbarkeit des Modells mit dem menschlichen Defekt noch mehr verbessert werden. Diese Modelle zeigten die

bioelektrischen Charakteristika der humanen CF und deren mutationsspezifischen CF-Phänotypen im lebenden Modellorganismus (Davidson und Dorin, 2001). So stellten diese Mausmutanten zunächst scheinbar gut geeignete *in vivo* (lat. für „im Lebendigen“) - Modelle für die präklinisch relevante CF-Forschung dar (Scholte et al., 2004). Trotz der ausgereiften Technologien zur Erzeugung verschiedener CF-Mausmodelle ist es bislang jedoch nicht gelungen den CF-Phänotyp in seiner Komplexizität gänzlich durch Mausmodelle nachzuahmen. Erste knockout-Mausmodelle scheiterten an einer hohen Letalität in den ersten Lebensmonaten, die durch intestinale Obstruktionen verursacht wurde (Snouwaert et al., 1992; Ratcliff et al., 1993; O´Neal et al., 1993). Betrachtet man die intestinale Pathophysiologie bei der CF-Maus, können große Übereinstimmungen mit ihrem humanen Gegenpart festgestellt werden. Auch bei der Maus kommt es zur Becherzellhyperplasie mit einer Mukusüberproduktion und zu einem gestörten Ionentransport (Grubb und Boucher, 1999). Isoliert betrachtet ließe dies die Maus tatsächlich als geeignetes Forschungsmodell für die CF erscheinen.

Wie jedoch bereits in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben, stellt die CF-Manifestation im Respirationstrakt des Menschen das Hauptproblem für die überaus hohe Mortalität und Morbidität bei den Betroffenen dar (Oppenheimer und Esterley, 1975). Hier liegt die größte Unzulänglichkeit des CF-Mausmodells, denn im gesamten humanen CF-Respirationsepithel ist eine reduzierte bzw. fehlende cAMP-abhängige Cl^--Sekretion und eine daraus folgende übersteigerte Na^+-Absorption mittels epithelialer Natriumkanäle (ENaC) vorherrschend und primär für die gravierende Lungensymptomatik verantwortlich (Knowles et al., 1981 und 1983). Die Lunge unterliegt sekundär einer mikrobiellen Besiedlung mit einem breiten Erregerspektrum, welches schwerwiegende Entzündungsreaktionen bei den betroffenen Patienten provoziert (Govan und Nelson, 1992).

Diese Charakteristika zeigt die CF-Maus nur bedingt. Offensichtlich gibt es bei den verschiedensten CF-Mäusen einen Unterschied im Ionentransport zwischen dem oberen Atmungstrakt (Nasenschleimhaut) und dem unteren Atmungstrakt (Trachea und Bronchi). Während im Epithel der Nasenschleimhaut ein ähnlicher Pathomechanismus wie beim Menschen beobachtet werden konnte, besteht im unteren Respirationstrakt dieser Zusammenhang nicht. Die Na^+-Absorption scheint hier zu fehlen. Außerdem fehlen die submukösen Drüsen im unteren Respirationstrakt, die bei der CF an der fehlgesteuerten Mukusproduktion beteiligt sind (Engelhardt et al., 1992). Weiter wird spekuliert, dass im unteren murinen Respirationsepithel eine ausgeprägte „alternative“ Chloridleitfähigkeit den CFTR-Defekt zu kompensieren scheint (Grubb und Boucher, 1999). Überdies bildet das Mausmodell keine adäquate Antwort auf die mikrobielle Besiedlung aus, wie sie bei den CF-Patienten beobachtet wird (Scholte et al., 2004). Insgesamt betrachtet bildet die CF-Maus dadurch nur eine sehr

geringe bis fehlende CF-Problematik im Respirationstrakt aus, was die Maus als CF-Tiermodell sehr fragwürdig erscheinen lässt.

Ebenfalls konnte die exokrine Pankreasinsuffizienz, die bei vielen CF-Patienten ein großes Problem darstellt, bei den meisten Mausmodellen nur unzureichend nachempfunden werden. Das Pankreas zeigte im Mausmodell hinsichtlich der Enzymaktivität und der Entwicklung im heranreifenden Organismus signifikante Unterschiede zum Menschen (Ip et al., 1996). Obwohl CFTR-Kanäle sowohl in der Leber als auch in einem noch höheren Level in der Gallenblase bei der Maus exprimiert werden (Peters et al., 1997), zeigt das murine CF-Modell keine wesentlichen Symptome in diesen Organen im Vergleich zum humanen Phänotyp (Grubb und Boucher, 1999). Ein weiteres Phänomen bei der humanen CF ist die Infertilität männlicher adulter CF-Patienten. Diese ist geprägt durch eine charakteristische Abwesenheit beider Samenleiter, die erst im Entwicklungsverlauf des Individuums auftritt (Gilljam et al., 2004). Auch in männlichen CF-Mäusen konnte eine reduzierte Fertilität beobachtet werden. Allerdings wird diese durch eine Dysfunktion der Samenleiter hervorgerufen (Reynaert et al., 2000).

Zusammenfassend muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass trotz einiger Übereinstimmungen zwischen der humanen CF und dem murinen CF-Modell signifikante Unterschiede zwischen den beiden Spezies offensichtlich sind. Die Entwicklung des „idealen“ Mausmodells, welches in der Lage ist die humanen Charakteristika, besonders bezüglich der Lungenpathogenese bei der CF, widerzuspiegeln, ist bislang nicht gelungen. Insofern war und ist die Nachfrage nach geeigneteren Tiermodellen in der Wissenschaft groß (Elferink und Beuers, 2009).

Die Forschergruppe um Li hat es sich zur Aufgabe gemacht das domestizierte Frettchen als CF-Tiermodell zu generieren (Li und Engelhardt 2003; Li et al., 2006). Die Wahl des Frettchens als neues Tiermodell schien hinsichtlich der größeren Übereinstimmung der Lungenmorphologie, der vorherrschenden Zelltypen im Respirationstrakt und der Lungenphysiologie zum Menschen sehr vielversprechend (Leigh et al., 1986). Überdies sind die CFTR-Expression und die Verteilung der submukösen Drüsen im Atmungstrakt identisch mit der beim Menschen (Sehgal et al., 1996). Als Technik zur Genmodifizierung nutzte das Forscherteam um Li die Kerntransfertechnik „*somatic cell nuclear transfer*“ (SCNT, Li und Engelhardt, 2003). Später ist es Sun und Mitarbeitern gelungen *CFTR*-knockout Frettchen mittels einer Deletion des Exons 10 aus dem *CFTR*-Gen zu generieren (Sun et al., 2010). Der neonatale Phänotyp der so generierten Frettchen entwickelte ähnliche Eigenschaften wie der humane CF-Phänotyp. So wurde auch bei den Frettchen der charakteristische Mekoniumileus beobachtet. Ebenso entwickelten die Tiere bereits in der frühen Entwicklungsphase eine Prädisposition für Lungeninfektionen. Auch die Abwesenheit bzw. eine

Degeneration der Samenleiter, die bei adulten männlichen Patienten vorkommt, war im Frettchenmodell zu beobachten. Diese war jedoch bereits bei deren Geburt ausgebildet. Die knockout-Frettchen sind ungünstigerweise mit einer schwerwiegenden Malabsorption belastet, die eine Gewichtszunahme der Neugeborenen verhindert (Sun et al., 2010). Die Forschergruppe um Sun vermutete eine entscheidende Rolle der CFTR-Kanäle im Darm bei der Nahrungsverwertung, die bei den *CFTR*-knockout Tieren nicht exprimiert wurden. Nicht nur in dieser Hinsicht unterscheidet sich das Frettchen vom Menschen, denn die intestinale Transitzeit ist bei dem carnivoren Frettchen wesentlich kürzer, außerdem besitzt das Frettchen kein Zäkum (Bell, 1999). Liu und Mitarbeiter stellten zudem mittels bioelektrischer Messmethoden im Respirationsepithel fest, dass die Na^+-Leitfähigkeit im Epithel der Trachea im Frettchenmodell wesentlich schwächer ausgeprägt ist als im Vergleich dazu im humanen Trachealepithel (Liu et al., 2007). Unter Berücksichtigung der großen Bedeutung einer dysregulierten ENaC-Funktion bei der humanen CF-Lungenkrankheit könnte dies das Frettchen als neues CF-Tiermodell ungeeignet erscheinen lassen. Nach Liu et al. fehlen dem Frettchen im Gegensatz zum Menschen zudem jegliche DIDS-sensitiven Chloridkanäle, welche beim CFTR-knock-out Frettchen die fehlende CFTR-Aktivität kompensieren könnten. Die Mechanismen der Bronchialsekretion scheinen sich demnach erheblich von denen beim Menschen zu unterscheiden Gesamt betrachtet hat sich das CF-Frettchen nicht als geeignetes Tiermodell erwiesen (Liu et al., 2007).

Auf der Suche nach einem geeigneten CF-Tiermodell, welches in Größe, Physiologie und Anatomie dem Menschen ähnlich zu sein scheint, hielt Harris das Schaf für geeignet (Harris, 1997). Die CFTR-Proteine von Schaf und Mensch zeigen eine 90,8%ige Übereinstimmung und die ovine CFTR-Expression scheint der humanen sehr ähnlich zu sein. Später haben Williams und sein Forscherteam versucht das erste CF-Schaf herzustellen (Williams et al., 2003). Die Methodik der gentechnischen Manipulation des ovinen *CFTR*-Gens ist jedoch bislang noch nicht gänzlich ausgereift. So ist es bislang nicht gelungen ein CF-Schaf zu generieren (Davidson et al., 2006).

Die CF-Forschung an Primaten könnte vielversprechend sein denn in ihrer Genomstruktur sind sich Mensch und Primat sehr ähnlich. Die genomische *CFTR*-Sequenz beim Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zeigt beträchtliche Übereinstimmung zu der des Menschen. Die codierende Region des *CFTR*-Gens zeigt 98.3% Übereinstimmung. Auf Nukleotidebene beträgt die Identität 98.2% und auf Aminosäurenebene 99.7% (Wine et al., 1998). Bisher gibt es jedoch zum Rhesusaffen als neues CF-Tiermodell keine weiteren Forschungsansätze.

Auch das Kaninchen wurde in der Vergangenheit als in Betracht kommendes CF-Tiermodell diskutiert (Vuillaumier et al., 1997). Aber auch hierzu fehlen weitere Studien.

Die bisherigen Erkenntnisse zu den bereits umfassend untersuchten Tiermodellen (Maus und Frettchen) in der CF-Forschung lassen vermuten, dass möglicherweise substanzielle speziesspezifische Unterschiede existieren. Daraus resultierende Funktions- und Strukturunterschiede des CFTR-Kanals zwischen den Spezies sind durchaus denkbar. So könnten die beschriebenen Funktionsunterschiede im epithelialen Anionentransport mit den unterschiedlichen Aktivitäten der ENaC, CFTR und möglicherweise anderer modulierender Chloridkanäle wie CLCA erklärt werden (Liu et al., 2007).

2.2.2 Das Schweine-Modell in der Zystische Fibrose-Forschung

Bereits seit über zwei Dekaden wird das Schwein als Modell in der biomedizinischen Forschung für verschiedene Fragestellungen eingesetzt (Lunney, 2007). Dabei werden diese Tiere unter anderem in der kardiovaskulären Forschung, einschließlich der Atherosklerose-Forschung (Turk et al., 2005), und ebenso in der Reproduktions-Forschung (Sun et al., 2003) eingesetzt und dienen als Modell für viele andere Organsysteme wie zum Beispiel den Respirationstrakt (Miller et al., 2006; Perlman et al., 2005; Turner et al., 2002) und den Verdauungstrakt (Brambilla und Cantafora, 2004). Besonders in den letzten Jahren gewann das Schweine-Modell zudem immer mehr Bedeutung für die Transplantations- und Xenotransplantations-Forschung (Schook et al., 2005). Zahlreiche Forschungsprojekte, bei denen Schweine als translationales Tiermodell eingesetzt wurden, zeigten größtenteils eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Humanmedizin und sind damit sowohl in der biomedizinischen als auch in der angewandten Forschung eine wertvolle Ressource. Die immens angestiegene Relevanz des Schweins als geeignetes Tiermodell für die Erforschung humaner Krankheiten hat vielerlei Gründe, die das Schwein gegenüber anderen Tiermodellen als ideal erscheinen lassen (zusammengefasst von Lunney, 2007):

- Hohe Übereinstimmung zum Menschen bezüglich der Größe, Anatomie, Histologie, Physiologie, biochemischer Mechanismen, Organentwicklung und Pathophysiologie. Auf genomischer Ebene besitzt das Schwein hohe Sequenz- und Chromosomenstruktur-Homologien zum Menschen
- Handhabung des Versuchtieres: schneller Reproduktionszyklus, große Wurfraten, ausreichend lange Lebensspanne, relativ kostengünstig, komplikationslose Haltung, einfache Instrumentierbarkeit
- Technische Möglichkeiten: gut entwickelte gentechnische Verfahren, zur Verfügung stehende definierte Zelllinien

Auch für die CF-Forschung gewinnt das Schwein aufgrund seiner Eigenschaften zunehmend an Bedeutung. Gerade in Bezug auf die Lungenmanifestation bei CF-Patienten scheint das

Schwein als Modell besonders geeignet zu sein. Rogers verglich die Eigenschaften der humanen Lunge mit der porzinen Lunge und entdeckte große Übereinstimmungen in Anatomie, Physiologie und Biochemie (Rogers et al., 2008b). Zudem reagiert die porzine Lunge in adäquater Weise auf inflammatorische Reize durch Pathogene wie die humane Lunge. Ebenso wie der humane CFTR-Kanal formt der porzine CFTR-Kanal einen membranständigen, cAMP-abhängigen Anionenkanal (Ostedgaard et al., 2007). In beiden Spezies sind deren Leitfähigkeit und die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals annähernd gleich. Ebenso unterliegen die CFTR-Proteine in beiden Spezies den gleichen post-translationalen Proteinmodifikationen. Die Aminosäurensequenzen des humanen und porzinen CFTR-Proteins sind mit 93% Übereinstimmung nahezu identisch (Rogers et al., 2008b).

Die häufigste CFTR-Mutation (ΔF508) ist wie bereits erwähnt (2.1.4.1) durch ein Fehlen der Aminosäure Phenyalanin an Position 508 des CFTR-Proteins gekennzeichnet. Diese Mutation unterbindet die Proteinprozessierung des Proteins in der Art, dass nahezu jegliches hCFTR-ΔF508 im ER verbleibt und degradiert (Ostedgaard et al., 2007). Rogers und sein Forscherteam fanden heraus, dass pCFTR-ΔF508 anders als hCFTR-ΔF508 teilweise zum Golgi-Apparat gelangt und schließlich zum Zielkompartiment der Zellmembran weitertransportiert wird (Rogers et al., 2008b). Zudem wird bei dieser Mutationsform die Öffnungswahrscheinlichkeit des hCFTR auf 27% reduziert, beim *CFTR*-ΔF508 Schwein liegt diese jedoch bei 46%. Die insgesamt reduzierte transepitheliale Chloridleitfähigkeit bei der ΔF508-Mutation ist mit 17-18% beim Schwein im Gegensatz zum Menschen um einiges höher. Insgesamt wird der ΔF508-Basisdefekt beim Schwein offensichtlich abgemildert. Rogers und Kollegen halten Strukturunterschiede zwischen dem humanen und porzinen CFTR-Protein für wahrscheinlich (Rogerset al., 2008b), was auch Ostedgaard und Kollegen in nachfolgenden Studien postulierten (Ostedgaard et al., 2011). Dem Forscherteam um Rogers ist es mittlerweile gelungen, mit Hilfe homologer Rekombinationstechniken *CFTR*-knockout und *CFTR*-ΔF508 Schweine zu generieren (Rogers et al., 2008a). Erst kürzlich wurde ein weiteres *CFTR*-knockout Schwein in München generiert (Klymiuk et al., 2011). Studien an den neugeborenen *CFTR*-knockout Schweinen zeigten phänotypisch beträchtliche Übereinstimmungen zu humanen CF-Neonaten. Die Manifestationswahrscheinlichkeit des Mekoniumileus beim neonatalen Menschen liegt bei 15% (Quinton, 1999). Dieses Phänomen trat ebenfalls bei den untersuchten Schweinen auf, allerdings mit 100%iger Prävalenz (Meyerholz et al., 2010a; Rogers et al., 2008c; Welsh et al, 2009). Die neugeborenen Schweine zeigten zudem äquivalent zum humanen Phänotyp intestinale Obstruktionen, eine exokrine Pankreasinsuffizienz, eine fokale biliäre Zirrhose und Gallenblasen- und Gallengangspathologien (Meyerholz et al., 2010a; Keiser und Engelhard, 2011). Insgesamt

scheinen die Pathologien in diesen Organen bei den *CFTR*-knockout Schweinen wesentlich deutlicher ausgeprägt zu sein als beim CF-Patienten. Die Divergenz zwischen den Spezies diesbezüglich liegt vermutlich darin, dass bei den knockout-Schweinen jegliche Residualfunktionen des CFTR-Kanals fehlte (Rogers et al., 2008c; Meyerholz et al., 2010a). Der Respirationstrakt, die Samenleiter und Nebenhodenschwänze zeigten in diesem frühen Entwicklungsstadium ebenso wie beim Menschen laut Rogers und Kollegen keine entzündlichen bzw. fibrotischen Veränderungen (Rogers et al., 2008c). Konträr dazu fanden Pierucci-Alves und Kollegen jüngst heraus, dass die Samenleiter sowohl bei *CFTR*-knockout- und *CFTR*-ΔF508 Schweinen bereits bei deren Geburt atretisch waren (Pierucci-Alves et al., 2011). Offensichtlich besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der CFTR-Mutation und der Samenleiterabnormalität bereits bei der Geburt.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob die Entzündungsreaktionen der Atemwege sekundär durch die Erregerkontamination bei CF-Patienten verursacht werden oder ob es einen umgekehrten Mechanismus gibt und die Lunge bereits vorher geschädigt ist, untersuchten Meyerholz und sein Forscherteam die neonatale Trachea von *CFTR*-knockout Schweinen und verglichen die Ergebnisse mit der humanen CF-Lunge bei Kleinkindern (Meyerholz et al., 2010b). Dabei entdeckte die Forschergruppe sowohl in der porzinen CF-Trachea und in ähnlicher Weise auch in den humanen Atemwegen Abnormalitäten. Auffallend waren die gleichbleibend kleinere Größe und der kleinere Durchmesser in Trachea und Hauptbronchi, außerdem waren die submukösen Drüsen hypoplastisch und zeigten ein gewebespezifisch reduziertes Vorkommen. In beiden Spezies beginnen die Lungenveränderungen demnach offensichtlich bereits in einem frühen intrauterinen Entwicklungsstadium. Mittels operativer Eingriffe an *CFTR*-knockout Schweinen ermöglichten Stoltz und Kollegen ein längeres Überleben dieser Schweine (Stoltz et al., 2010). Ebenso wie *CFTR*−ΔF508/- Schweine zeigten diese übereinstimmend mit vorher genannten Forschungsergebnissen keine Entzündungsreaktionen in den Atemwegen bei Neugeborenen, allerdings war das Respirationsepithel oft bereits kontaminiert und zeigte eine weniger effektive Immunabwehr als in Wildtyp-Schweinen. Die beeinträchtigte bakterielle Elimination könnte die Entzündungskaskade bei der CF in der Lunge initiieren und somit die pathologische Ursache für die CF-Lunge darstellen. Interessanterweise konnten Stoltz und sein Forscherteam feststellen, dass die CF-Schweine erst innerhalb von einigen Monaten, entsprechend dem humanen Krankheitsbild, spontan typische CF-Pathologien in der Lunge ausbildeten. Dazu gehörten Entzündungsgeschehen, Gewebe-Remodeling, Mukusakkumulation und Infektionen (Stoltz et al., 2010). Um die Pathomechanismen bei CFTR-Mutationen wie ΔF508 besser nachvollziehen zu können, entwickelten Ostedgaard und Forscherkollegen *CFTR*-ΔF508/ΔF508 Schweine (Ostedgaard et al., 2011). Bei diesen

Schweinen besteht eine CFTR-Restfunktion von ca. 6%, die eine residuelle Cl^--Leitfähigkeit bei diesen Schweinen aufrechterhält. Die Pathologien in Neugeborenen entsprachen den bereits genannten bei den CFTR-/-Schweinen. Allerdings waren die Pankreaspathologien weniger stark ausgeprägt. Ostedgaard und sein Forscherteam kamen bezüglich der CF-Pathologien, insbesondere in der Lunge, zu ähnlichen Ergebnissen und bestätigten damit die gewonnenen Erkenntnisse von Stoltz und Mitarbeitern (Stoltz et al., 2010; Ostedgaard et al., 2011).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Schwein offensichtlich ein geeignetes Modell zur Erforschung der CF darstellen könnte (Keiser und Engelhard, 2011). Bereits mehrere Forschergruppen haben CF-Schweine zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen erfolgreich eingesetzt und konnten eine direkte Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen nutzen (Khansaheb et al., 2011; Rogan et al., 2010; Ostedgaard et al., 2011; Itan et al., 2011; Cho et al., 2011). Besonders im Hinblick auf den Respirationstrakt scheint das Schwein im Unterschied zum Mausmodell bezüglich der größeren Homologie zum Menschen ein nahezu ideales Modell zu sein. Es ist damit möglich, die noch zu bewältigende Forschungsarbeit zum Verständnis der CF-Pathologie zu erleichtern. Elferink und Beuers weisen jedoch darauf hin, dass der genetische Hintergrund nicht nur zwischen den Spezies zu variieren scheint, sondern ebenso innerhalb einer Spezies variabel sein kann. Im Hinblick auf eine dadurch möglicherweise eingeschränkte Nutzbarkeit von Tiermodellen, ist die Aufdeckung solch speziesspezifischer Unterschiede von entscheidender Bedeutung (Elferink und Beuers, 2009), insbesondere bei Proteinen, die eine Modulator-Rolle bei der CF einnehmen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Erstellung eines phylogenetischen Baumes

Zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes, der die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den bekannten humanen, porzinen und murinen CLCA-Homologen darstellen soll, wurde das Analyseprogramm ClustalV (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny; letzte Abrufung erfolgte am 29. März 2012) verwendet (Larkin et al., 2007). Dabei werden die bekannten *CLCA*-Gensequenzen zur Berechnung eines Sequenzalignments herangezogen. Das Programm stellt die verwandtschaftlichen Beziehungen der CLCA-Mitglieder zueinander in einem phylogenetischen Baum dar. Genetisch eng verwandte *CLCA*-Gensequenzen werden jeweils in ein Gen-Cluster zusammengefasst.

3.2 *In silico*-Analysen zur Vorhersage der Signalpeptidsequenz, Transmembrandomänen und Glykosylierungsstellen

Die Aminosäuresequenz von pCLCA4a wurde der Datenbank GenBank® International Nucleotide Sequence Database Collaboration (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank, GenBank Accession nos. CU 694822 und CU 469041) entnommen (Plog et al., 2009). Zur computergestützten Analyse der Proteinstruktur von pCLCA4a wurden verschiedene Programme und Algorithmen genutzt. So wurde zur Analyse der Signalsequenz des Peptids das Programm SignalP 3.0 verwendet. Eine Vorhersage potenzieller Transmembrandomänen konnte durch die Programme SOSUI, HMMTop, TMpred, DAS, Kyte-Doolittle und Psort II getroffen werden. Nach Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen wurde mit Hilfe des Programms NetNGlyc 1.0 gesucht. Die Tabelle 2 gibt die verwendeten Programme und Referenzen wieder.

Tabelle 2: Computerprogramme zur Peptidsequenzanalyse von pCLCA4a

Programm	Internetadresse (letzte Abrufung: 19. März 2012)	Referenz
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	(Bendtsen et al., 2004)
SOSUI	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/	(Hirokawa et al., 1998)
HMMTop	http://www.enzim.hu/hmmtop/	(Tusnády und Simon, 2001)
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html	(Hofman und Stoffel, 1993)
Psort II	http://psort.nibb.ac.jp/	(Nakai und Horton, 1999)
Kyte-Doolittle	http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm	(Kyte und Doolittle, 1982)
DAS	http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html	(Cserzo et al., 1997)
NetNGlyc1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	(Blom et al., 1999)

3.3 Untersuchungsmaterial und Probengewinnung

Es wurden von drei männlichen Schweinen (sechs Wochen alt, EUROC x Pietrain, aus dem Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) und zwei weiblichen Schweinen (zwei und drei Monate alt, Deutsches Edelschwein x Deutsche Landrasse, aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie, Freie Universität Berlin) Gewebeproben für die Untersuchungen entnommen. Die Tiere waren zu anderen Studienzwecken euthanasiert und bereits in vorangegangenen Studien (Plog et al., 2009 und 2012) verwendet worden. Alle Schweine waren klinisch gesund und zeigten keine pathologischen Veränderungen. Es wurde ein doppelter Probensatz entnommen: Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Hälfte der Proben in 4%igem neutral gepufferten Formalin (46 mM Na_2HPO_4, 29 mM $NaH_2PO_4x2H_2O$, 4% Formalin) nach Lillie für 24h fixiert. Die andere Hälfte wurde nach kurzem Eintauchen in 2-Methylbutan, welches in Trockeneis gekühlt wurde, in Aluminiumfolie verpackt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Den Schweinen wurde ein breites Organspektrum entnommen:

Nasenschleimhaut, Trachea, Bronchus trachealis, Bronchus principalis sinister, Lunge (drei unterschiedliche Lokalisationen: Lobus cranialis und Lobus caudalis der linken Lunge sowie Lobus accessorius), Oesophagus, Herz, Aorta, Auge, Glandula parotis, Großhirn, Kleinhirn, Magen (zwei Lokalisationen: Pars nonglandularis und Pars glandularis), Duodenum, Jejunum, Zäkum, Kolon, Rektum, Leber, Milz, Niere, Gallenblase, Harnblase, Pankreas, Haut (Perineum, Rüsselscheibe und Präputium), Hoden, Nebenhoden, Samenstrang, Uterus, Ovarien.

3.4 Generierung spezifischer Antikörper gegen pCLCA4a

Die polyklonalen Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen und Westernblot-analysen wurden von der Firma Biogenes (Berlin) hergestellt. Zwei 15 Aminosäuren lange Oligopeptide wurden zur Immunisierung von insgesamt vier Kaninchen an das Trägerprotein LPH (Limulus Polyphenus Hemocyanin) gekoppelt. Jeweils zwei Kaninchen (a und b) wurden mit dem gleichen Oligopeptid immunisiert: Ein Oligopeptid (CDLIQITGSNERDKL) liegt mit der Position von AS 357 bis 370 im amino-terminalen Teil des pCLCA4a-Proteins. Das andere Oligopeptid (CEADYTPDDSHPDPG) reicht von Position 876 bis 889 und liegt im carboxy-terminalen Teil des pCLCA4a-Proteins. Beide Epitope schienen nach *in silico*-Antigenitätsanalysen durch die Fa. Biogenes (Berlin) aufgrund ihrer vorhergesagten hohen Antigenität besonders geeignet. Eine Überprüfung der Antikörpersequenz mittels des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) schloss mögliche Kreuzreaktivitäten mit anderen Antigenen soweit möglich aus. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen Serum entnommen (Präimmunserum), welches als Negativkontrolle verwendet werden konnte. Die Firma Biogenes folgte dabei dem in Tabelle 3 dargestellten Immunisierungsschema. Die nach Immunisierung gewonnenen Sera (p4a-N-1a, p4a-N-1b, p4a-C-1a und p4a-C-1b; N = amino-terminal; C = carboxy-terminal) wurden als spezifische anti-pCLCA4a-Antikörper für nachfolgende Untersuchungen eingesetzt. Das Antiserum p4a-N-1b wurde zudem gegen sein spezifisches Oligopeptid durch die Fa. Biogenes (Berlin) säulenimmunaffinitätschromatographisch aufgereinigt. Ebenfalls stellte Biogenes das jeweils spezifische Peptid zur Verfügung, welches für die Präinkubation des Antikörpers als Spezifitätskontrolle verwendet werden konnte.

Tabelle 3: Immunisierungsschema der Fa. Biogenes zur Antikörpergenerierung

Tag	Vorgang	Serum (ml)
0	Entnahme von Präimmunserum und nachfolgend erste Immunisierung	1,5
7	boost	0
14	boost	0
28	boost	0
35	1. Blutung + boost	25 + 0,02 % Thiomersal(*)
42	2. Blutung	25 + 0,02 % Thiomersal(*)
77	boost	0
84	finale Blutung (FB)	50

(*)Thiomersal wurde als Konservierungsmittel eingesetzt

3.5 Probenaufbereitung für nachfolgende Untersuchungen

3.5.1 Paraffineinbettung und Herstellung von Gewebeschnitten

Die formalinfixierten Proben wurden zunächst an die Größe der Histologiekassetten (Fa. Milian, Genf) angepasst, eingeschnitten (ca. 2 cm x 1-2 cm x 0,5 cm) und in diese zur anschließenden Paraffineinbettung verbracht. Die folgende Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und die Paraffinimprägnierung liefen automatisiert über Nacht ab (TissueTek® VIP von Fa. Sakura, CA, USA). Am Folgetag wurden die Organe mit 60°C heißem Paraffin übergossen und waren nach Erkalten des Paraffins schnittfähig. Von diesen Blöcken wurden ca. drei µm große Schnitte mit dem Mikrotom HM 325 und den Mikrotomklingen SEC 35 (Microm International GmbH, Walldorf) angefertigt und in ein handwarmes Wasserbecken vom Typ WB 27 (Fa. Medax, Neumünster) verbracht. Die Schnitte wurden anschließend auf STAR FROST® Objektträger (Fa. Knittel-Glaeser, Braunschweig) aufgezogen. Auf einer 37°C warmen Wärmeplatte wurden die Schnitte vorgetrocknet und anschließend zur besseren Gewebehaftung im 37°C Brutschrank (Fa. Melag, Berlin) 24 h getrocknet. Kurz vor der Weiterverarbeitung wurden die Schnitte bei 65°C für 30 min im Brutschrank getrocknet.

3.5.2 Anfertigung von Kryostatschnitten

Von den tiefgefrorenen Organen (-80°C) wurden jeweils mit einem sterilen Skalpell ca. 1 cm^3 große Gewebestücke mit Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Fa. Sakura, CA; USA) auf einem Objekthalter befestigt und in die vorgesehene Halterung des Kryostats CM 3050 S (Leica, Wetzlar) eingespannt. Es wurden fünf µm dicke Gewebeschnitte bei -20°C angefertigt und auf STAR FROST® Objektträger (Fa. Knittel-Glaeser, Braunschweig) aufgezogen. Bis zur Weiterverwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

3.5.3 Aufbereitung der Proben für molekularbiologische Untersuchungen

3.5.3.1 Allgemeine Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Bei allen Handhabungen wurde vorherrschend steril gearbeitet, um Kontaminationen (DNase, RNase, Fremd-DNA) zu vermeiden. Unterschiedliche Arbeitsschritte, wie Isolierung von RNA, Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese, wurden räumlich getrennt durchgeführt. Das Tragen von Einmalhandschuhen und sauberen Arbeitskitteln gehörte ebenfalls zum Hygienestandard. Vor Arbeitsbeginn wurden die Arbeitsflächen mit Megrosept (Fa. Megro, Wesel) oder 10%iger Natriumhypochlorid-Lösung desinfiziert. Hergestellte Lösungen wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Proben, Arbeitslösungen und Reagenzien wurden in gut händelbare Mengen aliquotiert. Während des Arbeitsprozesses wurden die Proben auf Eis gestellt und unmittelbar nach Herstellung sofort bei entsprechender Temperatur gelagert (RNA bei -80°C, DNA bei -20°C). Allgemein wurde Nuklease-freies sowie RNA- und DNA-freies Wasser eingesetzt. Zum Verdünnen von RNA und dem Herstellen von Lösungen wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser 0,1 Vol% (Ehrenberg et al., 1976) oder Wasser für die Molekularbiologie (Fa. Roth, Karlsruhe) verwendet. Bei der Herstellung von cDNA (engl.: *complementary*, c) mittels reverser Transkription wurde Nuklease-freies Wasser (Fa. Biorad, München) verwendet. Zur Überprüfung auf Kontaminationsfreiheit wurde bei allen Polymerase-Kettenreaktionen (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) eine Negativkontrolle (engl.: *no template control*, NTC) mitgeführt, die kein Template, sondern stattdessen die äquivalente Menge Wasser enthielt. Außerdem wurde ein spezieller Satz an Pipetten und Pipettenspitzen (Fa. Socorex Isba S.A., Schweiz) genutzt, der ausschließlich für molekularbiologische Versuche verwendet wurde.

3.5.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von totaler RNA aus gefrorenen Organen bzw. Geweben wurde die sogenannte *„single step“* Methode angewendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Von den

tiefgefrorenen Organen wurden ca. 100 mg in jeweils ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zuvor wurden die Gefäße mit vier bis sieben sterilen Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 2,8 mm (Peqlab, Erlangen) bestückt und mit 1,2 ml TriFast™ (Fa. Peqlab, Erlangen) befüllt. Anschließend wurden die Proben wie folgt homogenisiert: In einem ersten Schritt wurden die Proben bei Raumtemperatur im Homogenisator PreCellys 24 (Fa. Peqlab, Erlangen) zerkleinert (zweimal, 4.000 x *g*, 30 s). Im nächsten Schritt wurden die Proben mehrmals mit einer Sterican-Kanüle (gelb, Ø 0.90mm x 40mm G20x1½) und einer 10 ml Einmalspritze (Fa. B. Braun, Melsungen) aufgezogen und ausgespritzt. Anschließend folgte die Phasenseparation durch Zugabe von je 240 µl Trichlormethan/Chloroform 99%. Dieses Gemisch wurde kurz gemischt und dann drei min bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend bei +4°C, 15 min, 12.000 x *g* zentrifugiert zu werden (Zentrifuge 5417 R, Fa. Eppendorf, Hamburg). Hierbei entstanden drei Phasen. Die RNA befand sich in der oberen, wässrigen Phase, die vorsichtig abgenommen und der anschließenden Präzipitation zugeführt wurde. Dafür wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,6 ml Isopropanol befüllt und in dieses die RNA-haltige wässrige Phase pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei +4°C für 15 min mit 12.000 x *g* zentrifugiert. Am Boden des Gefäßes hatte sich das RNA-Präzipitat abgesetzt. Das Isopropanol wurde vom Pellet abpipettiert. Schließlich wurden die Proben dreimalig mit jeweils frischem 70%igem Ethanol gewaschen, indem dieses mehrmals auf- und abpipettiert wurde. In einem letzten Schritt wurden die RNA-Pellets über Kopf getrocknet und anschließend in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentrationen und ihre Reinheiten wurden unter Verwendung des NanoDrop™ - Geräts (Fa. PeqLab, Erlangen) ermittelt und dokumentiert.

3.5.3.3 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

Zur cDNA-Synthese aus allen Organen und Geweben wurde das iScript™cDNA Synthesis Kit (Fa. Biorad, München) verwendet. In einem Vorversuch wurde die optimal einzusetzende Menge an RNA ermittelt. Dafür wurden nach Vorverdünnung mit DEPC-Wasser jeweils 100 Nanogramm (ng), 500 ng und 1000 ng RNA vom Rektum eingesetzt und mit iScript Reverse Transkriptase umgeschrieben. Nach den Ergebnissen aus der PCR wurde eine optimale Bandenqualität bei ca. 750 ng eingesetzter RNA angenommen. Der Reaktionsmix für die Reverse Transkription (RT) wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll zusammengestellt. Jeder Reaktionsmix enthielt 4 µl 5x Reaktions-Mix, 1 µl Reverse Transkriptase (Enzym) und 1 µl RNA-Template (1µl enthielten 750 ng RNA). Schließlich wurden noch 14 µl Nuklease-freies Wasser zugeführt, um eine Gesamtmenge von 20 µl zu erhalten. Für das folgende Reaktionsprotokoll wurde der Thermocycler 3000 (Fa. Biometra, Göttingen) verwendet. Initial wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 25°C erwärmt und anschließend 30

min bei 42°C inkubiert. Schließlich erfolgte bei 85°C die Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Zum Schluss wurde der Ansatz bis zur Entnahme auf +4°C gekühlt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.5.4 Herstellung von Organlysaten und Ermittlung der Proteinkonzentrationen

Etwa 100 mg der tiefgefrorenen Organe (-80°C) wurden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Standard-Lysis-Puffer (siehe 3.14) + Protease Inhibitor Cocktail Tablets (pro 10 ml 1 Tablette), complete Mini, EDTA-free (Fa. Roche, Mannheim) verbracht. Anschließend wurde das Gewebe bei Raumtemperatur im PreCellys 24 (Fa. Peqlab, Erlangen) homogenisiert (2x, 4.000 x *g*, 30 s). Das Gemisch wurde anschließend mit 13.000 x *g* bei +4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Das abzentrifugierte Pellet wurde verworfen. Die anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung der Organlysate erfolgte mit Hilfe des *Bradford*-Tests (Bradford, 1976). Zunächst war zur Proteinkonzentrationsbestimmung eine Kalibrierung notwendig, als Standardprotein diente Bovines Serumalbumin (BSA). Von diesem wurde eine Standardreihe erstellt, die der folgenden Tabelle entnommen werden kann.

Tabelle 4: BSA-Standardreihe zur Kalibrierung bei der Proteinkonzentrationsbestimmung und BSA-Menge pro Ansatz

Standardlösung	BSA Stammlösung [2 mg/ml (µl)]	Aqua bidest. (µl)	BSA (µg/ml)	Menge BSA (µg / Ansatz)
Leerwert	-	1000	0	0,0
1	50	950	100	2,0
2	100	900	200	4,0
3	150	850	300	6,0
4	200	800	400	8,0
5	250	750	500	10,0
6	300	700	600	12,0

Sechs Standards haben sich für die Proteinbestimmung als ausreichend erwiesen. Für die Ansätze zur Proteinkonzentrationsmessung der BSA-Standardreihe wurden von der jeweiligen Standardlösung (siehe Tabelle 4: Leerwert und Standardlösungen 1 bis 6) 20 µl mit 780 µl aqua bidestillata (A. bidest.) und 200 µl Reaktionslösung (Fa. Biorad, München)

gemischt. Damit ergab sich, wie in Tabelle 4 angegeben, die entsprechende Menge BSA (µg) pro Ansatz. Für die Ansätze der Organlysate wurde als geeignete Verdünnung 1 µl des Organlysats, 799 µl A. bidest. und 200 µl Reaktionslösung (Fa. Biorad, München) gemischt. Die Ansätze wurden dann anschließend in 1 ml Polystyrol-Küvetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) umgefüllt. Von den Proben wurden jeweils Doppelmessungen im Photometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt und von diesen wurde jeweils der Mittelwert zur Berechnung der Proteinkonzentrationen herangezogen. Die Menge BSA (µg) / Ansatz der Standardreihe (x-Achse) wurde gegen den gemessenen zugehörigen Extinktionswert (y-Achse) in einem Koordinatensystem aufgetragen. Es ergab sich ein linearer Kurvenverlauf. Über die sich ergebende Geradengleichung wurde durch Einsetzen der Extinktionswerte, die für die Organlysate ermittelt worden waren, deren Proteingehalt berechnet und dann dokumentiert. Die Verdünnungen der Organlysate wurden bei den Berechnungen berücksichtigt.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion zum organspezifischen Nachweis von pCLCA4a auf RNA-Ebene und zur Amplifizierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Identifizierung der pCLCA4a-cDNA in den Organen und Geweben sowie der Amplifizierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a. Für die Überprüfung der mRNA-Qualität und der Effizienz der Reversen Transkription (3.5.3.3) wurde mit spezifischen, für das Schwein entwickelten Primern (siehe Tabelle 5) zunächst bei allen Proben das Referenzgen Elongationsfaktor (EF) - 1alpha (542 Basenpaare, bp) mittels PCR amplifiziert (Gruber und Levine, 1997). Diese und die spezifischen Primer für die Amplifizierung von pCLCA4a wurden teils mit Hilfe des Programms Beacon Designer 3.0 (Fa. Premier Biosoft International; Palo Alto, CA) ausgewählt und von der Fa. Biomers.net (Ulm) synthetisiert. Alle lyophilisierten Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/µl mit DEPC-behandeltem Wasser vorverdünnt. Die Primer P4-F1 und P4-R1 (Tabelle 5) flankierten den Offenen Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) von pCLCA4a. Somit war es möglich, den gesamten ORF zu amplifizieren, so dass diese Primer auch zum Klonieren geeignet waren (siehe 3.7). Eine anschließende Differenzierung von pCLCA4b, einer beim Schwein spezifischen Genduplikatur (Plog et al., 2009), war allerdings unerlässlich, da die genannten Primer auch den Offenen Leserahmen von pCLCA4b abdeckten. Dies erfolgte über einen Restriktionsenzymverdau (3.7.1) und eine externe Sequenzierung durch die Firma SeqLab (Göttingen). Um unerwünschte Amplifikationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurden die anderen Primer so gewählt, dass ihre Zielsequenzen Intron-überlappend waren. Um die Spezifität der pCLCA4a-Primer zu überprüfen, wurde das Amplifikat für pCLCA4a zur Identifizierung ebenfalls durch die Fa.

SeqLab (Göttingen) sequenziert und anschließend zum Ausschluss von Kreuzreaktionen mit anderen porzinen CLCA-Vertretern (pCLCA4b, pCLCA1 und pCLCA2) mittels BLAST-Suche (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) verglichen. Außerdem wurden mögliche Kreuzreaktivitäten (pCLCA4b, pCLCA1, pCLCA2) durch zusätzliche PCRs überprüft. Dabei wurde jeweils cDNA aus der Klonierung von pCLCA4b, pCLCA1 bzw. pCLCA2 (bereitgestellt von S. Plog, Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin) mit den pCLCA4a-spezifischen Primern getestet. Als Vergleich und PCR-Kontrolle wurden die CLCA-Vertreter jeweils auch mit ihren spezifischen Primern, ebenfalls bereitgestellt von S. Plog, überprüft. In der folgenden Tabelle sind alle relevanten Primer aufgelistet.

Tabelle 5: Primersequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Amplifizierung von pCLCA4a und EF-1alpha (F = *forward*, R = *reverse*)

	Primer	Sequenz 5´ - 3´	Schmelz-temperatur (Tm)	Anzahl der Basen-paare
pCLCA4a	P4-F1	GAAAAGCCTCAACAAG	51°C	3178 ≙ pCLCA4a-ORF
	P4-R1	ATTTTKCATGAATGATC (k= g od. t)	59°C	
	P4-F2	GCCGTATACCAAGCAGTTCAC	52°C	519
	P4-R2	CGGTGCCACCATTACTTCTGTGATA	59°C	
	P4-F3	ACACCCACCTTCCTG	57°C	1189
	P4-R3	AATGATGACTTCTAC	53°C	
EF-1alpha	EF-1a F1	GAACDGGCAGACCCGTGAGC	61°C	542
	EF-1a R1	AGCCCACGTTGTCCCCAGGA	61°C	

Zur Etablierung der Primerpaare wurde zunächst die optimale Annealingtemperatur T_A über einen Temperaturgradienten ermittelt. Dies erfolgte im Gradientencycler (Fa. Biometra, Göttingen) mit folgenden Temperaturstufen: 55°C / 56,9°C / 61,4°C / 66,2°C / 70,9°C / 74,5°C / 75°C. Als Template wurde ein Pool aus cDNA von Dünn- und Dickdarm, Lunge, Herz und Auge verwendet. Folgender PCR-Mix (Tabelle 6) für die DreamTaq™ DNA-Polymerase (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) wurde angewendet. Zur Amplifizierung im Gradientencycler wurde das Programm nach Tabelle 6 verwendet. Für die Negativkontrolle (NTC) wurde als Annealingtemperatur die niedrigste Temperaturstufe (55°C) gewählt.

Tabelle 6: PCR-Mix für die DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas)

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
DreamTaq™ DNA Polymerase 5 U/µl (Fermentas)	0,25	0,025 U/µl
10x DreamTaq™ Green Buffer, enthält 20 mM $MgCl_2$ (Fermentas)	5	2 mM
forward- / reverse-Primer 20 pmol	je 1	0,4 pmol
dNTP Ansatz 10 mM je dNTP (Invitrogen)	1	0,2 mM
Template (cDNA)	1	—
Nuklease-freies Wasser	ad 50	—

Tabelle 7: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifizierung von pCLCA4a und EF-1alpha im Gradientencycler

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorlauf Heizdeckel	99°C	5 min	einmalig
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min	einmalig
2. Denaturierung	95°C	30 s	einmalig
3. Primer-Annealing	Gradient T_A (7 Temperaturstufen)	30 s	einmalig
4. Elongation	72°C	30 s	• 29 x ab Schritt 2+ Zeitinkrement 1 s (für pCLCA4a) • 34 x ab Schritt 2 (für EF-1alpha)
5. Finale Verlängerung	72°C	10 min	einmalig
6. Temperatur bis zur Probenentnahme	4°C	auf Dauer	einmalig

Als effektivstes Primerpaar zur Amplifizierung der pCLCA4a-cDNA aus den Organ- und Gewebelysaten wurden die Primer P4-F2 und P4-R2 bestimmt, mit einer Annealing-temperatur von 57°C und 29 Zyklusdurchläufen (mit Zeitinkrement 1 s). Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 519 bp. Bei dem Referenzgen EF-1alpha wurde eine T_A von 60°C festgesetzt. Es wurden 34 Zyklen ohne zusätzliches Zeitinkrement durchlaufen. Das

Temperatur-Zeit-Programm erfolgte im Thermocycler 3000 (Biometra, Göttingen) wie in Tabelle 7 angegeben. Für ein Organscreen (je Schwein 30 bis 34 Organe) wurde zunächst ein Master-Mix für 30 bis 34 Organe + 1 Negativkontrolle + 1 Positivkontrolle (cDNA aus der Klonierung von pCLCA4a, siehe 3.7) nach Tabelle 6 (ohne Template) angesetzt und auf die entsprechende Anzahl an 0,2 ml Reaktionsgefäßen verteilt. Anschließend wurden je 1µl cDNA des jeweiligen Organs bzw. cDNA aus der Klonierung von pCLCA4a bei der Positivkontrolle zu dem Mix pipettiert. Die Negativkontrolle enthielt statt cDNA die äquivalente Menge Nuklease-freies Wasser. Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden die Proben entnommen und anschließend in ein 2,6%iges Agarosegel (2,6 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer, siehe 3.14) mit 0,1% Ethidiumbromid (4 µl / 100 ml Agarosegel) geladen. In einem Spannungsfeld (100V) wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Marker zur DNA-Größenbestimmung wurde entweder die HyperLadderII (Fa. Bioline, Luckenwalde) oder O´GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) genutzt. Die Gele wurden zur Fluoreszenzsichtbarmachung unter UV-Licht mit dem ChemiDOC™ und XRS-Geldokumentationssytem (Fa. Biorad, München) mit Hilfe der Software *Quantity One* (Fa. Biorad, München) durchleuchtet und zur Dokumentation fotografiert.

3.7 Klonierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a in den Vektor pcDNA3.1(+)

Als Expressionsvektor zur Klonierung des Offenen Leserahmens (engl.: *open reading frame*, ORF) von pCLCA4a wurde pcDNA3.1(+) genutzt (Fa. Invitrogen life technologies, Karlsbad). Der Vektor wurde zunächst mittels des Restriktionsenzyms *Eco*RV FastDigest® enzyme (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot), wie in Tabelle 8 dargestellt, *blunt end* (beide Enden sind gleich lang „glatte Enden“) geschnitten und so linearisiert.

Tabelle 8: Ansatz für den Restriktionsenzymverdau des Vektors pcDNA3.1(+)

Reagenz	Volumen (µl)
10X FastDigest® Green Buffer (Fermentas) oder 10X FastDigest® Buffer (Fermentas)	2
Plasmid DNA (up to 1 µg)	4
FastDigest® enzyme *Eco*RV10 U/µl (Fermentas)	1
Nuklease-freies Wasser	ad 20

Dieser Reaktionsansatz wurde nach gutem Mischen für 5 min im Thermoblock (Fa. Grant, Cambridge, UK) auf 37°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Fa. Macherey-Nagel, Büren) aufgereinigt. Hierfür wurden zu den 20 µl aus dem Restriktionsenzymverdau des Vektors 40 µl NT-Puffer gegeben und auf eine DNA-Bindungssäule (NucleoSpin® Extract II – Säule) pipettiert, die in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt wurde. Nach Zentrifugation mit 11.000 x *g* für 1 min wurde die Silica-Membran der Säule mit 600 µl NT3-Puffer gewaschen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Sammelgefäß mit dem Zentrifugat wurde jeweils verworfen. Zur Trocknung der Membran und kompletten Entfernung des NT3-Puffers wurde nochmals zentrifugiert (2 min, 11.000 x *g*). Die Elution der DNA von der Säule erfolgte durch Zugabe von 20 µl Elutions-Puffer NE und einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die DNA wurde durch anschließendes Zentrifugieren bei 1.000 x *g* für 1 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Im Anschluss erfolgte eine T-Addition des linearisierten Vektors mittels GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Fa. Promega, Mannheim). Tabelle 9 gibt Reagenzien und Volumina des Ansatzes wieder. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 70°C inkubiert und dann nochmals wie zuvor beschrieben über das NucleoSpin® Extract II Kit (Fa. Macherey-Nagel, Büren) aufgereinigt.

Tabelle 9: PCR-Ansatz zur T-Addition des linearisierten Vektors pcDNA3.1(+)

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	5x	10	1x
$MgCl_2$	25 mM	2	1 mM
GoTaq Flexi DNA-Polymerase (Promega)	5 U/µl	0,5	2,5 U/Ansatz
dTTP (Invitrogen)	Je 10 mM	4	0,2 mM
Nuklease-freies Wasser	—	13,5	—
Linearisierter Vektor	—	20	—
Gesamtvolumen	—	50	—

Um spezifisches Produkt zu gewinnen und eine ausreichende Menge des zu klonierenden Nukleotidabschnitts (pCLCA4a-ORF, 3178 bp) zu bekommen, wurde das DNA-Insert zuvor mittels PCR amplifiziert. Der *forward*-Primer P4-F1 und der *reverse*-Primer P4-R1 (Tabelle 5), flankierten den gesamten ORF und waren so geeignet für dessen Amplifizierung. Als Template wurde zuvor gewonnene cDNA vom Jejunum eingesetzt. Im folgenden Schema nach Tabellen 10 und 11 sind der Reaktionsansatz und das PCR-Programm aufgelistet. Die cDNA von Kleinhirn und Herz dienten als Negativkontrolle.

Tabelle 10: PCR-Mix für die Amplifizierung des ORF von pCLCA4a

Reagenz	**Konzentration**	**Volumen (µl)**	**Master Mix**	
			x5 (µl)	**Endkonzentration**
10x High Fidelity PCR Buffer mit $MgCl_2$ (Fermentas)	10x 15 mM	2,5	12,50	1x 1,5 mM
P4-F1 P4-R1	je 20 pmol	je 1	je 5	je 0,8 µM
dNTP-Ansatz 10 mM je dNTP (Invitrogen)	je 10 mM	0,5	2,5	0,2 mM
High Fidelity Taq (Fermentas)	5 U/µl	0,3	1,5	1,5 U/µl
cDNA je Jejunum, Herz, Kleinhirn	—	je 1	5	—
Nuklease-freies Wasser	—	18,7	93,5	—
Gesamtvolumen	—	25	125	—

Tabelle 11: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifizierung des ORF von pCLCA4a

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorlauf Heizdeckel	99°C	5 min	einmalig
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min	einmalig
2. Denaturierung	94°C	30 s	einmalig
3. Primer-Annealing	44°C	30 s	einmalig
4. Elongation	68°C	3 min 20 s	10 x ab Schritt 2
5. Extension	68°C	3 min 20 s	25 x ab Schritt 2 + Zeitinkrement 10 s
6. Finale Verlängerung	68°C	10 min	einmalig
7. Entnahmetemperatur	4°C	auf Dauer	einmalig

Auch hier erfolgte im Anschluss eine Aufreinigung des PCR-Produkts über das NucleoSpin® Extract II Kit (Fa. Macherey-Nagel, Büren). Zur anschließenden A-Addition, nach gleichem Schema wie in Tabelle 9, wurden dATP statt dTTP und als Template das aufgereinigte Insert verwendet. Anschließend erfolgte nochmals eine Aufreinigung des A-addierten Inserts.

Zur Verknüpfung der DNA-Enden von Vektor pcDNA3.1(+) (Fa. Invitrogen life technologies, Karlsbad) und Insert (ORF von pCLCA4a) wurden über das Enzym T4 DNA-Ligase (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3´-Hydroxygruppen und 5´-Phosphatenden geschaffen. Dabei wurde das Insert im Überschuss zu dem Reaktionsansatz gegeben (Ligationsverhältnis Vektor/Insert: 1/2). Es wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der in den Reaktionsmix (Tabelle 12) statt des Inserts Nuklease-freies Wasser in äquivalenter Menge eingesetzt wurde. Der Ligationserfolg konnte anschließend nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung (UV-Licht) mittels ChemiDOC™ und XRS-Geldokumentationssytem (Fa. Biorad, München) kontrolliert werden. In Tabelle 12 ist der Reaktionsmix zur Vektor-Insert-Ligation dargestellt. Nach Ligation wurde der Ansatz über Nacht inkubiert und anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert.

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor und Insert

Reagenz	Volumen (µl)
10 x T4-Ligasepuffer (Invitrogen)	2
Nuklease-freies Wasser	9
Linearisierter Vektor pcDNA3.1(+) Vektor ist 3x konzentrierter als das Insert (1500 ng)	1
Insert (500 ng)	6
T4 DNA-Ligase 5 U/µl (Fermentas)	2
Gesamtvolumen	20

Der mit pcDNA3.1(+) ligierte pCLCA4a-ORF wurde in die ultrakompetenten Escherichia coli XL2-blue-Bakterien (Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA) transformiert. Dazu wurden die kompetenten Bakterien (-80°C) kurz angetaut. Einem Aliquot von 100 µl wurden 2 µl β-Mercaptoethanol zugefügt und dieses wurde dann 10 min auf Eis gestellt. Daraus wurden 50 µl weiterverwendet. Es wurden 2 µl aus dem Ligationsansatz hinzugegeben und es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis, während der die Zellen und der Ligationsansatz leicht gemischt wurden. Zur Erleichterung der DNA-Aufnahme in die Bakterien wurde der Ansatz einem Hitzeschock (30 s, 42°C) unterzogen (Panja et al., 2008) und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 0,5 µl SOB-Medium (engl.: *super optimal broth,* siehe 3.14) nach Hanahan (Hanahan, 1983) zugegeben. Die nachfolgende Inkubation fand für 60 min bei 37°C statt. Als Kontrolle gelangte nur der Vektor ohne den pCLCA4a-ORF, geschnitten und mit Alkaliner Phosphatase (engl.: *calf intestinal* CIAP, Fa. New England Biolabs, Frankfurt) behandelt, in den beschriebenen Transformationsprozess. Im Anschluss wurden 50 µl des Transformationsansatzes auf LB / Ampicillin-Platten (engl.: *lysogeny brothnach,* LB) nach Bertani (Bertani, 1951) ausplattiert. Das LB-Medium (Fa. Roth, Karlsruhe) enthielt Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l und Natriumchlorid 5 g/l (pH-Wert 7,0 ±0,2). Zu 500 ml LB-Medium wurden 7,5 g LB-Agar (Fa. Roth, Karlsruhe) zugegeben. Diese Nährbodenlösung wurde bei 121°C autoklaviert. Nachdem die Flüssigkeit auf 55°C abgekühlt war, wurden 25 mg Ampicillin (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben. Auf jede 10 cm – Petrischale (Fa. Nunclon Surface, Roskilde, DK) wurden ca. 10 ml warme Nährbodenlösung gegossen. Nach vollständigem Erkalten wurden die nun fest gewordenen Agar-Platten bis zum Ausplattieren kopfüber bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Platten wurden steril mit der Transformationslösung beimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das

Koloniewachstum auf den Agar-Platten wurde im Vergleich zu der Negativkontrolle überprüft. Bakterien, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, verfügten über eine Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum Ampicillin und konnten sich vermehren. 72 Kolonien befanden sich auf der Agar-Platte mit pCLCA4a-Transformationslösung und <15 Kolonien waren bei der Negativkontrolle vorhanden. Schließlich wurden 21 Einzelkolonien mit sterilen Pipetten von der Platte gepickt, in je 50 µl A. dest. (1,5 ml Reaktionsgefäße) überführt und kurz bei 37°C geschüttelt. Je 1 µl davon wurden in die beschriebene PCR in Tabelle 13 zur Identifizierung des gesuchten Plasmids eingesetzt. Das PCR-Produkt sollte eine Länge von 1189 Basenpaaren haben.

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die PCR zur Identifizierung der gepickten pCLCA4a-Klone

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Master Mix (µl) (Für 24 Proben)	Endkonzentration
DreamTaq Green Buffer enthielt $MgCl_2$ (Fermentas)	10x 20 mM	5	120	1x 2 mM
Primer: P4-F3 und P4-R3	100 µM	je 0,2	je 4,8	0,4 µM
dNTP Ansatz 10 mM je dNTP (Invitrogen)	Je 10 mM	1	24	0,2 mM
Dream DNA Taq Polymerase (Fermentas)	5 U/µl	0,25	6	1,25 U/Ansatz
Nuklease-freies Wasser	—	42,35	1016,4	—
Einzelkolonie in 50 µl A. dest.	—	1	24	—
Gesamtvolumen	—	50	1200	—

Im Thermocycler 3000 (Fa. Biometra, Göttingen) wurde weitgehend das Temperatur-Zeit-Programm aus Tabelle 11 angewendet. Anders als in jener Tabelle aufgeführt, betrug die Annealingtemperatur 60°C und es wurden 35 Zyklen durchlaufen. Eine nachfolgende gel-elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes und Visualisierung mit dem Chemi-DOC™ und XRS-Geldokumentationssytem (Fa. Biorad, München) zeigte das gesuchte Produkt. Um auch die Position des Leserahmens auf seine richtige Lage zu überprüfen, musste noch eine PCR angeschlossen werden. Hierfür wurde als *forward*-Primer T7–

TAATACGACTCACTATAGGG (Fa. Invitrogen, Karlsbad) eingesetzt (Position nahe der Ligationsstelle auf dem pcDNA3.1(+)-Plasmid) und als *reverse*-Primer der bereits genannte P4-R1 Primer. Bei richtiger Lage entstand ein Produkt mit 3178 bp Länge. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen in den Tabellen 8 und 9. Drei der 20 gepickten Klone konnten letztendlich für weitere Versuche genutzt werden.

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA der positiven pCLCA4a-Klone zu erhalten, wurden 20 µl der gepickten und in Nuklease-freiem Wasser gelösten Klone in 5 ml LB/Amp-Medium über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Fa. Melag, Berlin) vermehrt. Aus der trüben Bakteriensuspension wurde das Plasmid mit dem Plasmid Midi Prep Kit (Fa. Machery-Nagel, Düren) isoliert und aufgereinigt. Dafür wurden 100 ml der Bakteriensuspension zentrifugiert (15 min, 5000 x *g*, 4°C), der Überstand verworfen und ordnungsgemäß entsorgt. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml RNaseA-haltigem (100 µg/ml) Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 8 ml Lysispuffer erfolgte die Zelllyse. Das Röhrchen wurde fünfmal geschwenkt und dann 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml Neutralisationspuffer aufgehoben. Der Ansatz wurde anschließend 10 bis 15 mal bis zur Klümpchenbildung geschwenkt. Als Nächstes war die Equilibrierung der NucleoBond® Xtra-Säule zur Adsorption der Plasmid-DNA notwendig. Dies erfolgte durch Zugabe von 12 ml Equilibrierungspuffer. Nach dreimaligem Invertieren der Plasmidlösung wurde diese auf die equilibrierte Säule (mit Filter) gegeben. Im Anschluss fand ein Waschschritt statt, bei dem zunächst 5 ml des Equilibrierungspuffers auf die Säule pipettiert wurden und danach 8 ml Waschpuffer. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch 5 ml Elutionspuffer eluiert. Die nachfolgende DNA-Fällung wurde mittels Isopropanol erreicht (Verhältnis: 5 ml Plasmid-DNA mit 3,5 ml Isopropanol). Nach 50-maligem Schwenken und anschließender Zentrifugation (30 min, 1.400 x *g*, +4°C) wurden der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 15.000 x *g*, 17°C) und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, bis es opak geworden war. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und dann 10 min bei 37°C stehen gelassen.

3.7.1 Differenzierung zu pCLCA4b

Die Abgrenzung zu pCLCA4b, dessen ORF möglicherweise ebenfalls von den verwendeten Primern P4-F1 und P4-R1 amplifiziert werden könnte, fand im Anschluss statt. Dafür wurde ein Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen *Eco*RVund *HIN*DIII (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot), nach dem in Tabelle 7 genannten Protokoll durchgeführt, mit

welchem eindeutig eine Differenzierung zwischen den pCLCA4-Vertretern a und b erfolgen konnte. Der Verdau mit *Eco*RV ergab für pCLCA4a eine Bande bei 8606 bp, für pCLCA4b würden zwei Banden mit den Größen (bp) 6395 und 2395 entstehen. *HIN*DIII spaltet die pCLCA4a-DNA in drei Teile (1724 bp, 850 bp und 6000 bp). Ein Verdau von pCLCA4b würde sechs Produkte entstehen lassen (1257 bp, 932 bp, 161 bp, 228 bp, 545 bp und 5483 bp). Außerdem wurde die gewonnene Plasmid-DNA durch die Fa. SeqLab (Göttingen) komplett sequenziert und mit den Datenbanken verglichen, um so mit einer weiteren Methode zu verifizieren, dass es sich um Plasmid-DNA des Vertreters pCLCA4a handelte.

3.8 Gewinnung von spezifischem Protein nach heterologer Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem pCLCA4a-Plasmid

Für die transiente Transfektion zur Produktion und Prozessierung von Protein aus den pCLCA4a-beladenen Plasmiden wurde mit der menschlichen Zelllinie HEK-293 (engl.: *human embryonic kidney*, HEK; American Type Culture Collection (ATCC), VA, USA). gearbeitet. Die Kultivierung dieser Zelllinie fand unter CO_2-Atmosphäre (5%) in einem Zellkulturbrutschrank (Fa. Binder, Tuttlingen) bei 37°C statt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde bei allen Handhabungen im Umgang mit HEK 293-Zellen steril gearbeitet. Es wurde unter einer Clean Air EF/A6 Sicherheitsarbeitsbank (Fa. Clean Air Techniek B.V., Woerden, NL) gearbeitet. Arbeitsflächen wurden vor Arbeitsbeginn mit Megrosept (Fa. Megro, Wesel) desinfiziert. Sämtliche Materialien, die innerhalb der Arbeitsbank verwendet wurden, waren vor Einsatz autoklaviert bzw. kurz abgeflammt worden. Das Tragen von separaten Arbeitskitteln und Einmalhandschuhen war obligat. Auch auf effektive Arbeitsvorgänge wurde geachtet. In 75 cm Zellkulturflaschen (Fa. Techno Plastic Products, Schweiz) wurden die HEK 293-Zellen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/l) (Fa. Biowest, Nuaillé Frankreich) kultiviert. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden 500 ml Zellkulturmedium zuvor mit 5 ml 200 mM L-Glutamin, Endkonzentration (EK) 2 mM (Fa. Biowest, Nuaillé), 50 ml fetalem Kälberserum (FKS), EK10% (Fa. Biowest, Nuaillé) und mit 5 ml des Antibiotikums Penicillin/Streptomycin, EK 1x (Fa. Biochrome, Berlin) versetzt. Alle zwei bis fünf Tage musste ein Mediumwechsel stattfinden. Dafür wurde das alte Medium vorsichtig am Rand der Zellkulturflasche mit einer Pasteurpipette (Fa. Sarstedt, Nürmbrecht) abgesaugt und es wurden 16 ml neues Medium, welches auf 37°C im Wasserbecken (Fa. Köttermann, Hänigsen) vorgewärmt worden war, aufgeträufelt. Das Wachstum der Zellen wurde einmal am Tag unter dem Mikroskop (Fa. Carl Zeiss AG, Jena) auf Konfluenz der Zellen untersucht. Entsprach dieses ungefähr 90%, wurden die Zellen passagiert: Zwei neue Zellkulturschalen wurden dafür mit jeweils 10 ml neuem, vorgewärmten Medium befüllt. Das Medium der alten Kulturschale (Zellen hafteten am

Boden) wurde vorsichtig abgesaugt und 10 ml neuen Mediums wurden aufgeträufelt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lösten sich die HEK 293-Zellen vom Boden und das Medium (enthielt nun HEK 293-Zellen) wurde zu gleichen Teilen auf die beiden vorbereiteten Kulturflaschen verteilt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die passagierten HEK 293-Zellen wieder in den Brutschrank verbracht. Das Aussäen von Zellen als Vorbereitung zur Transfektion weicht etwas vom genannten Schema (Passage) ab. Nachdem das alte Medium vorsichtig abgesaugt worden war, wurden die am Boden haftenden Zellen mit Dulbecco´s PBS (Dulbecco‘s Phosphate Buffered Saline, D-PBS, Fa. Biowest, Nuaillé Frankreich) ein bis dreimal durch vorsichtiges Aufträufeln und Absaugen mit einer Pasteurpipette gewaschen. Um die adhärenten Zellen vom Boden zu lösen, wurden 2,5 ml vorgewärmte 1x Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Biowest, Nuaillé Frankreich) zugegeben und die Zellen wurden 1 min bei 37°C bebrütet. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden 3 ml neues Medium (mit FKS) zupipettiert. Das Zellgemisch wurde anschließend in ein 10 ml Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 2.500 x *g*, +4°C). Der zellfreie, trypsinhaltige Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 7 ml Vollmedium resuspendiert und davon jeweils 1 ml in eine 6-Well-Platte (Fa. Techno Plastic Products, Schweiz) pipettiert, in die 3 ml Vollmedium pro Well vorgelegt wurden. Unter dem Mikroskop wurde das Vorhandensein von Zellen überprüft und die Platte wurde für 24 h im Brutschrank bis zur Transfektion inkubiert.

Die transiente Transfektion mit dem pCLCA4a-Plasmid in HEK 293-Zellen erfolgte nach mikroskopischer Wachstumskontrolle der am Vortag ausgesäten HEK 293-Zellen in die 6-Well-Platte (70 bis 90% Konfluenzoptimum). Sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden mit 400 µl Transfektionsmedium (DMEM ohne FKS) befüllt, dazu wurden je 2 µg Plasmid-DNA pipettiert und es erfolgte zum Membranaufschluss der HEK 293-Zellen eine Zugabe von je 3 µl Transfektionsreagenz TurboFect™ (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot). Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnte von der Well-Platte das alte Medium abgesaugt werden und 4 ml Vollmedium wurden auf die Zellen geträufelt. In jedes Well wurden 400 µl des TurboFect-Plasmid-Gemisches geträufelt. Drei Wells wurden mit den drei erfolgreich gewonnenen Klonen von pCLCA4a beimpft. Als Kontrollen der Transfektion wurden mCLCA6-Plasmid-DNA (bereitgestellt von M. Bothe, Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin; Bothe et al., 2008) und mCLCA3-Plasmid-DNA (bereitgestellt von L. Mundhenk, Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin; Mundhenk et al., 2006) mitgeführt. Die Negativkontrolle erfolgte durch Transfektion von pcDNA3.1(+) ohne Insert. Die Platte wurde 24 h im Brutschrank zur Transfektion belassen.

3.8.1 Zelllyse und Gewinnung des Proteins mittels Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) ist eine Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Protein aus einer Lösung präzipitiert wird. Damit ist eine Anreicherung spezifischen Proteins möglich. Vorbereitend wurde das alte Medium von der 6-Well-Platte nach Wachstumskontrolle der transfizierten Zellen abgesaugt und verworfen. Danach wurden die transfizierten Zellen wie in 3.8 beschrieben mit D-PBS gewaschen, in Falcons überführt und abzentrifugiert (3 min, 4.000 x *g*, +4°C). Nach Absaugen des Überstandes wurde zu den Falcons (Zellpellet am Boden) 800 µl Standard-Lysispuffer (siehe 3.14), versetzt mit Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete Mini EDTA-free (Fa. Roche, Mannheim, 1 Tablette / 10 ml Lösung), gegeben und das Pellet resuspendiert. Die Lösung (Proteine waren durch Membranaufschluss jetzt frei in Lösung) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (11.000 x *g*, 15 min, +4°C) wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße pipettiert und das Pellet (enthielt Zelltrümmer) verworfen. Zu den Proben wurden jeweils anti-pCLCA4a-Antikörper (siehe 3.4) im Überschuss in aufsteigenden Konzentrationen zum Protein pipettiert (Tabelle 14). Das mCLCA3-Protein war mit dem Antikörper p3b (gerichtet gegen ein Epitop im amino-terminalen Spaltprodukt des mCLCA3-Proteins) in einer vergangenen Studie bereits erfolgreich in der IP getestet worden (Mundhenk et al., 2006) und wurde daher als Positivkontrolle für die IP mitgeführt.

Tabelle 14: Antikörper-Protein-Verdünnungen für die Immunopräzipitation

Präzipitiertes Protein	**Polyklonaler Antikörper** Jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen		
	10 µl/ml	**20 µl/ml**	**30 µl/ml**
pCLCA4a	p4a-C-1a (carboxy-terminaler AK, 876 bis 889) p4a-N-1b (amino-terminaler AK, 357 bis 370)		
pcDNA3.1(+) (Negativkontrolle)	3 Kontrollen: mit p4a-C-1a, p4a-N-1b, p3b		
mCLCA3 (Positivkontrolle)	p3b (amino-terminaler AK)		

Zur Entstehung von Antigen-Antikörperkomplexen wurden die Proben (Antikörper und Protein aus Zelllysat) 2h bei +4°C getaumelt und so vermischt. Anschließend wurden zu jeder Probe 20 µl Präzipitationsmatrix Protein A/G Plus Agar (50% [Masse/Volumen] Fa. Santa Cruz Biotechnologie, CA, USA) pipettiert, um eine Bindung des AG-AK-Komplexes an die A- und G-Proteine mit dem Fc-Teil des Antikörpers zu erreichen. Über Nacht wurden die Proben bei +4°C getaumelt. Am nächsten Tag wurden die Präzipitationsmatrix abzentrifugiert

(20 s, 6.500 x *g*, +4°C) und der Überstand abgenommen. Der Komplex wurde zuerst zweimal mit 1 ml Waschpuffer I (0,5% Triton-X-100; 0,05% DOC in PBS) und danach zweimal mit Waschpuffer II (500 mM NaCl; 0,5%Triton-X-100; 10 mM EDTA; 125 mM Tris-HCL, pH 8,0) gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurde der Komplex bei 6.500 x *g* und +4°C für 20 s abzentrifugiert. Nach dem Waschvorgang wurden die Proben jeweils in 2,5 µl 5x Probenpuffer (Tris/HCl pH 6,8 250 mM, SDS 10%, Glycerin 50%, Dithiothreitol (DTT) 500 mM, Bromphenolblau 0,05%) aufgenommen und nach den in 3.9 und 3.10 aufgeführten Protokollen analysiert. Für die IP aus Organlysaten (Zäkum, Jejunum, Herz und Auge) wurde das gleiche Schema wie oben beschrieben verfolgt. Dafür wurden je 20 µl Antikörperlösung (optimale Verdünnung) zu den Organlysaten zu gegeben.

3.8.2 Gewinnung des Proteins mittels Ethanolpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand sowie Zelllyse

Für die Ethanolpräzipitation zur Gewinnung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand wurde auf die transfizierten HEK 293-Zellen nach der Transfektionszeit (altes Medium zuvor abgesaugt) neues Medium (ohne FKS) aufgeträufelt (400 µl/Well) und die HEK 293-Zellen wurden weitere 5 h im 37°C-Brutschrank inkubiert. Der Zellkulturüberstand (enthielt nun produziertes und von der Zelle abgegebenes Protein) wurde anschließend in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (2.400 x *g*, 5 min, +4°C), um alle noch vorhandenen Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, mit der doppelten Menge eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt und 24 h bei -20°C inkubiert, so dass sich Protein als Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes sammelte. Am nächsten Tag wurde nach Zentrifugation (20 min, 14.000 x *g*, +4°C) der Überstand verworfen und das entstandene Pellet wurde bei Raumtemperatur über Kopf getrocknet. Das Pellet wurde zuletzt in 200 µl Standard-Lysispuffer (3.14) mit Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete Mini, EDTA-free (1 Tablette / 10 ml Lösung; Fa. Roche, Mannheim) resuspendiert. Zur Gewinnung von Zellpellet wurden die Zellen nach Überstandsabnahme (am Vortag) mit D-PBS wie in 3.8.1 beschrieben gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit 200 µl Standard-Lysispuffer und Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete Mini, EDTA-free (1 Tablette / 10 ml Lösung Fa. Roche, Mannheim) vom Boden abgespült, in dem Puffer lysiert und 30 min bei +4°C geschwenkt. Die Zellreste wurden dann bei +4°C, für 15 min und 13.000 x *g* abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung in neue Reaktionsgefäße überführt.

3.9 Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese

Dieses Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einer Matrix, basierend auf Polyacrylamid (PAA) und Natriumdodecylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS), angewendet. Dabei wurde mit dem System Mini-Protean™ II Elektrophorese-System (Fa. Biorad, München) gearbeitet. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Methode wurde das mCLCA3-Protein aus Zelllysat mitgeführt und mit dem etablierten Antikörper α-p3b2 inkubiert (Leverkoehne und Gruber, 2002). Die Proben (Organlysate (3.5.4) bzw. Protein aus der IP, Zellkulturüberstand und Zelllysat (3.8) mussten folgendermaßen vorbereitet werden: Die Lysate wurden so vorverdünnt (mit Standard-Lysispuffer, 3.14), dass 10 µl 20 µg Protein entsprachen. Die Proteinkonzentrations-bestimmung wurde bereits in Kapitel 3.5.4 erläutert. Als Nächstes wurden 2,5 µl 5x Probenpuffer (Tris/HCl pH 6,8 250 mM, SDS 10%, Glycerin 50%, Dithiothreitol (DTT) 500 mM, Bromphenolblau 0,05%) zugegeben. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C auf dem Heizblock (Fa. Grant, Cambridge, UK) erhitzt. Für die Untersuchung wurden, je nach Molekulargewicht in Kilodalton (kDa), unterschiedlich prozentige Gele für die Proteinauf-trennung gegossen. Die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgelen werden in der folgenden Tabelle 15 genannt. Die 10%ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) wurde als letzte Komponente hinzugefügt. Als Protein-Molekulargewichts-standard wurde die Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Leiter (Fa. Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) mit auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Reagenz	Trenngel			Sammelgel
	7,5%	10%	12%	
Polyacrylamid 30% (Roth)	2,5 ml	3,3 ml	4 ml	0,5 ml
Aqua bidest.	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	1,7 ml
TEMED (Roth)	5 µl			3 µl
Trenngelpuffer (3.14)	2,6 ml			0 ml
Sammelgelpuffer (3.14)	0 ml			0,78 ml
APS 10% (Roth)	50 µl			30 µl
Gesamtvolumen	10 ml			3 ml

Als erstes wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Bei Raumtemperatur polymerisierte das Gel, in Abhängigkeit des Anteils an Polyacrylamid (PAA), in ca. 30 bis 60 min. Das Isopropanol wurde abgegossen und dann wurde das Sammelgel aufgetragen. Zur Bildung von Probentaschen wurde der Gelkamm schnell eingesetzt. Das Sammelgel musste 30 min härten. Der Gelkamm wurde vorsichtig entfernt und die entstandenen Probentaschen wurden mit Aqua destillata (Aqua dest.) gespült, um Luftblasen zu entfernen. Die Glasplatten wurden in die vorgesehene Laufkammer verbracht, die mit 1x Proteingellaufpuffer (Tris Base 25mM, Glycin 192 mM, SDS 0,1%) gefüllt wurde. Die Probentaschen des Gels wurden mit den vorbereiteten Proben (je 10 µl Probe, das entsprach entweder 20 µg oder 40 µg Protein bzw. dem Marker beladen. Initial wurde für 10 min eine Spannung von 70 V angelegt, bis die Proben im Trenngel waren. Dann wurde die Spannung auf 100 V erhöht und solange belassen, bis die Proteinproben für eine anschließende Beurteilung aufgetrennt waren.

3.10 Westernblotanalyse

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in kaltem (+4°C) Blotpuffer (Tris Base 25 mM, Glycin 192 mM, Methanol 10%) geschüttelt. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) wurde 15 s mit 100%igem Methanol angefeuchtet, in Aqua dest. 2 min gewässert und dann 5 min in kaltem Blotpuffer geschüttelt. Danach wurde das Gel in eine Klappkammer mit folgendem Sandwichaufbau verbracht: Schwamm (Fa. Biorad, München) - zwei Filterpapiere (Fa. Whatman, Dassel) - Gel - PVDF Membran - zwei Filterpapiere - Schwamm. Die Klappkammer wurde dann in die Elektrodenkammer gesetzt, welche mit kaltem Blotpuffer angefüllt wurde. Um eine annähernd konstante Blottemperatur (+4°C) zu gewährleisten, wurde die Blotapparatur mit einem Kühlakku versehen und der Blotpuffer mit einem Magnetrührer bei +4°C während des Blotvorgangs gerührt. Bei einer Spannung von 100 V war der Proteintransfer nach 1 h beendet. Zur verbesserten Proteinbindung wurde die Membran nach dem Proteintransfer 10 s in 100%igem Methanol geschwenkt und dann 15 min luftgetrocknet. Die Membran wurde danach nochmals 5 min in Methanol geschwenkt und zuletzt 2 min mit Aqua dest. gewässert. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen folgte die Blockade der Membran mit Roti®-Block (Fa. Roth, Karlsruhe) 1:10 in Aqua dest., für 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der jeweilige spezifische Erstantikörper zur Proteindetektion aufgebracht und die Membran mit diesem über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Verdünnungen der Erstantikörper in TTBS (siehe 3.14) werden in Tabelle 16 dargestellt. Der Zweitantikörper (Tabelle 16) inkubierte am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen der Membran (mit TTBS für jeweils 10 min) für 2h bei Raumtemperatur.

Tabelle 16: Eingesetzte Erst- und Zweitantikörper und deren optimale Verdünnungen für die Westernblotanalysen des pCLCA4a-Proteins

Erstantikörper	Protein / Epitop	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
p4a-C-1a	pCLCA4a (carboxy-terminal) AS: 876 bis 889	1:5.000	Goat anti-rabbit IgG H+L Pox (Jackson Dianova)	1:10.000
p4a-N-1b	pCLCA4a (amino-terminal) AS: 357 bis 370	1:5.000	Goat anti-rabbit IgG H+L Pox (Jackson Dianova)	1:10.000
α-p3b2	mCLCA3 (amino-terminal) AS: 253 bis 267	1:5.000	Goat anti-rabbit IgG H+L Pox (Jackson Dianova)	1:10.000
am6-N-1a	mCLCA6 (amino-terminal) AS: 85 bis 98	1:20.000	Goat anti-rabbit IgG H+L Pox (Jackson Dianova)	1:10.000
anti-β-Actin (Sigma)	β-Actin	1:100.000	Goat anti-mouse IgG+IgM H+L Pox (Jackson Dianova)	1:200.000

Die Membranen wurden nach Inkubation des Zweitantikörpers wieder dreimal für je 10 min mit TTBS gewaschen und anschließend mit dem Pierce ECL Western Blotting Substrat (Fa. Thermo Scientific, Rockford, USA) entwickelt. Dafür wurden jeweils aus Reagenz A und Reagenz B 1 ml Substrat zusammengeführt und die Membran wurde für 1 min mit dem Substrat inkubiert. Die Detektion erfolgte anschließend mit dem ChemiDOC™ und XRS Dokumentationssytem (Fa. Biorad, München). Alle Organlysate, Zelllysate und Überstände (siehe 3.5.4 und 3.8) wurden zunächst mittels des anti-β-Actin Antikörpers auf Anwesenheit des Referenzproteins β-Actin untersucht. Dieses Protein wird in nahezu allen Zellen exprimiert und diente als Expressions- und Ladungskontrolle. Nachdem die Membran erfolgreich auf β-Actin-Banden getestet worden war, wurde sie für den Nachweis des gesuchten Proteins (pCLCA4a, bzw mCLCA3 und mCLCA6) gestrippt. Ziel dieses Vorganges war es, die Membran von den gebundenen Antikörpern (β-Actin + Zweitantikörper) zu befreien und damit erneut eine Hybridisierung mit dem Erstantikörper zu ermöglichen. Dies ließ die Detektion der Proteine auf exakt derselben Membran zu. Dafür wurde die Membran zunächst zweimal für 30 min mit Strippingpuffer (1,5% Glycin, 0,1% SDS, 1,0% Tween 20, pH 2,2) gewaschen. Dann folgten zwei Waschvorgänge für je zweimal 10 min mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und TTBS (siehe 3.14). Schließlich wurde die Membran, wie zuvor beschrieben, geblockt und dann mit dem Erstantikörper inkubiert. Als Positivkontrollen

für den Westernblot wurden das mCLCA3-Protein mit dem spezifischen Antikörper α-p3b2 (Leverkoehne und Gruber, 2002) und das mCLCA6-Protein mit dem spezifischen Antikörper am6-N-1a (Bothe et al., 2008) inkubiert. Als Spezifitätskontrolle des Antikörpers wurde der Erstantikörper mit seinem spezifischen Peptid präinkubiert (20 µg Peptid pro 1 ml Antikörperlösung für 30 min bei Raumtemperatur). Nach der Inkubation mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid wurden spezifische Proteinbanden nicht mehr detektiert.

3.11 Bestimmung des Glykosylierungsmusters

Zur Bestimmung des Glykosylierungsmusters von pCLCA4a wurde das Protein mittels der Glykosidasen PeptideN-GlykosidaseF (PNGaseF) und Endo-alpha-N-acetylgalactosaminidaseH (EndoH) einem enzymatischen Verdau unterzogen (Kobata, 1992; Robbins et al., 1984; Maley et al., 1989; Tarentino et al., 1985). Das Enzym EndoH spaltet Asparagin-verknüpfte, Mannose-reiche Oligosaccharide. Diese Form der Glykosylierung findet im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt. PNGaseF kann zusätzlich auch die komplexen Glykosylierungen spalten, welche beim Weitertransport in den Golgi-Apparat stattfinden und EndoH-resistent sind. Für den Versuch wurden von dem Protein aus dem Zelllysat bzw. dem Überstand (siehe 3.8.1) 63 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht und zu diesem wurden 7 µl 10x Denaturierungspuffer (5% SDS, 0,4 M DTT, Fa. New England Biolabs, Frankfurt) gegeben. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 95°C erhitzt. Für den EndoH Verdau wurden aus dem denaturierten Ansatz 21,5 µl in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 2,5 µl 10 x G5 - Puffer (500 mM Natriumcitrat, pH 5,5, Fa. Biolabs, Frankfurt) und 0,5 µl EndoH (500 U/µl; Fa. Biolabs, Frankfurt) gegeben. Für den PNGaseF Verdau wurden 19 µl des Lysats entnommen, die mit 2,5 µl G7 – Puffer (500 mM Na_2PO_4, pH 7.5, Fa. Biolabs, Frankfurt), 2,5 µl NP-40 (10 % NP-40 in H_2O, Fa. Biolabs, Frankfurt) und 0,5 µl PNGaseF (500 U/µl; Fa Biolabs, Frankfurt) versetzt wurden. Die restlichen 20 µl Lysat aus dem Denaturierungsansatz wurden als Negativkontrolle ohne enzymatischen Verdau eingesetzt. Die Deglykosylierung fand bei 37°C für 60 min statt. Die nun enzymatisch verdauten Proben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und nach 10 min Erhitzung auf dem Heizblock (Fa. Grant, Cambridge, UK) gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert, wie in 3.9 und 3.10 beschrieben.

3.12 Laser Capture Microdissection zur Proteomanalyse

Zur Anreicherung von spezifischen Zellpopulationen aus Gewebe wurde die Laser Mikrodissektion (engl.: *laser capture microdissection*, LCM; Emmert-Bucket al., 1996) angewendet. Bei der LCM wird eine thermoplastische Membran, auf welcher sich ein Gewebe-

schnitt befindet, von einem Infrarot- oder Ultraviolett-Laser geschmolzen. Dabei verschmilzt die inerte Membran mit dem Gewebeausschnitt und durch Lichtenergie kann so organisches Material gezielt geschnitten werden, welches anschließend durch einen Laserimpuls gegen die Schwerkraft in ein Reaktionsgefäß katapultiert wird. Für die LCM zur Gewinnung spezifischer Zellpopulationen und anschließender Proteomanalyse wurde die Methode nach Craven angewendet (Craven und Banks, 2003). Zunächst wurden 8 µm Kryostatschnitte vom Jejunum (siehe 3.5.2) angefertigt, welche auf Membranobjektträger (Membrane Slides, Palm, Fa. Carl Zeiss AG, Jena) aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder gleich gefärbt und danach eingefroren. Das Färbeprotokoll für die Schnitte wird in nachfolgender Tabelle 17 dargestellt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete Mini, EDTA-free (Fa. Roche, Mannheim) versetzt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 4 min aufgetaut und in 70%igem Ethanol für 1 min fixiert. Die Färbelösungen wurden in 50 ml Falcons angesetzt und für die Färbung wurden die Schnitte in die vorbereiteten Falcons getaucht.

Tabelle 17: Färbeprotokoll für die Kryostatschnitte zur Proteomanalyse vor LCM

Lösung	Zeit
1. Färbung	
Mayer´s Hämatoxylin (Roth, Karlsruhe)	30 s
Wasser (Ultra Pure Water, Biochrome)	2x je 10 s dippen
Scott´s Wasser (5g Mg-Sulfat, 1g Na-Bicarbonat, 500 ml A.dest.) (Sigma, St. Louis, USA)	10 s
Eosin 1% (Chroma, Münster)	20 s
Wasser (Ultra Pure Water, Biochrome)	10 s dippen
2. Dehydrierung	
70% Ethanol	30 s
100% Ethanol	1 min
Xylol	2x je 5 min

Für die anschließende Laser Mikrodissektion wurde mit der PALM Micro Beam-Technologie (Fa. Carl Zeiss AG, Jena) und der Software *PALM Robov3.2* gearbeitet. In den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes wurden für die Suspendierung der katapultierten Zellen 30 µl 2x SDS-Page Lysispuffer (2 ml 0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,6 ml Glycerin; 3,2 ml 10% SDS; 0,8 ml β-Mercaptoethanol; 0,4 ml 0,1% Bromphenolblau) gegeben. Das Reaktionsgefäß und der Objektträger wurden in die dafür vorgesehenen Vorrichtungen verbracht. Es wurden Jejunumzotten und Muskelgewebe aus dem Jejunum ausgelasert. Die Laserfläche betrug jeweils ca. 6 x 10^6 µm². Das Reaktionsgefäß mit Puffer und Lasermaterial wurde anschließend abzentrifugiert und es schlossen sich die SDS-Page-Gelelektrophorese und die Westernblotanalyse (siehe 3.9 und 3.10) zur Proteinidentifizierung an.

3.13 Immunhistochemischer Nachweis des pCLCA4a-Proteins

Der immunhistologische Nachweis des pCLCA4a-Proteins erfolgte nach der *Labelled Strept-Avidin-Biotin-Methode* (LSAB). Da durch die Immunhistochemie (IHC) mit Paraffinschnitten (siehe 3.5.1) keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden für die IHC Kryostatschnitte verwendet (siehe 3.5.2). Dafür wurden die bei -80°C aufbewahrten Kryostatschnitte für 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Nachfolgend wurden die Schnitte 3 min mit phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*, PBS, siehe 3.14) gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde mit 180 ml 100%igem Methanol und 10 ml 30%igem Wasserstoffperoxid für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer geblockt. Nach erneuter Spülung mit PBS wurden die Objektträger in Coverplates® (Fa. Thermo Electron GmbH, Dreieich) verbracht und diese wurden in die passenden Träger gestellt. Die Coverplates wurden mit PBS + 0,5% Triton X-100 auf Dichtigkeit überprüft und dann noch zweimal gespült. Zum Blockieren von potenziellen unspezifischen Bindungsstellen am Gewebeschnitt wurden die Schnitte mit Ziegen-Normal-Serum (Fa. Dako Cytomation, Glostrup, DK) 1:5 verdünnt mit PBS + 2% Bovinem Serumalbumin (BSA) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Erstantikörper p4a-N-1b (FB) bzw. p4a-C-1a (FB) zur Etablierung der optimalen Antikörperverdünnung jeweils mit PBS + 2% BSA in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1000, 1:2000, 1:3000 und 1:4000) verdünnt. Auf die Objektträger wurden 100 µl der Antikörperlösung pro Schnitt pipettiert und über Nacht bei +4°C inkubiert. Es wurden zwei Kontrollen mitgeführt: Erstens wurden die Präimmunsera in der gleichen Verdünnung wie der jeweilige Erstantikörper als Negativkontrolle eingesetzt. Außerdem wurden die Erstantiköper mit ihren jeweils spezifischen Peptiden präinkubiert, um spezifische Signale zu detektieren, die nach Präinkubation nur noch abgeschwächt vorhanden waren bzw. gänzlich verschwinden sollten. Dabei wird Peptid im Überschuss zum Antikörper gegeben, damit sind

die Antikörper durch die Antigen-Antikörper-Komplexbildung für eine erneute spezifische Bindung mit ihrem Antigen bereits besetzt. Zusätzlich wurden die Erstantikörper je mit einem unspezifischen Peptid (pCLCA1-CKEKNHNKEAPNDQN, Plog et al., 2009; Loewen et al., 2004) inkubiert. Die Präinkubation erfolgte mit 20 µg Peptid pro 1 ml Antikörperlösung für 30 min bei Raumtemperatur, davon wurden je Gewebeschnitt 100 µl auf die Objektträger pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 15 min bei Raumtemperatur aufgewärmt und dann dreimal mit PBS + 1% Tween 20 gewaschen. Der biotinylierte Zweitantikörper Goat-anti-rabbit IgG (Fa. VectorLabs, Burlingham, CA) wurde 1:200 verdünnt mit PBS auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur 60 min inkubiert. Nach dreimaliger Waschung der Schnitte mit PBS + 1% Tween 20 wurde 30 min vor Gebrauch der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex VECTASTAIN Elite ABC Kit (Fa. VectorLabs, Burlingham, CA) angesetzt, je Schnitt 100 µl dieser Lösung aufgetragen und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS + 1% Tween 20 wurden die Schnitte in Glashalter mit Aqua dest. plaziert. Schließlich wurden die Schnitte für 3 bis 5 min in einer 3,3‘-Diamino-benzidintetrahydrochlorid (DAB)-Gebrauchslösung (siehe 3.14) inkubiert. Die Schnitte mussten 10 min in Aqua dest. stehen bevor sie mit Mayer´s Hämatoxylin (siehe 3.14) für 30 s gegengefärbt wurden. Bevor die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2x je 3 min 70% Ethanol (ETOH), 2x 96% ETOH, 3x 100% ETOH, 2x je 5 min Xylol) entwässert werden konnten, wurden sie mit Leitungswasser 10 min gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt.

3.14 Allgemein verwendete Puffer, Lösungen und Chemikalien

Aqua dest. Wasseraufbereitungsanlage des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin (Fa. VEOLIA Water, Berlin)

DAB-Gebrauchslösung: 4 DAB Tabletten (Fa. Merck, Darmstadt) in 180 ml Aqua dest. gelöst und filtriert + 16 µl H_2O_2 30%

dNTP-Mix: 100 mM Stammlösung: 40 µl dATP + 40 µl dTTP+ 40 µl dCTP + 40 µl dGTP, gepoolt und abzentrifugiert, Nuklease-freies Wasser ad 240 µl, EK: 10 mM

DOC (Na-Deoxycholat): Stammlösung (50 mg/ml): DOC in A. dest. gelöst

Eosin-Lösung: Eosin Y 10 g, DEPC-behandeltes Wasser ad 1000 ml, warm gelöst, anschließend filtriert und in einem dunklen Behältnis aufbewahrt. Zum Färben Zugabe von 2 Tropfen Eisessig auf 100 ml Eosin-Lösung

Mayer´s Hämatoxylin: Hämatoxylin 1 g, Natriumjodat 0,2 g, chemisch reines Kalialaun 50 g, Wasser (bzw. DEPC-behandeltes Wasser) ad 1000 ml

Phosphat-gepufferte/ Salzlösung (PBS): 0,8% NaCl, 0,2% KCl, 8 mM Na_2PO_4, 1,5 mM K_2HPO_4, pH-Wert 7,4

PBS-Lösung für IHC: NaCl 40 g, NaH_2PO_4 8,97 g, mit 1 N Natronlauge auf pH-Wert auf 7,0 bis 7,2 eingestellt, Aqua dest. ad 5 l

Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris pH-Wert 6,8; EK: 125 mM, 10% SDS EK: 0,1%

SOB–Medium: Hefeextrakt 0,5% (w/v) (5 g/l), Trypton 2% (w/v) (20 g/l), Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l), Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l), Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM, 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch Zugabe von Nährmedium 20 mM (10 ml/l) einer 2 M Mg^{2+}-Lösung, welche aus 1 M $MgCl_2,\cdot 6H_2O$ und 1 M $MgSO_4 7H_2O$ hergestellt wurde, pH-Wert 6,8 bis 7

Standardlysispuffer: 25 mM Tris-HCl; pH-Wert 8,0; 50 mM NaCl; 0,5%; DOC, 0,5%; Triton-X- 100

TBE-Laufpuffer/ Stammlösung 5x:	54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M, EDTA, pH-Wert 8,0 ad 1 l Aqua dest
TBE-Laufpuffer 0,5x:	5x Stammlösung 1:10 mit A. dest. aufgefüllt
Trenngelpuffer :	5 M Tris, pH-Wert 8,8 EK: 390 mM, 10% SDS EK: 0,1%
Tris Base 1M:	Tris Base 121 g + Aqua dest. 800 ml, pH-Wert eingestellt, Aqua dest. ad 1 l
TTBS:	10 mM Tris-Base; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 0,1% Tween 20

Tabelle 18: Allgemein verwendete Chemikalien und ihre Quellen

Chemikalien	Hersteller	Firmensitz
Aceton	Fa. Merck	Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Agarose	Fa. Bio&SELL	Nürnberg
APS	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Bovines Serum Albumin	Fa. Sigma-Aldrich	München
Bromphenolblau	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Borsäure	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
DEPC	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
DOC	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
DTT	Fa. Sigma-Aldrich	München
EDTA	Fa. Applichem	Darmstadt
Ethanol	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fa. Merck	Darmstadt
Formaldehyd (10% Methanol, 37%)	Fa. Applichem	Darmstadt
Glyzerin	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Glycin	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Fa. Merck	Darmstadt
KCl	Fa. Merck	Darmstadt
K_2HPO_4	Fa. Merck	Darmstadt
Methanol	Fa. Th. Geyer	Renningen
2-Methylbutan	Fa.Carl Roth	Karlsruhe
NaCl	Fa. Merck	Darmstadt
Na_2PO_4	Fa. Merck	Darmstadt
SDS	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
TEMED	Fa. Amersham Biosciences	Freiburg
Trichlormethan/Chloroform 99%	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Tris-Base	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Triton-X-100	Fa. Carl Roth	Karlsruhe
Tween-20	Fa. Applichem	Darmstadt
Wasser (Ultra Pure Water)	Fa. Biochrome	Berlin
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Th. Geyer	Renningen

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenetische Einordnung

Um die verwandtschaftliche Beziehung der CLCA-Familienmitglieder zu veranschaulichen und die Beziehung des neuen CLCA-Vertreters pCLCA4a zu den übrigen Mitgliedern der *CLCA*-Genfamilie darzustellen, wurde ein phylogenetischer Baum mittels des Analyseprogramms ClustalV erstellt (siehe 3.1).

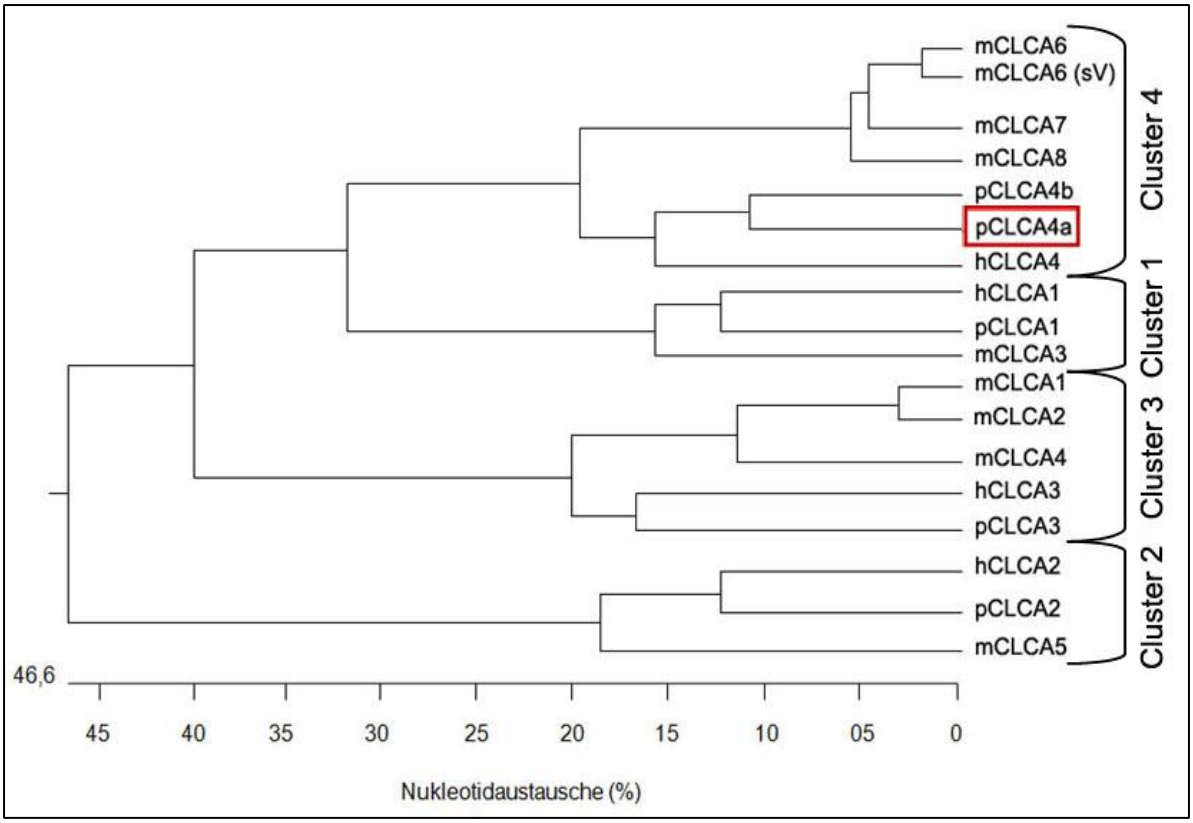

Abb. 1: Phylogenetischer Baum zur Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen der porzinen, humanen und murinen CLCA-Familienmitglieder, pCLCA4a (rot umrandet). Die Erstellung erfolgte mittels des Analyseprogramms ClustalV (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny).

Wie der Abbildung entnommen werden kann, wird der porzine *CLCA*-Genlocus offenbar durch fünf porzine *CLCA*-Gene abgedeckt: *pCLCA1*, *pCLCA2*, *pCLCA3* und *pCLCA4a* und *pCLCA4b*. Plog und ihr Forscherteam stellten fest, dass das *pCLCA4*-Gen offenbar in zwei Genvarianten vorliegt, *pCLCA4a* und *pCLCA4b* (Plog et al., 2009). Genetisch eng verwandte CLCA-Gensequenzen sind jeweils in Cluster zusammengefasst. Die vier Cluster entsprechen der Nomenklatur der humanen CLCA-Vertreter 1 bis 4. pCLCA4a steht in einem phylogenetischen Cluster mit dem murinen mCLCA6-Vertreter und einer Splicevariante

dieses Vertreters, mCLCA6 (sV), dem humanen hCLCA4 und dem porzinen pCLCA4b, dies zeigt ihren hohen Verwandtschaftsgrad. Auffallend ist auch, dass nicht jeder Homologe einer Spezies einen entsprechenden Orthologen in einer anderen Spezies besitzt, z.B. gibt es bei der Maus acht Vertreter, beim Menschen existieren dagegen nur vier. Das Schwein wiederum besitzt fünf CLCA-Homologe. Welche Unterschiede hinsichtlich der Funktionalität der CLCA-Proteine möglicherweise aus dieser scheinbar inter-speziesspezifischen Evolution resultieren, ist bislang unklar.

4.2 Die pCLCA4a-Proteinstruktur nach *in silico*-Analysen

4.2.1 Potenzielle Signalsequenzen

Die Signalsequenz eines Proteins ist eine Abfolge von Aminosäuren (AS), deren Sequenz über den Bestimmungsort und den Transportweg des Proteins innerhalb der Zelle entscheidet. Typischerweise tragen Proteine, die für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) bestimmt sind, eine amino-terminale Signalsequenz, die sie für einen Transport in den Innenraum des ER markiert und spezifisch zur ER-Membran zielleitet (Signalhypothese nach Blobel und Dobberstein, 1975; Martoglio und Dobberstein, 1998). Charakteristisch ist der zentrale hydrophobe Kern innerhalb der Sequenz. Im Innenraum des ER wird die Signalsequenz von einer Signalpeptidase in der Regel entfernt. Nach *in silico*-Analyse mittels SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) liegt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einer Signalsequenz bei pCLCA4a bei 100%. Eine Spaltstelle zwischen AS 20 und 21 wird mit einer 70,4%igen Wahrscheinlichkeit angenommen. Insgesamt hat pCLCA4a eine Länge von 927 Aminosäuren. Die folgende Abbildung gibt die Signalsequenz schematisch wieder.

Abb. 2: Signalsequenz (AS 1 bis 21) von pCLCA4a nach Vorhersage des Programms SignalP 3.0. Die hydrophobe zentrale Region innerhalb der Sequenz ist blau gekennzeichnet. Die Schere markiert die mögliche Spaltstelle zwischen AS 20 und 21.

4.2.2 Potenzielle Transmembrandomänen

Transmembranproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Phospholipiddoppelschicht einer Membran aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften durchspannen können. Dabei gelten Proteinsegmente mit 20 bis 30 Aminosäuren und einem hohen Anteil an hydrophoben Elementen als geeignet, um eine Membran in Form einer alpha-Helix zu durchspannen. Prinzipiell werden *singlepass*-Transmembranproteine (durchziehen die Membran einmal) von *multipass*-Transmembranproteinen, die die Membran mehrmals durchqueren, unterschieden. Die *singlepass*-Transmembranproteine werden als Typ-1-Transmembranproteine bezeichnet, wenn das amino-terminale Ende extrazellulär liegt, und als Typ-2-Transmembranproteine, wenn dieses intrazellulär lokalisiert ist (Tan, 2008). Mit Hilfe verschiedener Programme und Algorithmen (siehe 3.2) wurde die AS-Sequenz des pCLCA4a-Proteins auf potenzielle Transmembrandomänen (TM) durchsucht. Die folgende Abbildung stellt die favorisierten TM-Modelle vergleichend dar.

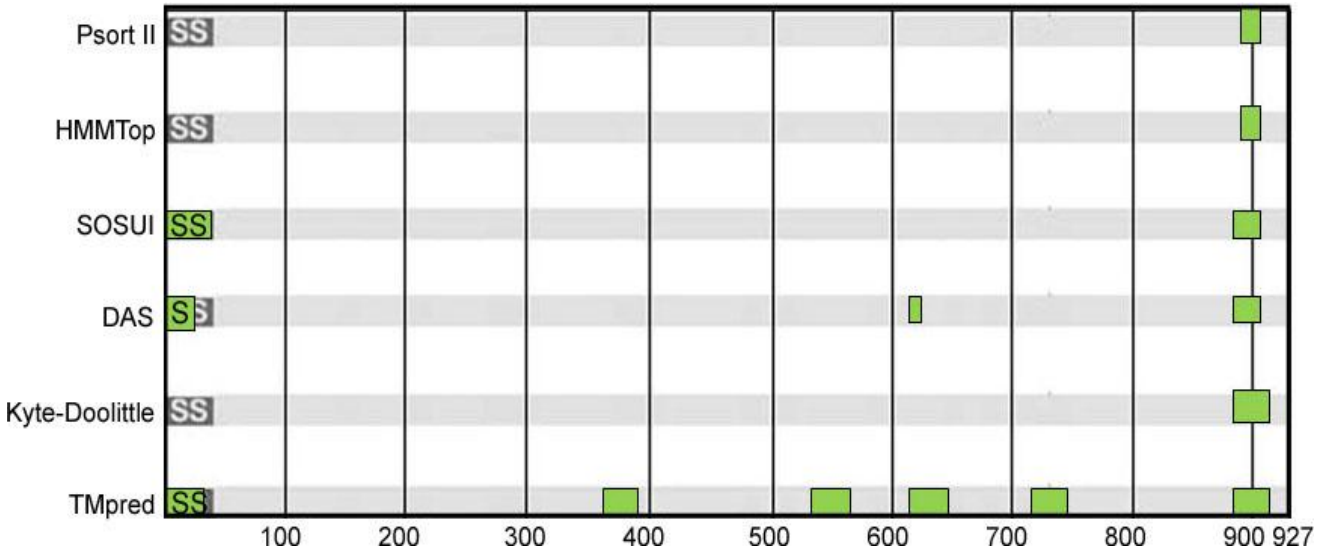

Abb. 3: Vergleichende Darstellung der potenziellen Transmembrandomänen (grün) und deren Positionen innerhalb der pCLCA4a-Aminosäuresequenz (grau) durch die verwendeten Computerprogramme. SS zeigt die Position der angenommenen Signalsequenz.

Nach Psort II (Nakai und Horton, 1999) besitzt pCLCA4a eine Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 891 bis 907. Dabei liegt das carboxy-terminale Ende des Proteins der AS 908 bis 927 im Zytoplasma. Dies deckt sich weitgehend mit den Analysen durch das Programm HMMTop (Tusnady und Simon, 2001). Demnach wird ebenfalls eine Transmembrandomäne für das pCLCA4a-Protein favorisiert, allerdings wird die transmembrane Helix von AS 890 bis AS 912 angegeben. Gestützt wird die Voraussage einer Transmembrandomäne durch SOSUI (Hirokawa et al., 1998). Hier werden zwei trans-

membrane Helices angegeben: eine von AS 886 bis 908 und eine zweite von AS 1 bis 23. Bei der AS-Sequenz 1 bis 23 handelt es sich jedoch um die Signalsequenz des Peptids (siehe 4.2.1), welche im ER abgespalten wird und demnach nicht als Transmembrandomäne vorliegen kann. Die Vorhersagen des *Transmembrane Prediction Servers DAS* (Cserzo et al., 1997) gehen von einem 3-Transmembranmodell aus. Die erste Transmembrandomäne liegt bei AS 6 bis 10 innerhalb der abspaltbaren Signalsequenz (siehe 4.2.1) und kann demnach vernachlässigt werden. Die zweite potenzielle TM liegt bei AS 621 bis 624, diese Aminosäuresequenz hat lediglich eine Länge von nur vier Aminosäuren und scheint daher nicht geeignet für eine Funktion als transmembranduchspannende Helix. Hierfür sind, wie eingangs erwähnt, mindestens 20 Aminosäuren nötig. Die angenommene dritte Transmembrandomäne von AS 886 bis 910 stimmt jedoch weitgehend mit den Analysen der zuvor genannten Programme überein. Auch die Analysen durch Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) favorisieren eine Transmembrandomäne um AS 900. Lediglich die TMpred-Analyse (Hofman und Stoffel, 1993), welche auf einem Vergleich mit bekannten Transmembranproteinen beruht, gibt sechs mögliche Transmembrandomänen für das pCLCA4a-Protein an: AS 1 bis AS 18 (diese Sequenz kann nicht als Transmembrandomäne interpretiert werden, da es sich um die abspaltbare Signalsequenz handelt), AS 368 bis 386, AS 536 bis 560, AS 611 bis 630, AS 726 bis 746 und AS 890 bis 913. Lediglich letztgenannte AS-Sequenz (890 bis 913) deckt sich mit den zuvor genannten Analysen. In der folgenden Abbildung wird das favorisierte Transmembranmodell nach SOSUI für pCLCA4a dargestellt.

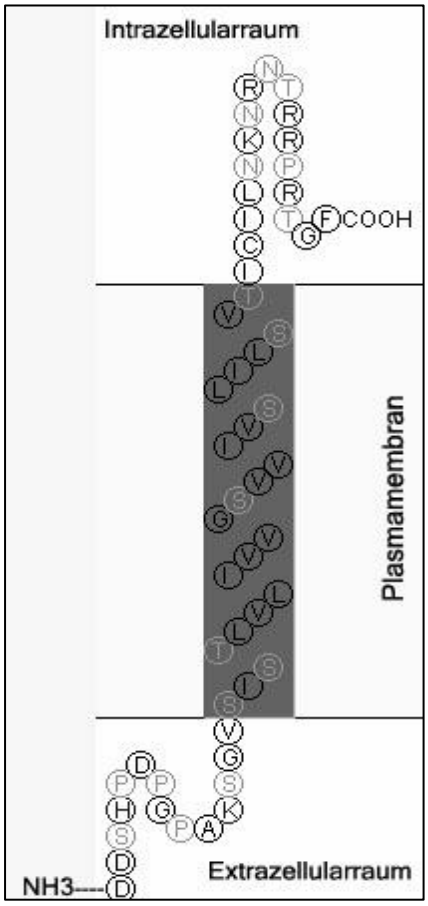

Abb. 4: Graphische Darstellung des favorisierten Transmembranmodells für das pCLCA4a-Protein nach Vorhersagen des Programms SOSUI (Hirokawa et al., 1998). Es handelt sich um ein *singlepass*-Transmembranprotein vom Typ 1. Eine TM mit einer Länge von 22 AS mit überwiegend hydrophoben Anteilen durchspannt die Zellmembran. Dabei liegt der amino-terminale Teil des Proteins extrazellulär. Die kürzere carboxy-terminale Einheit befindet sich intrazellulär.

4.2.3 Potenzielle Asparagin-Glykosylierungsstellen und die mutmaßliche Spaltstelle

Die Asparagin (N)-Glykosylierung von Proteinen ist eine Proteinmodifikation, die sowohl für die Stabilität der Proteinstruktur und die Proteinfaltung als auch für die spätere Funktion des Proteins bedeutsam ist (Abe et al., 2004; Helenius und Aebi, 2001). Die N-glykosidische Verknüpfung der Proteine mit Zuckerresten findet kotranslational im Endoplasmatischen Retikulum statt. Die potenziellen Empfänger der Glykane sind Asparagine innerhalb der Konsensussequenz: Asparagin - X - Serin/Threonin, wobei X als Synonym für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht (Welply et al., 1983). N-glykosidisch gebundene Glykoproteine werden nach dem Anteil und der Art der enthaltenen Monosaccharide in drei Gruppen unterteilt: Mannose-reicher Typ (*high*-Mannose), komplexer Typ (*complex*) und Hybrid-Typ (Spiro et al., 1974). Der Mannose-reiche Typ zeichnet sich durch einen überwiegenden Anteil an Mannose-Resten aus. Glykoproteine vom komplexen Typ können neben Mannose einen hohen Anteil anderer Zuckerreste enthalten. Als Hybrid wird eine Mischform aus beiden Typen bezeichnet. Mit Hilfe des NetGlyc 1.0 Servers wurde das pCLCA4a-Protein hinsichtlich potenzieller N-Glykosylierungsstellen durchmustert. Laut den Analysen wurden insgesamt 10 mögliche Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen angenommen (bei AS 74, 85, 282, 337, 501, 533, 808, 829, 834 und 849) von denen voraussichtlich alle außer AS 808 und AS 849 tatsächlich glykosyliert werden, da die Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens bei über 50% liegt (Abb. 5).

Eine charakteristische Eigenschaft aller bisher untersuchten CLCA-Proteine ist eine posttranslationale Spaltung eines Vorläuferproteins in ein größeres, amino-terminales und ein kleineres, carboxy-terminales Spaltprodukt um AS 680 (Patel et al., 2009). Proteinbiochemische Experimente im Rahmen dieser Forschungsarbeit zeigten, dass auch pCLCA4a diese posttranslationale Spaltung erfährt (siehe 4.5.2; Abb. 8). Die genaue Spaltstelle für pCLCA4a ist bisher noch unbekannt, geht man jedoch von einer ähnlich lokalisierten Spaltstelle um AS 680 aus, liegen demnach sechs N-Glykosylierungsstellen in dem größeren amino-terminalen Spaltprodukt und zwei in dem kürzeren carboxy-terminalen Spaltprodukt. In der folgenden Abbildung 5 werden die potenziellen N-Glykosylierungsstellen innerhalb der AS-Sequenz schematisch dargestellt.

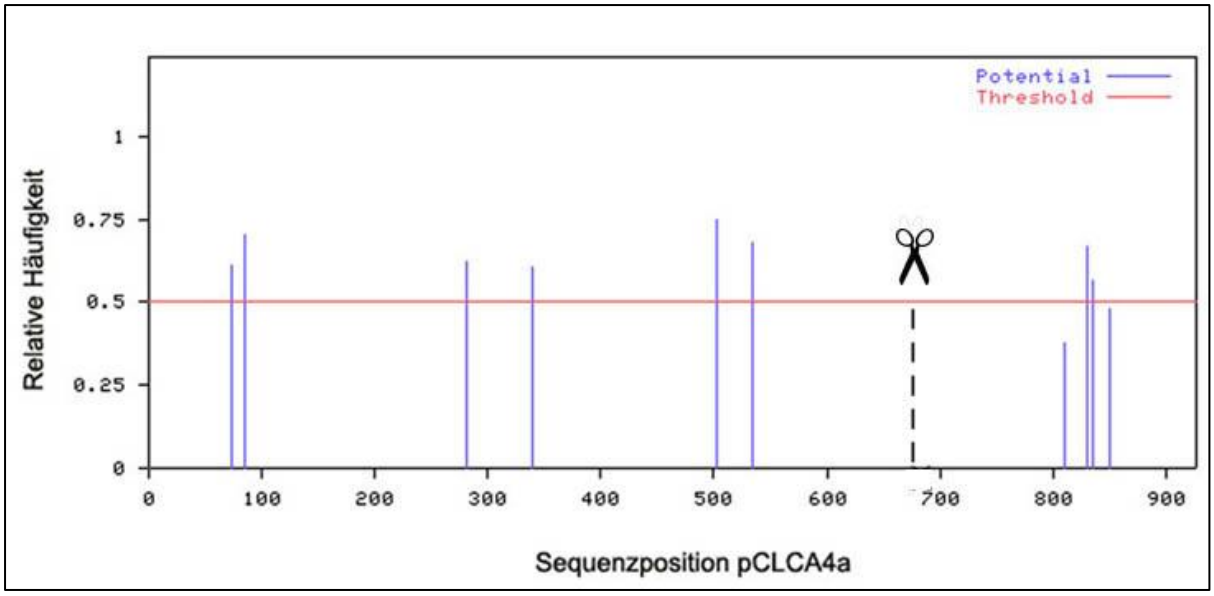

Abb. 5: Schematische Darstellung der potenziellen Glykosylierungsstellen innerhalb der pCLCA4a-Sequenz nach Analysen des NetGlyc 1.0 Servers. Blau sind alle möglichen Glykosylierungsstellen an der jeweiligen AS-Sequenz markiert. Die rote Markierung gibt die Grenze an, ab der die potenziellen Glykosylierungsstellen als tatsächlich vorhanden angenommen werden können. Die Schere zeigt die angenommene Spaltstelle innerhalb des Proteins.

4.3 Das gewebliche mRNA-Expressionsmuster von pCLCA4a

Um den Erfolg der mRNA-Isolierung (3.5.3.2) und der anschließenden cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (siehe 3.5.3.3) mit einer relativ einfachen, aber präzisen Methode zu überprüfen, wurden alle Organproben zunächst mittels konventioneller PCR mit den Primern (EF-1a F1 / EF-1a R1) eines Referenzgens (EF-1alpha) geprüft (Gruber und Levine, 1997). Dabei konnte in allen Proben das Referenzgen EF-1alpha nachgewiesen werden. Die qualitative Überprüfung auf das Vorhandensein des Referenzgens (EF-1alpha) wurde bei drei Schweinen durchgeführt, von denen jeweils ein Organspektrum (siehe 3.3) durchmustert wurde. Zur Ermittlung des Expressionsmusters von pCLCA4a auf mRNA-Ebene fand parallel der qualitative Nachweis mittels konventioneller PCR unter Verwendung der pCLCA4a-spezifischen Primer P4-F2 und P4-R2 in den Organen statt. Als Positivkontrolle wurde die cDNA aus der Klonierung von pCLCA4a eingesetzt. Der Nachweis wurde ebenfalls an den drei Schweinen durchgeführt. Zur Verifizierung wurde das PCR-Produkt einer externen Sequenzierung unterzogen (Fa. SeqLab, Göttingen). Die Sequenzanalysen durch BLAST ergaben eine 97%ige Übereinstimmung mit pCLCA4a und eine 91% Übereinstimmung mit pCLCA4b. Durch den Vergleich der Sequenzen der Amplifikationsprodukte mit den bekannten Sequenzen aus der DNA-Datenbank GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) von pCLCA4a durch BLAST konnte eine Fehleramplifikation

widerlegt und die Spezifität der gewählten Primer (P4-F2 / P4-R2) nachgewiesen werden. Auch konnten Kreuzreaktionen mit anderen pCLCA-Vertretern (pCLCA4b, pCLCA1, pCLCA2) ausgeschlossen werden. Diese Analysen deckten sich mit den PCR-Ergebnissen aus den Kreuzversuchen mit pCLCA4b, pCLCA1 und pCLCA2 unter Verwendung der pCLCA4a-spezifischen Primer, bei denen der pCLCA4b-ORF, pCLCA1-ORF bzw. der pCLCA2-ORF als Template eingesetzt wurden. Zusätzliche Produkte wurden nicht amplifiziert. Bei den Negativkontrollen traten keine Amplifikate auf. Die folgende Abbildung 6 zeigt das mRNA-Expressionsmuster für pCLCA4a, die PCR-Ergebnisse für das Referenzgen EF-1alpha und die Ergebnisse aus den Kreuzversuchen mit pCLCA4b, pCLCA1 und pCLCA2. Repräsentativ werden hier nur die Ergebnisse eines Schweins dargestellt. Die Ergebnisse deckten sich mit den PCR-Ergebnissen für die anderen beiden Schweine. Zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse wurden alle Versuche unter gleichen Bedingungen zweimal wiederholt.

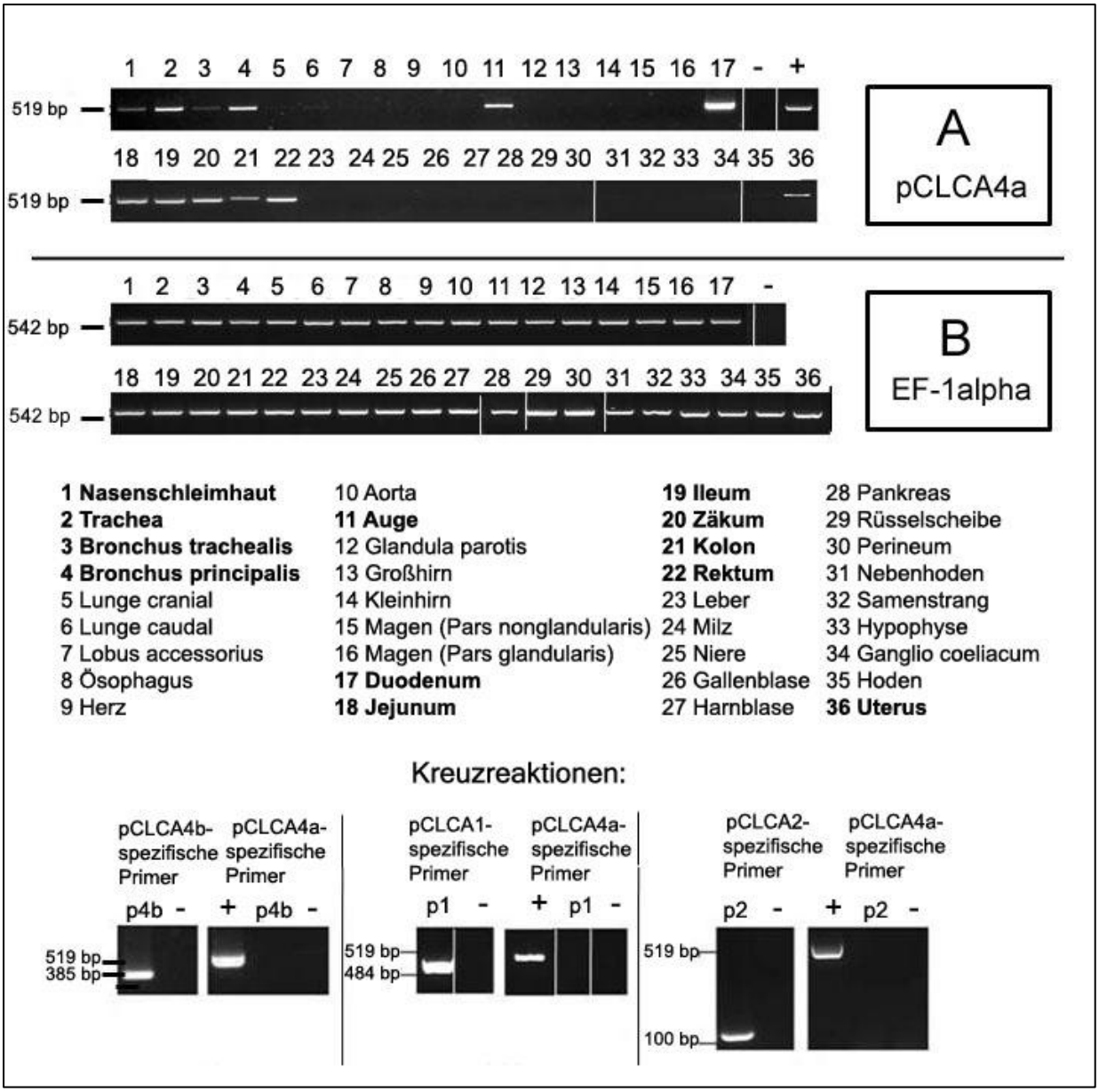

Abb. 6: pCLCA4a ist auf mRNA-Ebene im oberen Respirationstrakt (A 1-4), im gesamten Darmtrakt (A 17-22), im Auge (A 11) und im Uterus (A 36) exprimiert. Zudem erfolgte in allen Organen der Nachweis des EF-1alpha Referenzgens (B). Mögliche Kreuzreaktionen mit pCLCA4b (p4b), pCLCA1 (p1) und pCLCA2 (p2), konnten ausgeschlossen werden, denn durch die pCLCA4a-spezifischen Primer entstanden keine Amplifikate (unten). Als Vergleichskontrollen wurden jeweils der pCLCA4b-, pCLCA1- bzw der pCLCA2-ORF zur Amplifikation mit ihren spezifischen Primern eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde der pCLCA4a-ORF in die PCR eingesetzt, für die Negativkontrolle (-) gelangte der PCR-Mix ohne Template in die PCR.

Nach den PCR-Ergebnissen aus Abbildung 6 ist pCLCA4a in den oberen Luftwegen (Nasenschleimhaut, Trachea, Bronchus trachealis und Bronchus principales) schwach exprimiert und in allen Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum, Kolon, Rektum) stark exprimiert. Außerdem ist pCLCA4a auf mRNA-Ebene stark im Auge und schwach im Uterus vertreten.

4.4 Die Sequenz des Offenen Leserahmens von pCLCA4a

Der Offene Leserahmen von pCLCA4a wurde entsprechend der in Kapitel 3.6 aufgeführten Protokolle amplifiziert und anschließend durch die Fa. SeqLab (Göttingen) sequenziert. Die Gesamtlänge des ORF von pCLCA4a betrug nach Sequenzanalysen der Fa. SeqLab 3178 bp, was die Amplifizierung des gesamten ORF (siehe Kapitel 3.6) mittels PCR bestätigte. Auch konnte die richtige Lage des Leserahmens im Vektor verifiziert werden. Untersuchungen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ergaben eine 100%ige Übereinstimmung der durch SeqLab analysierten Sequenz mit der aus der Sequenzierung der BAC-Klone ermittelten Sequenz (Plog et al., 2009). Außerdem wurde mittels BLAST nach Kreuzreaktivitäten gesucht. Dabei ergab sich eine 87%ige Übereinstimmung zu dem pCLCA4a-Duplikat pCLCA4b. BLAST verfolgt dabei das Prinzip des paarweisen Sequenzalignments und spürt so lokale Sequenzabschnitte auf, die mehr oder weniger große Ähnlichkeit mit bereits in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen haben und kalkuliert die statistische Signifikanz ihrer Kompatibilität. Mögliche Basenaustausche innerhalb der Sequenz konnten ausgeschlossen werden, auch gab es keine Verschiebungen des Leserahmens oder vorzeitige Stopcodons, somit kann davon ausgegangen werden, dass pCLCA4a auch tatsächlich als Protein exprimiert wird.

4.5 Proteinbiochemische Charakteristika von pCLCA4a

4.5.1 Kriterien der Antikörpergenerierung

Gemäß des postulierten Modells einer universellen posttranslationalen Proteinprozessierung der CLCA-Proteine wird das CLCA-Vorläuferprotein (~120-kDa) in ein größeres amino-terminales Spaltprodukt (~85 kDa) und ein kleineres carboxy-terminales Produkt (~35 kDa) um AS 680 gespalten (Patel et al., 2009). Auch proteinbiochemische Studien zu dem murinen pCLCA4a-Orthologen mCLCA6 bestätigten dieses Modell weitgehend (Vorläuferprotein: ~125 kDa, amino-terminales Spaltprodukt: ~110 kDa, carboxy-terminales Produkt: ~35 kDa (Bothe et al., 2008). Basierend auf diesem Modell wurden für das pCLCA4a-Protein zwei polyklonale Antikörper generiert (siehe 3.4). Ein Antikörper richtete sich gegen ein Epitop, welches im angenommenen amino-terminalen Spaltprodukt des Proteins liegt (p4a-N-1b), der andere Antikörper richtete sich gegen ein im angenommenen carboxy-terminalen Spaltprodukt gelegenes Epitop (p4a-C-1a). Als Antikörper für die proteinbiochemischen Analysen wurden die Antisera aus der finalen Blutung eingesetzt. Folgende Abbildung zeigt die Proteinsequenz und die Lage der generierten Antiköper gegen pCLCA4a.

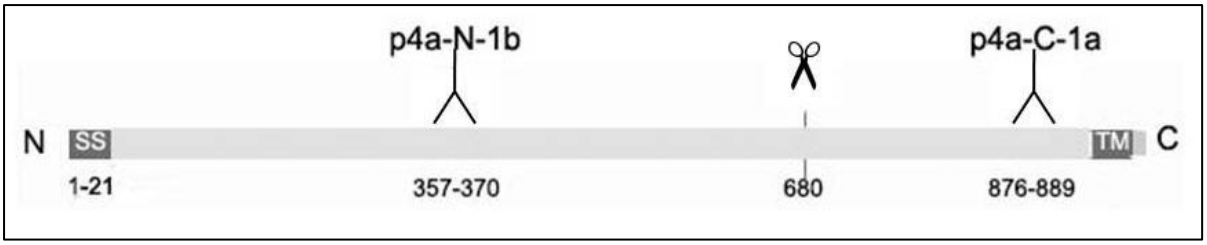

Abb. 7: Schematische Darstellung der pCLCA4a-Proteinsequenz mit den Positionen der generierten anti-pCLCA4a-Antikörper. SS kennzeichnet die abspaltbare Signalsequenz. Die Schrere markiert die vermutete Stelle der posttranslationalen Spaltung um AS 680. TM bezeichnet die angenommene Transmembrandomäne.

4.5.2 Detektion des amino-terminalen und des carboxy-terminalen Spaltprodukts von pCLCA4a in Zelllysat und Zellkulturüberstand sowie Nachweis der posttranslationalen Spaltung

Studien an mCLCA6, dem murinen Orthologen zu pCLCA4a, ergaben nach Westernblotanalysen von Zelllysat und Zellkulturüberstand (Medium) transient transfizierter HEK 293-Zellen eine Detektion des amino-terminalen Spaltprodukts durch den amino-terminalen Antikörper sowohl im Zelllysat als auch im Überstand (Medium). Das carboxy-terminale Spaltprodukt hingegen wurde ausschließlich im Zelllysat durch den carboxy-terminalen Antikörper detektiert. Das Vorläuferprotein wurde durch beide Antikörper im Zelllysat, aber nicht im Zellkulturüberstand detektiert (Bothe et al., 2008). Bothe und Mitarbeiter schlussfolgerten, dass mCLCA6 mittels einer carboxy-terminalen Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert sei und nur das amino-terminale Spaltprodukt in den Überstand sezerniert werden könne. Aufgrund der Eigenschaft der posttranslationalen Spaltung des Vorläuferproteins der CLCA-Proteinfamilie in eine größere amino-terminale und eine kleinere carboxy-terminale Untereinheit, die für alle bisher untersuchten CLCA-Vertreter festgestellt wurde (Patel et al., 2009), wurde das Verhalten beider Spaltprodukte von pCLCA4a in Medium und Zelllysat getrennt untersucht. Das Phänomen der posttranslationalen Spaltung konnte nach Westernblotanalysen ebenfalls bei pCLCA4a beobachtet werden (Abb. 8), denn beide Antikörper detektierten unterschiedlich große Produkte. Das amino-terminale größere Spaltprodukt mit ~110 kDa wurde sowohl im Medium als auch im Zelllysat durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) nachgewiesen (Abb. 8). Der carboxy-terminale p4a-C-1a-Antikörper detektierte zwei verschiedene carboxy-terminale Spaltprodukte bei ~52 kDa und ~40 kDa ausschließlich im Zelllysat. Im Medium konnten mit diesem Antikörper keine spezifischen Banden detektiert werden (Abb. 8).

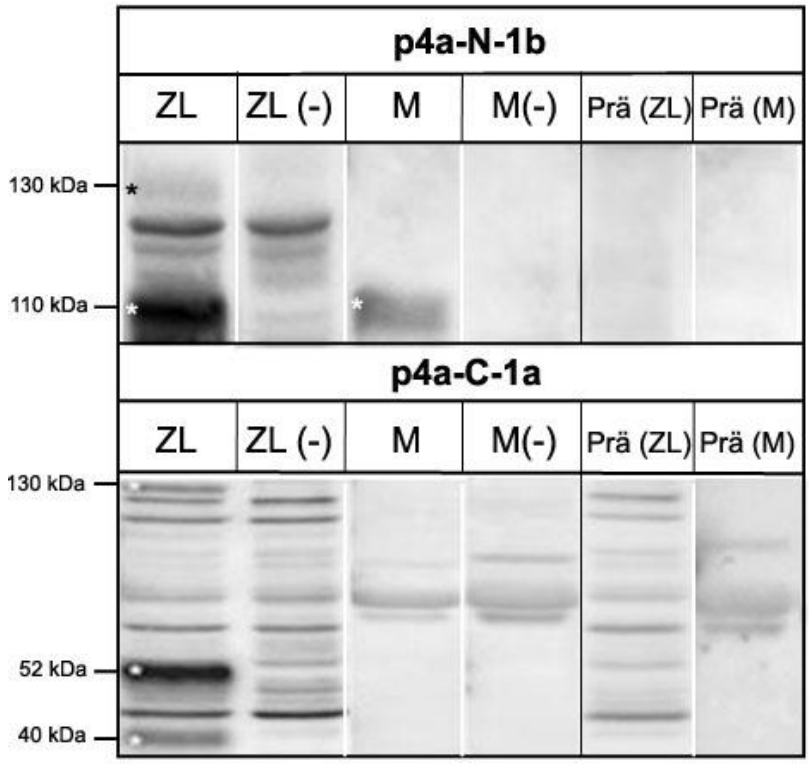

Abb. 8: Nur das amino-terminale Spaltprodukt (110 kDa) wird in das Medium (M) transient transfizierter HEK 293-Zellen sezerniert und durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) detektiert. Der gleiche Antikörper erkannte sowohl das Vorläuferprotein (130 kDa) als auch das amino-terminale Spaltprodukt (110 kDa) im Zelllysat (ZL). Der carboxy-terminale Antikörper (p4a-C-1a) detektierte ebenfalls das Vorläuferprotein (130 kDa) und das carboxy-terminale Spaltprodukt, welches in zwei verschiedenen Formen vorliegt (52 kDa und 40 kDa) im Zelllysat. Dieser Antikörper detektierte keine spezifischen Banden im Medium. Als Negativkontrolle (-) wurde Zelllysat nach transienter Transfektion mit dem Vektor pcDNA 3.1(+) in HEK 293-Zellen eingesetzt. Die Präinkubation (Prä) wurde als Verifizierung der spezifischen Banden eingesetzt. Die Sternchen (*) markieren spezifische Banden. Alle anderen Banden werden als unspezifisch angenommen.

Das amino-terminale größere Spaltprodukt mit ~110 kDa wurde sowohl im Medium als auch im Zelllysat durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) nachgewiesen (Abb. 8). Der carboxy-terminale p4a-C-1a-Antikörper detektierte zwei verschiedene carboxy-terminale Spaltprodukte bei ~52 kDa und ~40 kDa ausschließlich im Zelllysat. Im Medium konnten mit diesem Antikörper keine spezifischen Banden detektiert werden. Ebenso wie sein muriner Orthologe mCLCA6 (Bothe et al., 2008) wurde bei pCLCA4a das Vorläuferprotein mit einer Molekülmasse von~130 kDa ausschließlich im Zelllysat sowohl durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) als auch durch den carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) detektiert. Als Negativkontrolle wurden die HEK 293-Zellen nur mit dem Vektor pcDNA3.1(+) transfiziert. Die Präinkubation, bei der die Antikörper jeweils mit ihrem spezifischen Peptid im Überschuss vorinkubiert und so „neutralisiert“ wurden, diente als Kontrolle zur Verifizierung der spezifischen Banden.

4.6 Die gewebliche Verteilung von pCLCA4a in den Organen des Schweins

Mit den Ergebnissen aus der Westernblotanalyse des Zelllysats konnte die Spezifität der beiden verwendeten Antikörper (p4a-N-1b und p4a-C-1a) gezeigt werden. Beide Antikörper wurden eingesetzt, um auch die Organlysate mittels Westernblot zu analysieren und so das gewebliche Expressionsmuster von pCLCA4a auf Proteinebene auszumachen. Für die Analysen wurden nur die Organlysate eingesetzt, die auch in der PCR (siehe 4.3; Abb. 6) bzw. der Immunhistochemie (siehe 4.8) starke spezifische Signale zeigten (alle Darmabschnitte, oberer Atmungstrakt und Auge).

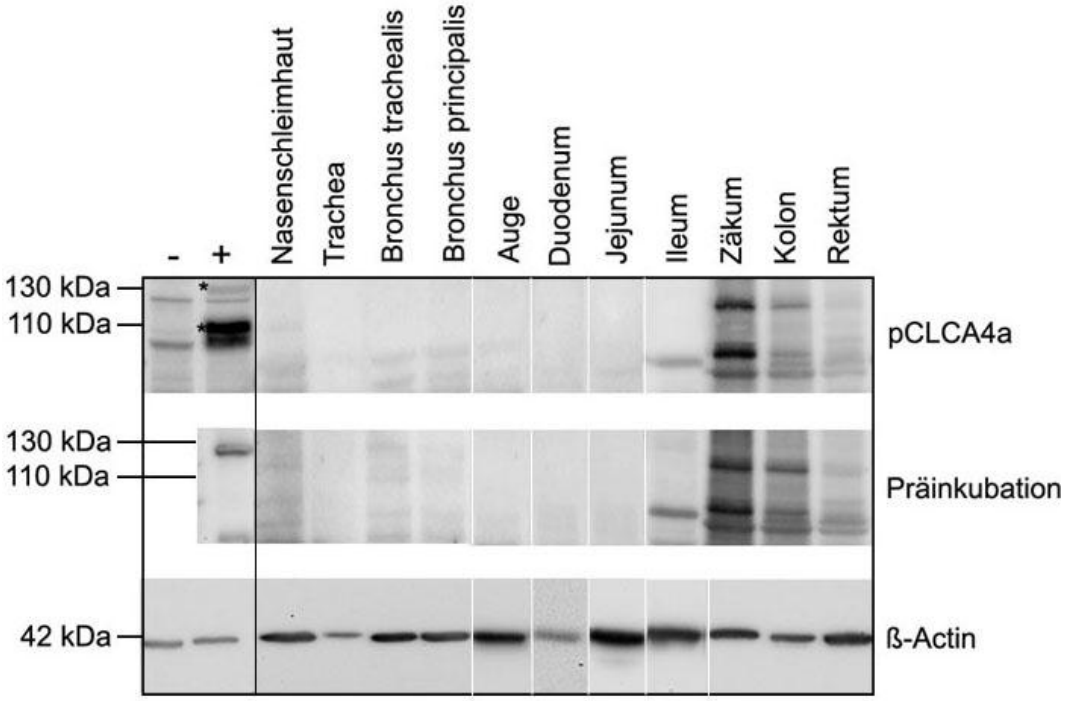

Abb. 9: pCLCA4a ist in den Organlysaten mittels Westernblot durch die pCLCA4a-spezifischen Antikörper nicht detektierbar. Der Nachweis des Referenzproteins β-Actin (42 kDa) ist in allen Organlysaten gelungen. Die Positivkontrolle, pCLCA4a-Plasmid transfizierte HEK 293-Zellen (+), zeigt das Vorläuferprotein (130 kDa) und das amino-terminale Spaltprodukt (110 kDa), die durch den amino-terminalen Antikörper detektiert werden konnten. Die Sternchen (*) kennzeichnen spezifische Banden. Als Negativkontrolle (-) wurde Zelllysat nach transienter Transfektion mit dem Leervektor in HEK 293-Zellen eingesetzt. Alle anderen Banden werden als unspezifisch angenommen.

Wie der Abbildung 9 entnommen werden kann, wurden keine spezifischen Banden in den Organen durch die etablierten Antikörper detektiert, obwohl die Proteinkonzentrationen von anfänglich 20µg/10µl (pro Geltasche) auf 40µg/10µl erhöht wurden. Hingegen gelang der Nachweis des Referenzproteins β-Actin mit einer Bandengröße von ~42 kDa in allen untersuchten Organen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Untersuchung bei zwei

Schweinen durchgeführt und jeweils zweimal reproduziert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse exemplarisch bei einem Schwein. Es werden hier nur die Ergebnisse, die durch die Detektion mit dem amino-terminalen Antikörper p4-N-1b erreicht werden konnten gezeigt. Im Zelllysat (+) der mit pCLCA4a-Plasmid transfizierten HEK 293-Zellen sind spezifische Banden durch beide Antikörper (p4a-N-1b und p4a-C-1a) detektiert worden. Das Vorläuferprotein wurde im Zelllysat durch den amino-terminalen Antikörper bei ~130 kDa detektiert und das amino-terminale Spaltprodukt bei ~110 kDa. Der carboxy-terminale Antikörper detektierte ebenfalls das Vorläuferprotein. Das carboxy-terminale Spaltprodukt wurde bei ~52 kDa und ~40 kDa spezifisch durch den Antikörper erkannt (Detektion durch den carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) nicht dargestellt). Die Banden bei ca ~125 kDa, ~90 kDa und ~80 kDa im Ileum, Zäkum, Kolon und Rektum sind unspezifisch, da sie gleichermaßen auch nach Präinkubation des Antikörpers bestehen blieben (Abb. 9).

Aufgrund der Tatsache, dass kein Protein in den Organlysaten nachgewiesen werden konnte, wurde mittels Lasermikrodissektion (engl.: *laser capture microdissection*; LCM; siehe 3.12) versucht das Protein anzureichern und so im Westernblot zu detektieren. Das Verfahren ermöglichte die Gewinnung von spezifischen Zellpopulationen. Es wurden Jejunumzotten ausgelasert, da pCLCA4a sowohl in der immunhistologischen Untersuchung als auch in der PCR im Jejunum detektiert werden konnte (siehe hierzu die Ergebnisse aus 4.3 und 4.8). Für die Negativkontrolle wurde Muskelgewebe des Dünndarms ausgelasert. Jeweils wurden 6 x 10^6 µm² des ausgelaserten Zellmaterials für die anschließende Westernblotanalyse eingesetzt. Wie auch bei den vorangegangenen Westernblotanalysen wurde zunächst das Referenzprotein β-Actin nachgewiesen. Die Membran wurde anschließend gestrippt (siehe 3.10) und dann mit den spezifischen Erstantikörpern (p4a-N-1b und p4a-C-1a) inkubiert. Abbildung 10 zeigt die erzielten Ergebnisse im Westernblot nach LCM.

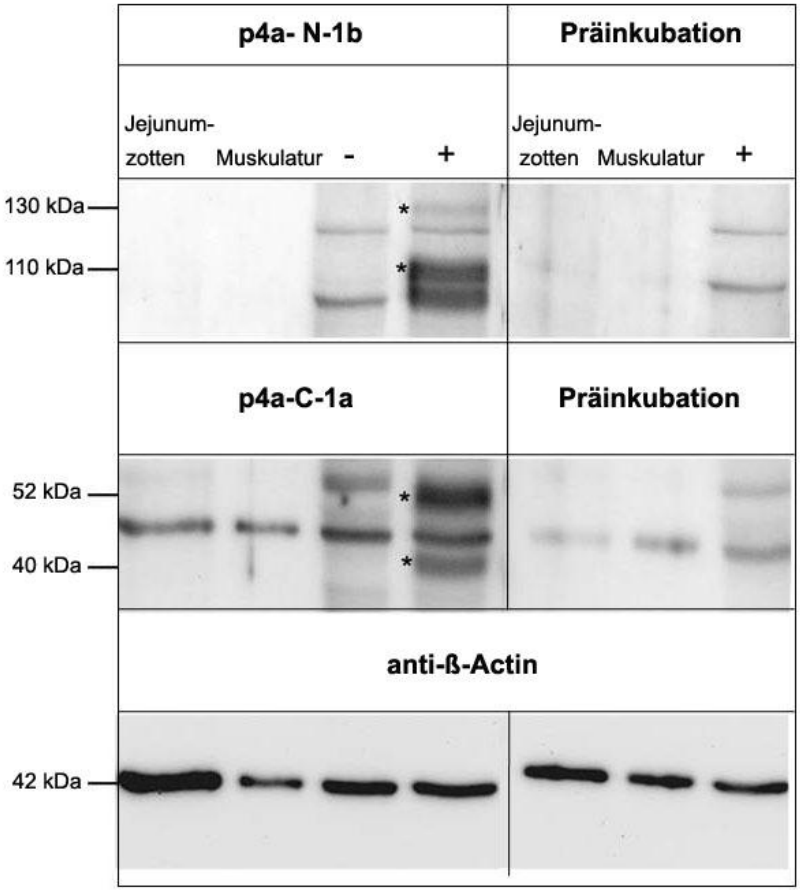

Abb. 10: Sowohl der amino-terminale Antikörper (p4a-N-1b) als auch der carboxy-terminale Antikörper (p4a-C-1a) detektierten keine pCLCA4a-spezifischen Banden in LCM-Material von Jejunumzotten bzw. jejunaler Muskulatur. Der Nachweis des Referenzproteins β-Actin (42 kDa) ist in allen eingesetzten Organlysaten gelungen. pCLCA4a-transfizierte HEK 293-Zellen (+) wurden als Positivkontrolle zur Überprüfung der Methodik des Westernblots und der Funktionalität der Antikörper eingesetzt. Die Negativkontrolle (-) enthielt Zelllysat von mit dem Leervektor transfizierten HEK 293-Zellen. Die Präinkubation diente zur Verifizierung spezifischer Banden. Die Sternchen (*) markieren spezifische Banden. Alle anderen Banden werden als unspezifisch angesehen.

Wie in der Abbildung 10 gezeigt werden kann, ist der Nachweis des ubiquitären Proteins β-Actin gelungen, denn in allen Proben sind spezifische Banden bei ~42 kDa durch den anti-β-Actin Antikörper detektiert worden. Damit ist bewiesen, dass die Methodik der LCM funktionierte. Weiter detektierte der amino-terminale Antikörper (p4a-N-1b) das amino-terminale Spaltprodukt und das Vorläuferprotein im Zelllysat (pCLCA4a-transfizierte HEK 293-Zellen), welches als Positivkontrolle (+) mitgeführt wurde. Die anderen Banden sind unspezifisch, da sie ebenfalls nach der Präinkubation bestehen blieben. Auch der carboxy-terminale Antikörper (p4a-C-1a) erkannte die kleineren pCLCA4a-Spaltprodukte und darüber hinaus wurde das pCLCA4a-Vorläuferprotein detektiert (hier nicht gezeigt). Jedoch sind

weder in den ausgelaserten Jejunumzotten noch in der jejunalen Muskulatur spezifische Banden durch die beiden Antikörper detektiert worden. Es ist demnach auch nach LCM als Verfahren zur Anreicherung spezifischen Proteins nicht gelungen, das pCLCA4a Protein im Jejunum mittels Westernblot zu detektieren.

Die Immunopräzipitation (IP, siehe 3.8.1), bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufkonzentriert wird, wurde als weiterer Versuch durchgeführt, um pCLCA4a-Protein anzureichern und mittels Westernblot nachzuweisen. In Vorversuchen fand die Immunopräzipitation des pCLCA4a-Proteins aus pCLCA4a-transfizierten HEK 293-Zellen mit dem amino-teminalen Antikörper (p4a-N-1b) oder mit dem carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) statt. Die anschließende Westernblotanalyse der Präzipitate erfolgte jeweils mit beiden Antikörpern. Als Positivkontrolle für die IP wurde das mCLCA3-Protein mit dem Antikörper p3b präzipitiert und das amino-terminale Spaltprodukt sowie das Vorläuferprotein wurden mit demselben Antikörper im Westernblot nachgewiesen (Mundhenk et al., 2006). Nur das 130 kDa große pCLCA4a-Vorläuferprotein konnte verlässlich ausschließlich durch eine Präzipitation mit dem carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) und die anschließende Detektion des Präzipitats im Westernblot durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) nachgewiesen werden. Die Spaltprodukte waren nicht detektierbar. Folgendes Schema (Abbildung 11) soll zunächst die IP-Verhältnisse verdeutlichen, mit der die Organlysate untersucht wurden. In nachfolgender Abbildung 12 werden die IP-Ergebnisse im Westernblot dargestellt.

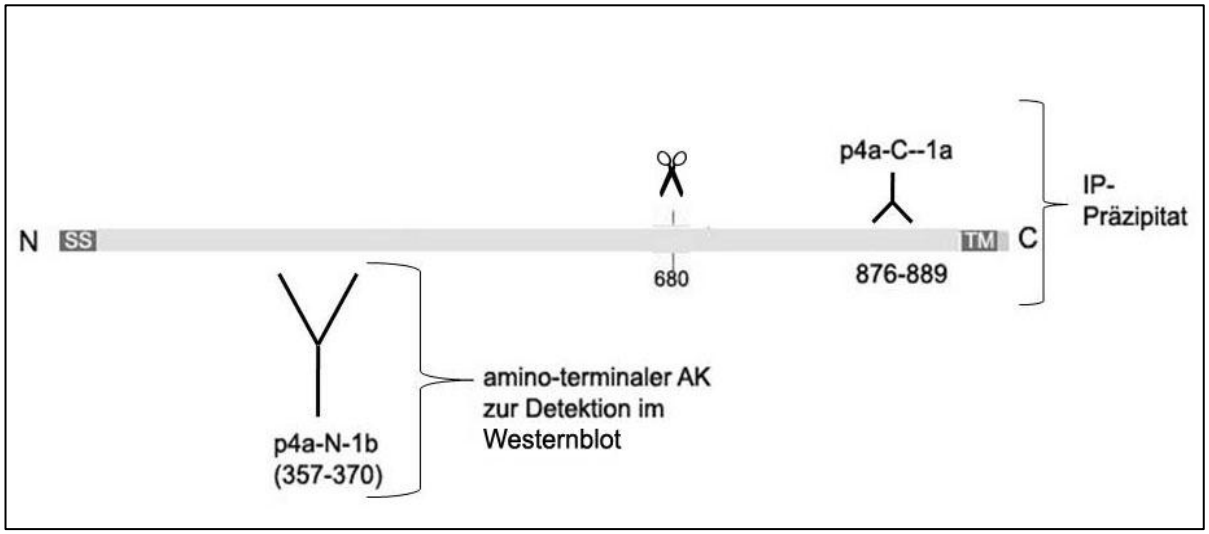

Abb. 11: Schematische Darstellung des IP-Präzipitats [pCLCA4a-Protein und carboxy-terminaler Antikörper (p4a-C-1a)] und Detektion des Präzipitats durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) im Westernblot. SS steht für die Signalsequenz, TM gibt die Position der Transmembrandomäne wieder. Die Schere markiert die vermutete Spaltstelle.

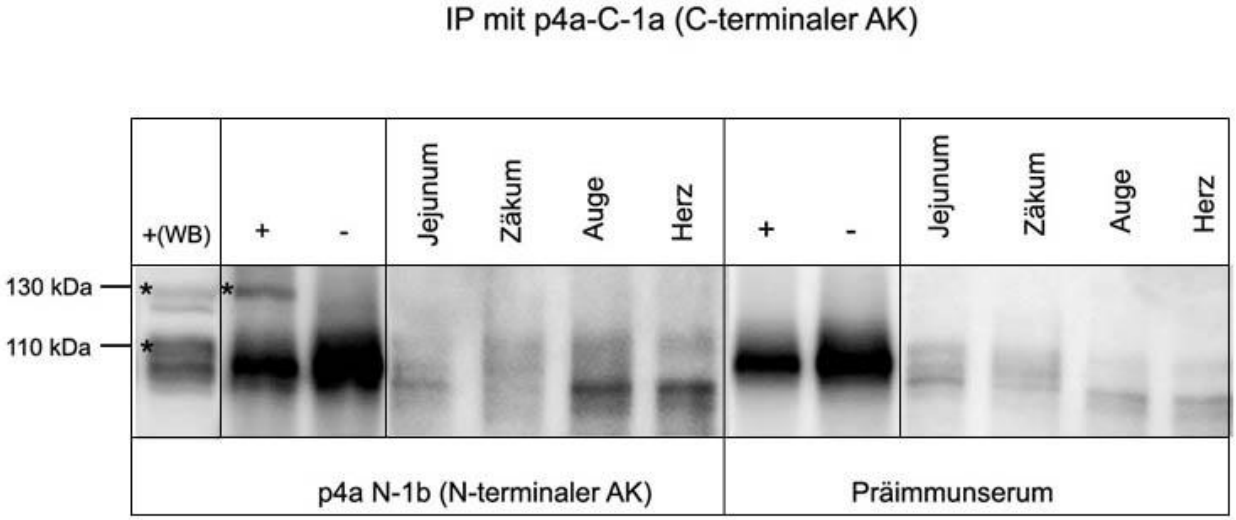

Abb. 12: Aus den Organlysaten wurde pCLCA4a mittels Immunopräzipitation nicht nachgewiesen. Das 130 kDa-pCLCA4a-Vorläuferprotein war nach Immunopräzipitation mit dem carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) und anschließender Westernblotanalyse mit dem amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) aus transfizierten HEK 293-Zelllysaten (+) nachweisbar. Alle anderen Banden werden als unspezifisch angesehen. Zelllysat von mit dem Leervektor transfizierten HEK 293-Zellen (-) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. In den Organlysaten aus Jejunum, Zäkum, Auge oder Herz wurden keine spezifischen Banden nachgewiesen (linke Abbildung). Rechte Abbildung: Westernblot mit Präimmunserum nach Immunopräzipitation, diente zur Überprüfung spezifischer Banden.

Das 130 kDa-Vorläuferprotein konnte nach der Präzipitation des pCLCA4a-Proteins mit dem carboxy-terminalen Antikörper durch den amino-terminalen Antikörper im Westernblot nur aus den Zelllysaten von transfizierten Zellen detektiert werden. Das 110 kDa große amino-terminale Spaltprodukt war nach der Immunopräzipitation nicht nachweisbar. Offensichtlich werden das amino-terminale und das carboxy-terminale Spaltprodukt nicht ko-präzipitiert, wie es zum Beispiel für hCLCA1 und mCLCA3 beschrieben wurde (Gruber et al. 1998a; Mundhenk et al., 2006). Übereinstimmend mit zuvor genannten Westernblotanalysen konnte aber mittels IP und anschließender Westernblotanalyse kein pCLCA4a-Protein in den Organlysaten nachgewiesen werden.

4.7 Das Asparagin-Glykosylierungsmuster von pCLCA4a

Die Glykosylierung zählt zu den wichtigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen, da das Glykosylierungsmuster einerseits für die funktionale Proteinkonformation entscheidend ist, andererseits auch, neben der Signalsequenz eines Proteins, dem Proteintargeting dient (Brooks, 2006). Die Bindung der Oligosaccharide an das Protein kann auf verschiedene Arten erfolgen. Bei der N-glykosidischen Bindung werden Zuckerreste an die Säureamid-Gruppe der Aminosäure Asparagin (N) innerhalb der Sequenz: N - X - Serin/Threonin - (X

steht für eine beliebige Aminosäure außer Prolin) angehängt. Diese Form der Glykosylierung findet ko-translational im endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt. Zur Untersuchung des Glykosylierungsmusters des pCLCA4a-Proteins wurde das Protein einem enzymatischen Verdau durch die Endoglykosidasen EndoH und PNGaseF unterzogen (siehe 3.11). Beide Enzyme spalten Mannose-reiche N-glykosidische Bindungen, die im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) entstanden sind. PNGaseF ist außerdem in der Lage auch komplexe Glykosylierungen zu spalten, welche posttranslational im Golgi-Apparat entstehen (Alberts et al., 2004). Folgende Grafik (Abb. 13) verdeutlicht diesen Sachverhalt. Durch die Spezifizierung der Glykosylierungsform eines Proteins können demnach Rückschlüsse auf das Zellkompartiment gezogen werden, in welchem das Protein modifiziert wird. Anschließend wird das Protein zu seinem Zielort geleitet.

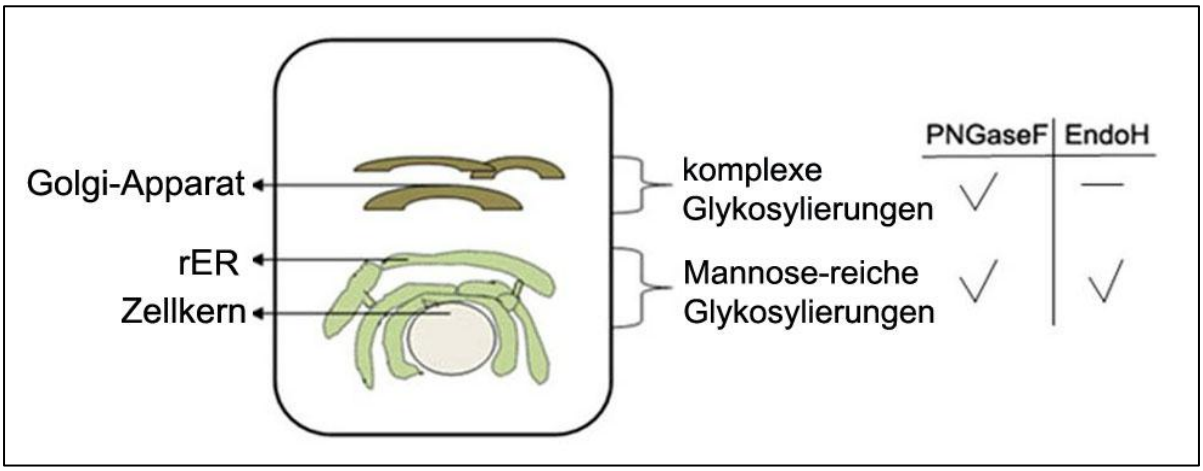

Abb. 13: Schematische Darstellung einer eukaryontischen Zelle und der posttranslationalen Proteinmodifizierung durch N-Glykosylierungen im rER und im Golgi-Apparat. Im rER findet eine Mannose-reiche Glykosylierung statt, die durch PNGaseF und EndoH gespalten werden kann. Im Golgi-Apparat wird die Glykosylierung in eine komplexe Form umgewandelt, welche nur durch PNGaseF deglykosyliert wird.

Das pCLCA4a-Protein aus Zelllysat und aus dem Überstand wurde jeweils enzymatisch einem PNGaseF- bzw. einem EndoH-Verdau unterzogen und anschließend mittels Westernblot analysiert (siehe 3.10). Als Negativkontrolle gelangte unbehandeltes Lysat bzw. Überstand in den Versuch, außerdem wurde pcDNA3.1(+) aus Zelllysat und Überstand in jedem Versuch mitgeführt. Zur Detektion des Proteins wurden entweder der amino-terminale AK (p4a-N-1b) oder der carboxy-terminale AK (p4a-C-1a) verwendet. Da das carboxy-terminale Spaltprodukt nicht im Zellkulturüberstand (Medium, M) detektiert wurde (Abb.8), wurde der Überstand keinem enzymatischen Verdau unterzogen, nur das Zelllysat wurde der Deglykosylierung unterzogen und mit dem carboxy-terminalen Antikörper im Westernblot detektiert. Die erzielten Ergebnisse werden in Abbildung 14 dargestellt.

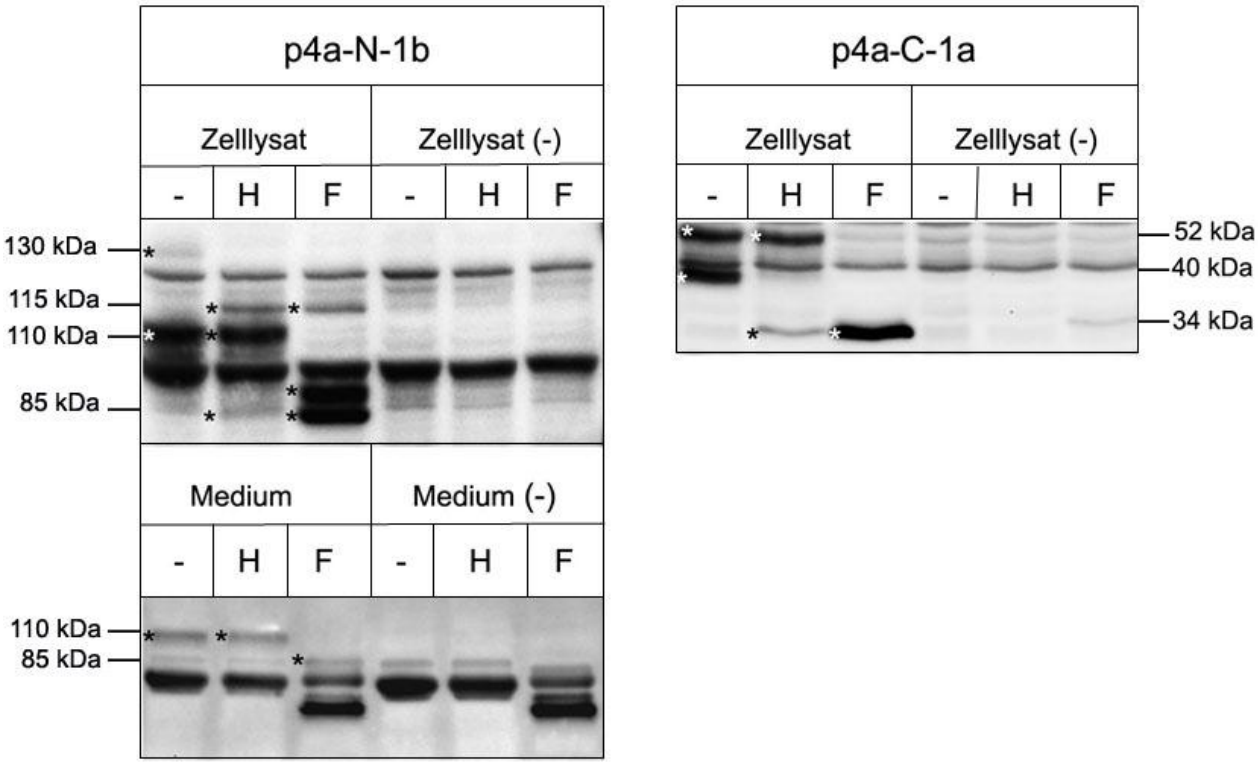

Abb. 14: Das Glykosylierungsmuster des pCLCA4a-Proteins aus Zelllysat und Zellkulturüberstand (Medium) pCLCA4a-transfizierter HEK 293-Zellen weist auf eine Spaltung des Vorläuferproteins im rER hin. Das Vorläuferprotein ist gegenüber PNGaseF und EndoH sensitiv und ist demnach eine Mannose-reiche Form. Das amino-terminale Spaltprodukt wird hauptsächlich durch PNGaseF (F) deglykosyliert, was auf eine komplexe Glykosylierung hinweist. Das carboxy-terminale Spaltprodukt, welches als Doppelbande bei 52 kDa und 40 kDa vorliegt, wird unterschiedlich glykosyliert. Die 52 kDa Bande ist gegenüber PNGaseF sensibel. Die 40 kDa Bande hingegen ist EndoH (H) sensibel. Als Negativkontrolle wurden Zelllysat und Medium unbehandelt eingesetzt [Zelllysat (-)], [Medium (-)]. pcDNA3.1(+) transfizierte Zellen wurden ebenfalls als Kontrolle mitgeführt (-). Die Sternchen zeigen die spezifischen Banden. Alle anderen Banden werden als unspezifisch angesehen.

Die Abbildung zeigt, dass das Vorläuferprotein sowohl durch die EndoH- als auch durch die PNGaseF-Behandlung deglykosyliert wurde. Das Vorläuferprotein wird durch beide Enzyme von ~130 kDa auf ca. ~110 kDa reduziert und stellt somit eine Mannose-reich glykosylierte Form aus dem rER dar. Sowohl der amino-terminale Antikörper (p4a-N-1b) als auch der carboxy-terminale Antikörper (p4a-C-1a, hier nicht gezeigt) detektierten das Vorläuferprotein. Hingegen ist das amino-terminale Spaltprodukt gegenüber EndoH nur teilweise sensitiv und wurde hauptsächlich durch PNGaseF deglykosyliert. Von ~110 kDa wurde das amino-terminale Spaltprodukt als Doppelbande reduziert (~90 kDa und ~85 kDa), somit hat diese Form den Golgi-Apparat erreicht. Im Medium konnte wie bereits oben erwähnt nur das amino-terminale Spaltprodukt detektiert werden (Abb. 8). Dieses wurde ausschließlich durch

die PNGaseF-Behandlung auf ca. 85 kDa reduziert. Dies deutet auf eine komplex-glykosylierte Form hin, die den Golgi-Apparat erreicht hat. Die kurzen carboxy-terminalen Spaltprodukte im Zelllysat (bei ~52 kDa und ~40 kDa) werden unterschiedlich deglykosyliert. Die ~52 kDa Untereinheit war nur gegenüber PNGaseF sensitiv und shiftete auf ca. 30 kDa. Dagegen war die ~40 kDa Untereinheit beiden Enzymen gegenüber sensibel. Demnach handelt es sich bei den beiden Untereinheiten des carboxy-terminalen Spaltprodukts um zwei unterschiedliche Glykosylierungsstufen. Die ~52 kDa Bande ist demnach eine komplex-glykosylierte Form, welche den Golgi-Apparat erreicht hat. Die ~40 kDa Untereinheit hingegen ist eine Mannose-reich glykosylierte Form aus dem rER.

4.8 Zelluläres Expressionsmuster des pCLCA4a-Proteins

Die immunhistochemische Untersuchung hatte zum Ziel, das Expressionsmuster des pCLCA4a-Proteins auf zellulärer Ebene darzustellen. In Vorversuchen wurde mit verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1000, 1:2000, 1:3000 und 1:4000) das Optimum der Antikörperlösung mit 1:4000 auf Jejunumschnitten ermittelt. Da auf Paraffinschnitten keine spezifischen Signale ermittelt werden konnten, wurde ausschließlich mit Kryostatschnitten gearbeitet. Bei dieser histologischen Technik wird die Antigenität des Gewebeschnitts weit besser erhalten als bei Paraffinschnitten. Es treten weniger Artefakte auf, die Hitzedenaturierung und Gewebeschrumpfung, die während der Antigendemaskierung bei der Bearbeitung von Praffinschnitten entstehen, fallen weg. Zudem wurde durch Verwendung unterschiedlicher Waschpuffer versucht, die Hintergrundfärbung zu reduzieren, aber dabei das spezifische Antikörpersignal zu erhalten. Es wurde schließlich ein optimales Verhältnis zwischen Qualität des spezifischen Signals und Reduktion des Hintergrundes durch Waschungen mittels PBS + 1% Tween 20 erreicht. Als negative Reagenzienkontrolle zur Validierung der immunhistochemischen Färbeergebnisse diente die Inkubation von Folgeschnitten mit Präimmunserum in jeweils gleicher Verdünnungsstufe. Außerdem wurde über eine Präinkubation des Erstantikörpers mit seinem spezifischen Peptid eine geeignete Spezifitätskontrolle gefunden. Zudem wurde der Erstantikörper mit einem irrelevanten Peptid (Aminosäuresequenz 250-264 des pCLCA1-Peptids: CKEKNHNKEAPNDQN; Plog et al., 2009) inkubiert. Für die Untersuchungen wurde ein vollständiges Organspektrum von jeweils drei Schweinen durchgemustert. Zur Validierung der erzielten Ergebnisse wurden alle immunhistochemischen Untersuchungen unter gleichen Bedingungen zweimal reproduziert. Alle drei Schweine zeigten die gleiche gewebliche Verteilung in den Organen. Die nachfolgenden Abbildungen (15 bis 17) zeigen die erzielten Ergebnisse. In Abbildung 15 wird die Detektion durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) gezeigt, als negative Reagenzienkontrolle wurde Präimmunserum eingesetzt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse des

carboxy-terminalen Antikörpers (p4a-C-1a) dargestellt, auch hier wurde Präimmunserum als Kontrolle in dem Versuch mitgeführt. Abbildung 17 zeigt die jeweiligen Ergebnisse, die durch die Detektion beider anti-pCLCA4a-Antikörper erzielt wurden. Anders als in den zuerst genannten Abbildungen wurden als Spezifitätskontrollen beide Antikörper zuvor mit ihrem spezifischen Peptid präinkubiert bzw. mit einem irrelevanten Peptid inkubiert und diese in dem Versuch mitgeführt.

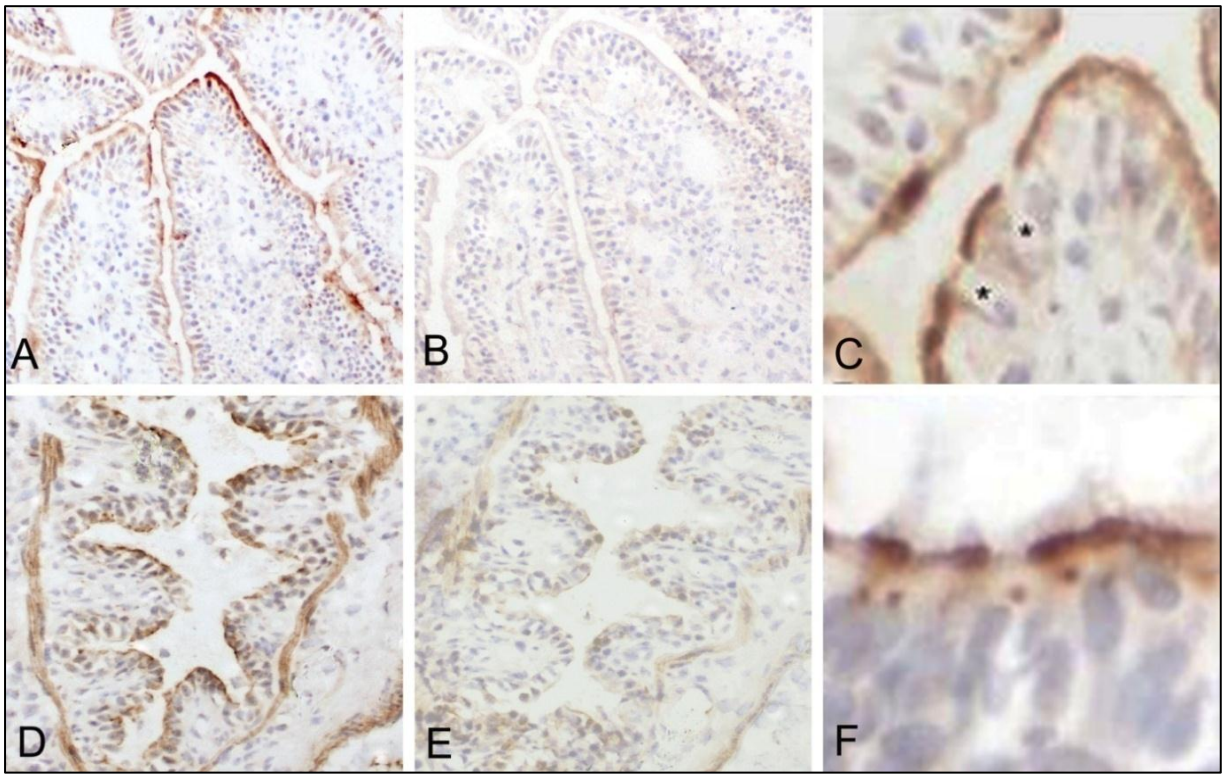

Abb. 15: Die immunhistochemische Analyse zeigt, dass das pCLCA4a-Protein in der apikalen Membran von porzinen Jejunumepithelzellen und von respiratorischen Epithelzellen lokalisiert ist. (A) und (C) zeigen die Detektion des Proteins durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) im Jejunumepithel entlang der apikalen Membran unter Aussparung von Becherzellen. Die Sternchen (*) kennzeichnen Becherzellen, in denen kein Signal sichtbar ist. (D) und (F) zeigen die Detektion des Proteins durch den gleichen Antikörper im Bronchialepithel entlang der apikalen Membran von Epithelzellen in Becherzellen und Nicht-Becherzellen, außerdem wurden vereinzelte punktartige Signale in unmittelbarer Zellkernnähe beobachtet (F). (B) und (E) sind die zugehörigen Reagenzienkontrollen mittels Präimmunserum.
Die Signale in der glatten Bronchialmuskulatur (D) werden als unspezifisch angesehen, da die gleichen Signale auch in der Kontrolle (E) vorkommen. Zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Analysen unter Verwendung von Kryostatschnitten der Harnblase bestätigten diese Annahme, da auch in diesem Organ ohne nachweisbare pCLCA4a-mRNA (siehe Abb. 6) eine eindeutige Färbung der glatten Muskelzellen auftrat.
(Braun: DAB-Signal, Blau: Hämatoxylin-Gegenfärbung)
Die finalen Versionen der Unter-Abbildungen C und F wurden bereits vorab veröffentlicht im Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 60(1): (45-56) January / 2012 by SAGE Publications Ltd.SAGE Publications, Inc., All rights reserved ©. Eine Nachdruckgenehmigung zur Verwendung der Bilder C und F innerhalb dieser Dissertation wurde durch SAGE Publications Inc. erteilt.

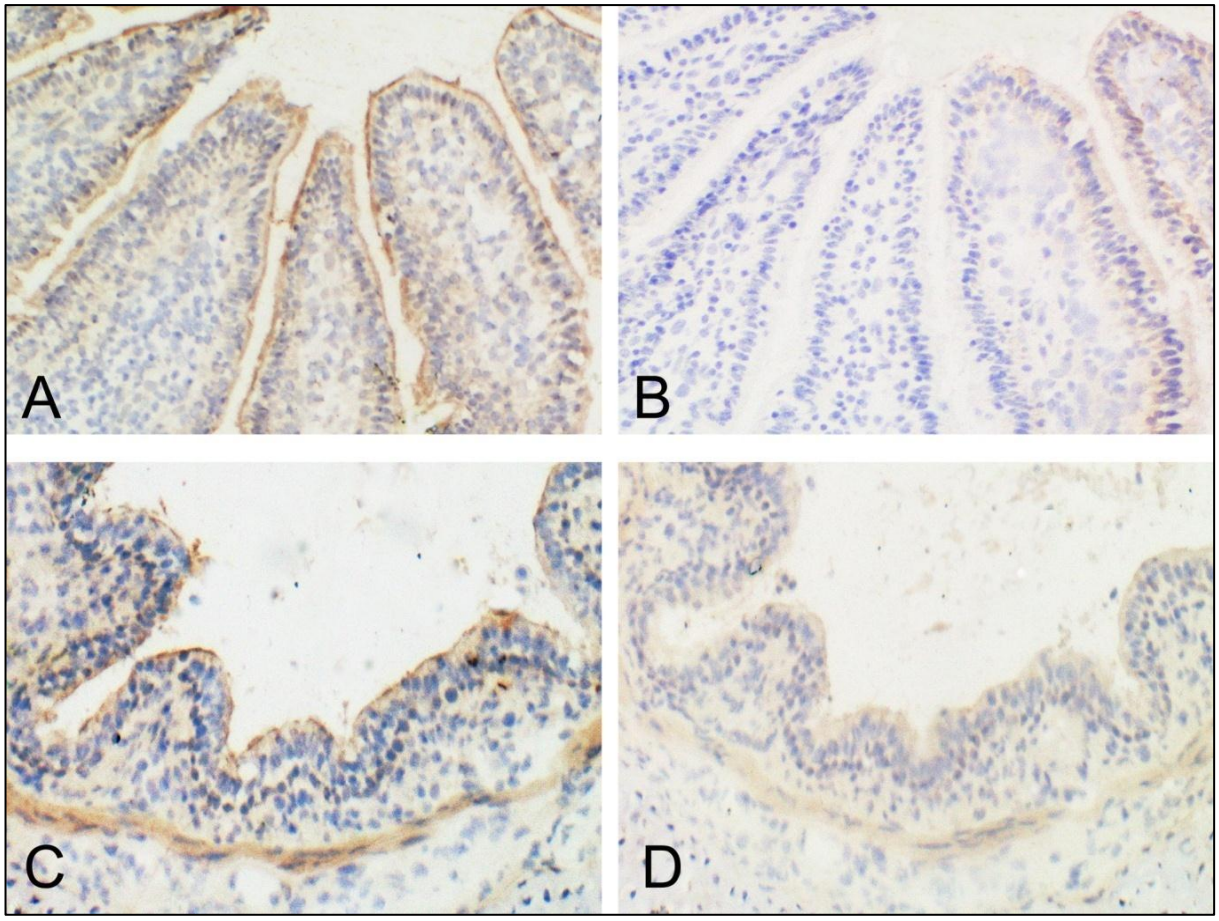

Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis des pCLCA4a-Proteins in der apikalen Membran des Jejunums und in respiratorischen Epithelzellen des Schweins. (A) zeigt die Detektion des Proteins durch den carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) im Jejunumepithel entlang der apikalen Zellmembran. (C) zeigt die Detektion des Proteins durch den gleichen Antikörper im Bronchialepithel. (B) und (D) sind die jeweiligen Reagenzienkontrollen mittels Präimmunserum.
Auch hier ist das Signal in der Brochialmuskulatur (C) als unspezifisch anzusehen (siehe Erklärung in vorangeganener Abbildungsbeschriftung (Abb. 15).
(Braun: DAB-Signal, Blau: Hämatoxylin-Gegenfärbung)

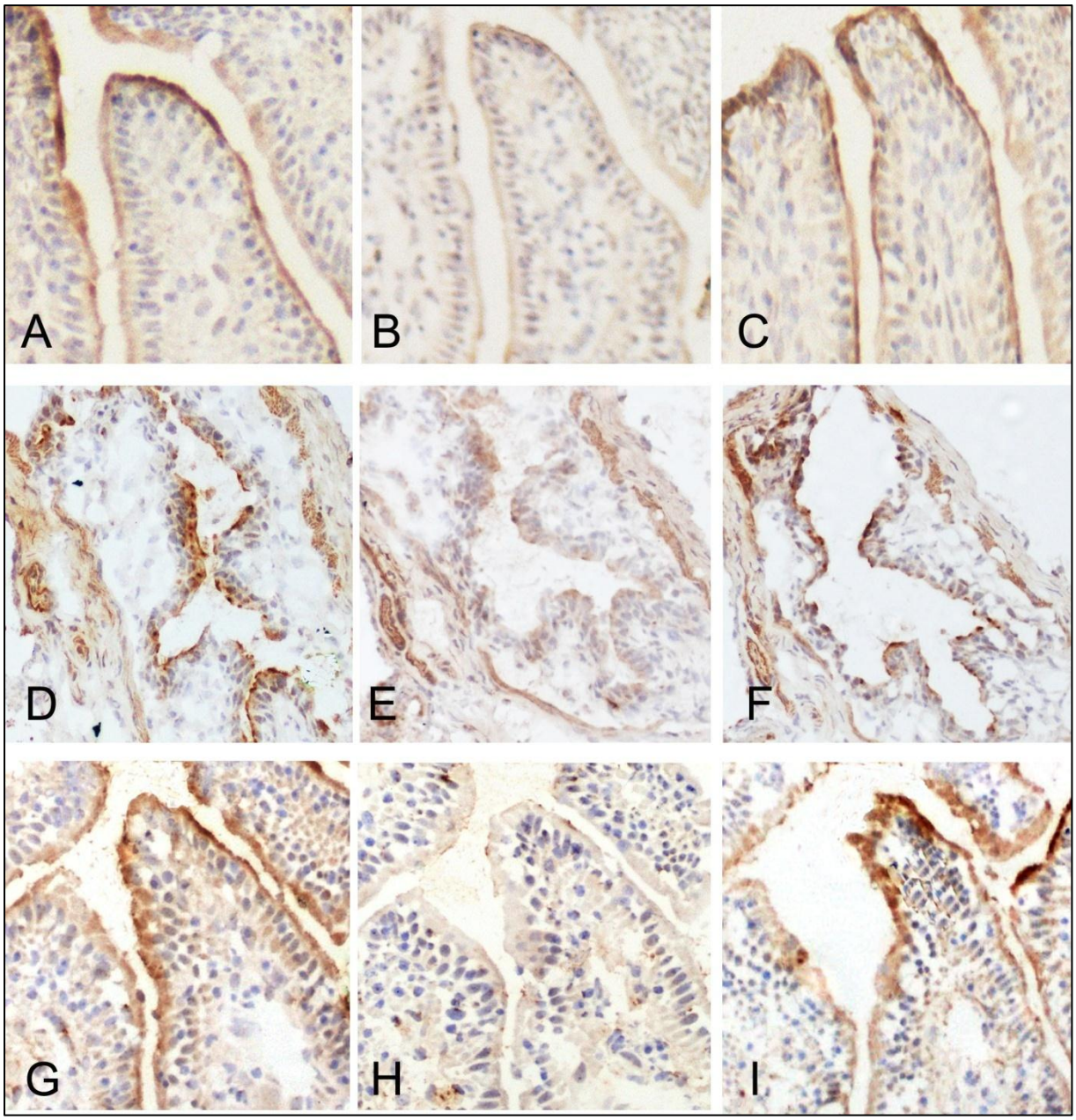

Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis des pCLCA4a-Proteins durch den carboxy-terminalen Antikörper (p4a-C-1a) in porzinem Jejunumepithel (A), und durch den amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) in Jejunum- (G) und Bronchialepithel (D) des Schweins. (B), (E) und (H) zeigen die dazugehörigen Spezifitätskontrollen mittels Präinkubation der Antikörper mit ihren spezifischen pCLCA4a-Peptiden. (C), (F) und (I) zeigen die jeweiligen Ergebnisse nach Inkubation der Erstantikörper mit dem irrelevanten Peptid (Aminosäuresequenz 250–264 des pCLCA1-Peptids).
Auch hier ist das Signal in der Brochialmuskulatur (D) als unspezifisch anzusehen (siehe Erklärung in vorangeganener Abbildungsbeschriftung (Abb. 15).
(Braun: DAB-Signal, Blau: Hämatoxylin-Gegenfärbung)

Das pCLCA4a-Protein ist apikal in intestinalen und respiratorischen Epithelzellen lokalisiert. Im gesamten Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) konnte durch beide Antikörper (p4a-N-1b) und (p4a-C-1a) pCLCA4a entlang der apikalen Membran intestinaler Epithelzellen hauptsächlich an den Zottenspitzen detektiert werden. Abb. 15 (A und C), 16 (A) und 17 (A und G) zeigen exemplarisch die Lokalisation des pCLCA4a-Proteins im Jejunumepithel. Die Becherzellen blieben dabei ausgespart Abb. 15 (C) und weisen daher keine pCLCA4a-Expression im Dünndarm auf. Das pCLCA4a-Protein ist zudem im oberen Respirationstrakt (Nasenschleimhaut, Trachea, Bronchus trachealis und Bronchus principalis, Bronchi in Lungenschnitten) mit jeweils gleicher subzellulärer Lokalisation lokalisiert. pCLCA4a konnte mit einem deutlichen Signal entlang der apikalen Membran respiratorischer Epithelzellen, sowohl in Becherzellen als auch in Nicht-Becherzellen, ebenfalls durch beide Antikörper (p4a-N-1b und p4a-C-1a) detektiert werden Abb.15 (D und F), 16 (C) und 17 (D). Außerdem wurden vereinzelte punktartige Signale in unmittelbarer Zellkernnähe beobachtet Abb. 15 (F). Alle anderen anatomischen Strukturen des Respirationstraktes (Alveolarsepten, Interstitium, lymphatisches Gewebe, Serosa, Endothel, Pleura) zeigten keine spezifischen Signale. Die teilweise festgestellten Signale in der glatten Bronchialmuskulatur sind als unspezifisch zu betrachten, da die gleichen Signale auch im Präimmunserum und nach Präinkubation mit dem spezifischen Peptid vorhanden sind. Um diese Aussage zu verifizieren, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Untersuchung mittels Kryostatschnitten in der Harnblase, ohne pCLCA4a-mRNA (siehe Abb. 6), durchgeführt. Es wurden ebenfalls in den glatten Muskelzellen der Harnblase qualitativ gleiche Signale beobachtet. Die immunhistochemischen Ergebnisse decken sich weitgehend mit dem Expressionsmuster, das auf mRNA-Ebene ermittelt wurde (siehe Abb. 6). Jedoch konnte pCLCA4a immunhistochemisch nicht im Auge und im Uterus nachgewiesen werden. Außerdem gab es keine spezifischen Signale in den Kryptenzellen oder in anderen Segmenten des Dickdarms. Alle anderen Organe (Ösophagus, Herz, Aorta, Glandula parotis, Großhirn, Kleinhirn, Magen (Pars nonglandularis und Pars glandularis), Leber, Milz, Niere, Gallenblase, Harnblase, Pankreas, Haut (Perineum) zeigten übereinstimmend mit dem pCLCA4a-mRNA-Expressionsmuster auch immunhistochemisch keine pCLCA4a-Expression.

5 Diskussion

Für den Erfolg der translationalen CF-Forschung ist die Wahl geeigneter Tiermodelle von entscheidener Bedeutung. Ein ideales CF-Tiermodell zeichnet sich dadurch aus, dass es in der Lage ist, den humanen CF-Phänotyp möglichst exakt widerzuspiegeln. Potenzielle Modulatorgene sollten ein vergleichbares Expressionsverhalten besitzen und deren Genprodukte sollten über gleiche Funktionsmechanismen verfügen. Das Modell ermöglicht es so, die Pathomechanismen der CF im lebenden Organismus zu studieren und entsprechende therapeutische Strategien entwickeln zu können. Eine größtmögliche Homologie zwischen dem Tiermodell und dem Menschen ist dafür entscheidend (Sive, 2011; Racay, 2002). Wie eingangs erwähnt (2.2.1), wurde bisher die Maus als Tiermodell in der CF-Forschung genutzt. Der CF-Phänotyp der Maus differiert allerdings in hohem Maße von dem des Menschen, besonders im Hinblick auf die wesentlich schwächer ausgeprägte Lungensymptomatik bei der Maus (Guilbault et al., 2007), die beim Menschen zu den gravierensten CF-Problemen zählt (Welsh et al., 1995; Rowntree und Harris, 2003). Die erst kürzlich generierten porzinen CF-Modelle weisen hingegen eine weitaus größere Homologie zum Menschen auf und scheinen, ersten Untersuchungen nach, dadurch nahezu ideale Modelle im Vergleich zum Mausmodell zu sein (Rogers et al., 2008a; Meyerholz et al., 2010a und 2010b; Stoltz et al., 2010; Klymiuk et al., 2011; Ostedgaard et al., 2011).

Bezüglich der genannten Aspekte und mit Blick auf das neue porzine CF-Modell ergab sich die Arbeitshypothese dieses Projektes, nach der ein porziner Orthologe zu hCLCA4 bzw. mCLCA6 als funktionelles Protein exprimiert wird, dessen Expressionsmuster und seine proteinbiochemischen Charakteristika Ähnlichkeiten zu seinen humanen und murinen Orthologen zeigen. Hypothetisiert wird weiter, dass der Mensch und das Schwein größere Übereinstimmungen aufweisen als der Mensch und die Maus.

Der porzine Vertreter pCLCA4 weist einen hohen Verwandtschaftsgrad zu hCLCA4 und mCLCA6 auf (Plog et al., 2009). Alle drei Orthologe sind in einem phylogenetischen Cluster lokalisiert (siehe Abb. 1). Sowohl hCLCA4 als auch mCLCA6 scheinen bei der Pathogenese der Zystischen Fibrose eine Rolle zu spielen (Ritzka et al., 2004; Bothe et al., 2008). Mutationen des *CFTR*-Gens, welches für einen Chloridkanal codiert, wurden als Ursache für das Auftreten der CF beim Menschen identifiziert. Interessanterweise besteht jedoch nicht immer ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Schweregrad und der Art des *CFTR*-Gendefekts bei der CF. Scheinbar wirken hier auch andere Faktoren modulierend an der Ausprägung der Erkrankung mit. Für ORCC, einen anderen epithelialen Chloridkanal, wurde solch eine Modulatorfunktion bereits postuliert (Gabriel et al., 1993). Aber auch eine Ca^{2+}-abhängige Chloridleitfähigkeit wurde in diesem Zusammenhang als kompensatorischer

Faktor beobachtet (Schwiebert et al., 1999; Bronsveld et al., 2000). Diese „alternative“ Chloridleitfähigkeit in CF-Epithelien wurde in der Vergangenheit für einige CLCA-Vertreter diskutiert (mCLCA2 und mCLCA3: Leverkoehne et al., 2006; hCLCA1, hCLCA2 und hCLCA4: Hauber et al., 2004; Ritzka et al., 2004). Für den humanen pCLCA4a-Orthologen hCLCA4 wurde eine Modulatorfunktion bei der CF bereits beschrieben (Ritzka et al., 2004). Für seinen murinen Orthologen mCLCA6 konnte eine Kolokalisation mit CFTR-Chloridkanälen im Kolonepithel gezeigt werden, was auf eine Interaktion hindeuten könnte (Bothe et al., 2008). Beide Vertreter sind somit möglicherweise von hoher biomedizinischer Bedeutung für den Ausprägungsgrad des CF-Phänotypen.

Obwohl die Genotypen des humanen und des murinen CLCA-Vertreters eine enge Verwandtschaft aufweisen, zeigen die Organ-Verteilungsmuster innerhalb der beiden Orthologen jedoch beträchtliche Divergenzen. So ist hCLCA4 hauptsächlich in CF-relevanten Organen, wie dem Respirations- und Intestinaltrakt, aber auch im Gehirn exprimiert (Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003). Der murine Orthologe mCLCA6 hingegen ist übereinstimmend im Intestinaltrakt lokalisiert, wird aber nicht im Respirationstrakt exprimiert (Bothe et al., 2008; Evans et al., 2004). Die Variabilität des Expressionsmusters, welches innerhalb der CLCA-Homologen einer Spezies und auch zwischen ihren direkten Orthologen in anderen Tierarten differiert, lässt sowohl eine interspeziesspezifische als auch eine intraspeziesspezifische Evolution der CLCA-Familie vermuten (Gruber et al., 2002). Innerhalb einer Spezies könnten sich durch Mutationen Genduplikaturen gebildet haben, die sich unabhängig voneinander weiter entwickelt haben. Dieser Evolutionsmechanismus kann das Spektrum der ursprünglichen Genaktivität durch die Entstehung funktionell neuer Gene erweitern. Ebenso können aber auch Pseudogene aus dieser Mutation entstehen. So ist auch die Modifizierung von Expressionsmustern erklärbar (Ohno, 1999; Kondrashov et al., 2002). Eine daraus resultierende Funktionsvariabilität der *CLCA*-Gene ist zum jetzigen Zeitpunkt noch spekulativ. Allerdings sind diese speziesspezifischen Expressionsdivergenzen der *CLCA*-Gene von großer Bedeutung hinsichtlich der dadurch eingeschränkten Übertragbarkeit von Daten der einen Spezies auf eine andere. Dies bedeutet womöglich eine Einschränkung beim Einsatz von Tiermodellen bei der translationalen Erforschung humaner Krankheiten wie der Zystischen Fibrose (Elferink und Beuers, 2009).

Innerhalb dieser Arbeit wurden für pCLCA4a die Expressionsmuster auf mRNA-Ebene und Proteinebene ermittelt. Zudem erlaubten proteinbiochemische Charakterisierungen des Proteins einen Vergleich mit seinen murinen und humanen Orthologen. Dadurch konnten speziesspezifische Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den Orthologen aufgedeckt werden. Eine möglicherweise höhere Übereinstimmung zwischen pCLCA4a und

hCLCA4 soll nachfolgenden Studien im Rahmen der translationalen Forschung die Möglichkeit bieten, ein weiterreichendes Verständnis zur Funktionsweise des hCLCA4-Vertreters und seiner Rolle bei der CF zu erlangen.

Zielführend wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Klonierung und Sequenzierung des Offenen Leserahmens (engl.: *open reading frame*, ORF) von pCLCA4a
- Ermittlung des Expressionsmusters auf mRNA-Ebene mittels konventioneller RT-PCR und Identifizierung der gewebe- und zellspezifischen Expression auf Proteinebene durch immunhistochemische Analysen
- *In silico*-Analysen zur Aufklärung der Proteinstruktur von pCLCA4a, insbesondere zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei pCLCA4a um ein Transmembranprotein oder ein sezerniertes Protein handelt und Suche nach dem Vorhandensein einer Signalsequenz und potenziellen N-Glykosylierungsstellen
- Expression in HEK 293-Zellen und anschließende proteinbiochemische Charakterisierung des heterolog hergestellten pCLCA4a-Proteins und seines Glykosylierungsmusters
- Vergleich der ermittelten Daten mit den aus der Literatur vorliegenden Daten zu den humanen und murinen Orthologen

Mittels ORF-übergreifender Primer wurde porzine mRNA, die aus Jejunumschleimhaut gewonnen worden war, amplifiziert und es wurde ein spezifisches Produkt mit der erwarteten Bandengröße von 3178 bp erzeugt. Die anschließend extern durchgeführte Sequenzierung durch die Firma Seqlab (Göttingen) ergab eine 100%ige Übereinstimmung der analysierten Sequenz des ORF von pCLCA4a mit der aus einer vorherigen Sequenzierung der BAC-Klone ermittelten Sequenz (Plog et al., 2009). Plog und Mitarbeiter haben mittels *in silico*-Analysen die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von pCLCA4a mit denen der bekannten CLCA-Vertreter hCLCA4 und mCLCA6 verglichen (Plog et al., 2012). Die Aufdeckung speziesspezifischer Unterschiede zwischen den drei Spezies stand dabei im Fokus, da dies von höchster Wichtigkeit für den Einsatz von Tiermodellen zur Erforschung der CF ist. Den Analysen nach weicht das *pCLCA4a*-Gen in seiner Genomstruktur nicht wesentlich von seinen humanen und murinen Orthogen ab. Alle drei Spezies besitzen innerhalb ihrer Genstruktur 14 Exons und 13 Introns. Die codierenden Bereiche besitzen jeweils einen ORF, der potenziell für die Aminosäuresequenz des CLCA-Proteins codiert. Lediglich die flankierenden Exons 1 und 14 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anzahl an Nukleotiden in den drei Spezies. Dadurch kommt es zu einer Diskrepanz der Aminosäurensequenzlänge. So ist das pCLCA4a-Protein 927 AS lang, mCLCA6 besitzt hingegen 924 AS, während

hCLCA4 lediglich für ein 917 AS langes Protein codiert. Gesamt betrachtet besitzt pCLCA4a auf Aminosäurenebene eine höhere Sequenzhomologie zu hCLCA4 als zu mCLCA6. Denn pCLCA4a und hCLCA4 haben eine 87,8%ige Übereinstimmung, während mCLCA6 lediglich 84,7% Übereinstimmung zu pCLCA4a besitzt. Die Identität des Aminosäurenmusters von mCLCA6 zu hCLCA4 beträgt nur 69% (Evans et al., 2004).

Expressionsmuster

Da sich pCLCA4a in einem genetischen Cluster mit hCLCA4 und mCLCA6 befindet, ist anzunehmen, dass das Verteilungsmuster Ähnlichkeiten mit seinen Orthologen besitzt, welches aufgrund der größeren Homologie zwischen Mensch und Schwein größere Übereinstimmungen zwischen diesen beiden Spezies aufweist. hCLCA4 zeigt ein wesentlich breiteres Expressionsmuster als mCLCA6. Eine Übereinstimmung besteht lediglich in einer Expression im Gastrointestinaltrakt (Bothe et al., 2008; Evans et al., 2004; Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003).

Um die organ- und gewebespezifischen Verteilungsmuster des porzinen Orthologen pCLCA4a zu untersuchen, wurde zunächst pCLCA4a-mRNA mittels konventioneller PCR unter Verwendung pCLCA4a-spezifischer Primer detektiert. Zudem erfolgte der Nachweis des pCLCA4a-Proteins mittels IHC auf Kryostatschnitten zur zellspezifischen Lokalisierung des pCLCA4a-Proteins in den Organen. Dabei lieferten beide anti-pCLCA4a-spezifischen Antikörper, von denen einer (p4a-N-1b) das amino-terminale Spaltprodukt erkannte und der andere (p4a-C-1a) gegen ein Epitop im carboxy-terminalen Spaltprodukt gerichtet war, identische Ergebnisse. Dies spricht einerseits für eine hohe Spezifität der beiden Antikörper und außerdem für eine Kolokalisation beider Spaltprodukte. Um dem Leser den Überblick zu erleichtern, gibt die nachfolgende Tabelle das ermittelte Expressionsmuster von pCLCA4a auf RNA- bzw. Proteinebene im Vergleich mit dem seiner humanen und murinen Orthologen wieder. Für hCLCA4 wurden bislang nur auf RNA-Ebene Expressionsdaten erhoben (Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003).

Tabelle 19: Vergleichende Darstellung der Expressionsmuster von pCLCA4a, hCLCA4 und mCLCA6 auf RNA- bzw. Proteinebene

Gewebeexpression	pCLCA4a		hCLCA4	mCLCA6	
	RNA	Protein	RNA	RNA	Protein
			(Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003)	(Evans et al., 2004; Bothe et al., 2008)	(Bothe et al., 2008)
Respirationstrakt					
Nasenschleimhaut	✓	✓	✓	-	-
Trachea	✓	✓	✓	-	-
Bronchi	✓	✓	nicht getestet	-	-
Lunge (ohne Bronchial-gewebe)	-	-	-	-	-
Gastrointestinaltrakt					
Magen	-	-	✓	✓	-
Dünndarm	✓	✓	✓	✓	✓
Dickdarm	✓	-	✓	✓	✓
Weitere Organe bzw. Gewebe					
Milz	-	-	-	✓	-
Leber	-	-	-	✓	-
Harnblase	-	-	✓	-	-
Speicheldrüse	-	-	✓	-	-
Gehirn	-	-	✓	-	-
Auge	✓	-	nicht getestet	✓	-
Hoden	-	-	✓	-	-
Prostata	-	-	✓	-	-
Uterus	✓	-	✓	-	-

pCLCA4a und hCLCA4 wurden übereinstimmend im oberen Respirationstrakt detektiert. pCLCA4a-mRNA war besonders stark in der Trachea, in den Bronchi principalis und trachealis und auch in der Nasenschleimhaut exprimiert (siehe Abb. 6). Sein humaner Orthologe zeigt ebenfalls ein starkes mRNA-Signal in der Trachea (Agnel et al., 1999). RT-PCR-Analysen nach ist hCLCA4 auch in der Nasenschleimhaut exprimiert (Mall et al., 2003). Auf Proteinebene ist pCLCA4a ebenfalls im bronchialen Zilienepithel des oberen Respirationstrakts vertreten (siehe Abb. 15 bis 17). Hier ist die auffälligste Unstimmigkeit zu mCLCA6 feststellbar, denn der murine Orthologe wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nicht im Atmungstrakt nachgewiesen (Bothe et al., 2008; Evans et al., 2004).

Eine Expression im gesamten Intestinaltrakt scheint weitgehend identisch mit hCLCA4 und mCLCA6 zu sein (Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003; Bothe et al., 2008), denn pCLCA4a-mRNA wurde im gesamten Darmtrakt (Dünn- und Dickdarm) detektiert (siehe Abb. 6). Dies ist weitgehend konform mit den Ergebnissen der RNA-Dot-Blot-Analysen zur Ermittlung des hCLCA4-Expressionsmusters (Agnel et al., 1999). Besonders deutlich waren für hCLCA4 die Signale im Kolon, aber auch im Dünndarm und Zäkum gab es eindeutige Ergebnisse. Bothe und Mitarbeiter verwendeten zur Ermittlung des RNA-Expressionslevels von mCLCA6 die Real-Time-quantitative-PCR (qRT-PCR). Sie konnten ein stetig ansteigendes mRNA-Level vom Duodenum zum Ileum verzeichnen, das entlang des Dickdarms wieder abnahm (Duodenum < Jejunum < Ileum > Zäkum > Kolon; Bothe et al., 2008). pCLCA4a-Protein ist in der apikalen Bürstensaummembran im oberen Drittel der Zottenspitzen im gesamten Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) exprimiert, ähnlich wie es für mCLCA6 beschrieben wurde (Bothe et al., 2008). Im Gegensatz zu mCLCA6, welches in Kryptenzellen des Dickdarms nachgewiesen wurde, war pCLCA4a im Dickdarm als Protein nicht detektierbar. Eine Expression im Gehirn, die für hCLCA4 beschrieben wurde (Agnel et al., 1999), konnte weder für mCLCA6 (Bothe et al., 2008) noch, den Ergebnissen der vorliegenden Forschungsarbeit nach, für pCLCA4a gezeigt werden. Außerdem wurde hCLCA4-mRNA, wenn auch deutlich geringer als in oben genannten Organen, in den männlichen Keimdrüsen, der Prostata und im Uterus sowie in der Brustdrüse, in der Harnblase und der Speicheldrüse nachgewiesen (Agnel et al., 1999; Mall et al., 2003). pCLCA4a-mRNA ist, von den hier untersuchten Reproduktionsorganen, lediglich in geringer Menge im Uterus vorhanden und abweichend von hCLCA4 auch im Auge exprimiert. mCLCA6-mRNA wurde ebenfalls im Auge nachgewiesen (Evans et al., 2004).

Interessanterweise weicht das pCLCA4a-mRNA-Level vom zellulären Verteilungsmuster des Proteins ab. Protein konnte weder im Dickdarm, im Uterus noch im Auge detektiert werden. Möglicherweise rührt diese Diskrepanz des Expressionsmusters daher, dass bei der Genexpression posttranskriptionelle Regulationsmechanismen bzw. Modifikationen die Synthese des Proteins in spezifischen Organen verhindert oder fehlerhaft gestaltet (Mata et al., 2005; Glisovic et al., 2008; Keene, 2007). Denkbar ist allerdings auch, dass die PCR als sensitivere Methode niedrigere Nachweisgrenzen zur Detektion besitzt als die Immunhistochemie. Dieses Phänomen wurde ebenfalls für mCLCA5 beschrieben (Braun et al., 2010). Auf mRNA-Ebene zeigt mCLCA5 ein breiteres Organspektrum als seine Proteinexpression. Erwähnenswert ist außerdem, dass die immunhistochemische Detektion nur auf Kryostatschnitten und nicht auf Paraffinschnitten gelang. Bekannterweise wird die Antigenität des Gewebeschnitts auf Kryostatschnitten weit besser erhalten, daher sind Gefrierschnitte wesentlich sensitiver bei der Antigendetektion durch spezifische Antikörper als Paraffin-

schnitte (Winckler, 1970). Diese Aspekte deuten auf eine geringe Expression von pCLCA4a auf Proteinebene hin. Eine mögliche Hochregulierung des pCLCA4a-Gens bei der CF und eine damit verbundene Proteininduktion in anderen Organen ist noch zu prüfen. Eine Überexpression bei der CF in der Bronchialschleimhaut konnte bereits für hCLCA1 nachgewiesen werden (Hauber et al., 2004).

Der organspezifische Nachweis des pCLCA4a-Proteins sollte ursprünglich parallel mittels Westernblot erfolgen. Die Detektion des Proteins im Westernblot ist jedoch auch nach mehrmaligen Wiederholungen und unterschiedlichen Anreicherungsverfahren (Proteinkonzentrationserhöhung, LCM, IP) in keinem Organ- bzw. Gewebelysat gelungen (Abb. 9, 10, 12). Die pCLCA4a-spezifischen (amino-terminalen und carboxy-terminalen) Antikörper detektierten jedoch beide das pCLCA4a-Protein im Zelllysat, welches nach transienter Transfektion aus HEK 293-Zellen gewonnen worden war (Abb. 8), und ihre Spezifität wurde so gesichert. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Detektion des pCLCA4a-Proteins im Westernblot in den Organlysaten ist, dass die Sensitivität des Westernblots nicht ausgereicht haben könnte, um eventuell zu geringe Proteinmengen in den Organen nachzuweisen. Mögliche Fehlerquellen bzw. Ursachen wurden zuvor ausgeschlossen. So wurde die Gesamtproteinmenge zuvor in allen Lysaten photometrisch bestimmt und die anfänglich eingesetzte Proteinmenge im Westernblot in Folgeversuchen verdoppelt (40 µg / 10 µl). Dennoch schien der Anteil des pCLCA4a-Proteins in den Organlysaten für eine Detektion nicht ausreichend. Auch der Versuch das pCLCA4a-Protein mittels Immunopräzipitation und Lasermikrodissektion anzureichern, erzielte keine spezifischen Signale im Westernblot. Dass der Nachweis des Referenzproteins β-Actin in allen Lysaten gelang, bekräftigt die Vermutung, dass pCLCA4a im Gegensatz zu diesem recht häufig in der Zelle vorkommenden Strukturprotein für eine Detektion möglicherweise zu gering exprimiert war. Ein methodischer Fehler wurde durch die Mitführung geeigneter Positivkontrollen weitgehend ausgeschlossen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Hauptunterschied zwischen pCLCA4a und mCLCA6, welches auf Proteinebene ausschließlich im Intestinaltrakt exprimiert ist (Bothe et al., 2008), in der Expression von pCLCA4a-mRNA und -Protein im Respirationstrakt besteht, übereinstimmend mit seinem humanen Orthologen hCLCA4 (Agnel et al.1999; Mall et al. 2003). Trotz einiger speziesspezifischer Abweichungen des pCLCA4a-Expressionsmusters von dem seiner humanen und murinen Orthologen (zusammengefasst in Tabelle 19), besteht offensichtlich eine beträchtlich größere Übereinstimmung des Expressionslevels zwischen pCLCA4a und hCLCA4. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Schwein als neues CF-Tiermodel zur Erforschung der modulatorischen Rolle von hCLCA4 bei der CF durchaus geeigneter zu sein scheint als das murine CF-Modell. Überdies könnte

eine Expression in der apikalen Membran des Atmungs- und Darmtraktes für pCLCA4a, ähnlich wie für hCLCA4, eine Rolle im transepithelialen Ionentransport vermuten lassen. Nachfolgenden Studien bleibt es überlassen, die Funktionsmechanismen für pCLCA4a aufzudecken und seine potenzielle Modulatorfunktion in CF-typischen Geweben, wie dem Respirationstrakt und dem Intestinaltrakt, zu beschreiben.

In silico-Analsysen

Es wurde des Weiteren der Frage nachgegangen, welche Transmembranstruktur pCLCA4a besitzt. Handelt es sich wie bei seinem murinen Orthologen mCLCA6 um ein Transmembranprotein (Bothe et al., 2008) oder um ein sezerniertes Protein, wie für mCLCA3 (Mundhenk et al., 2006) und pCLCA1 (Plog et al., 2009) beschrieben? Diese Aussagen sind von großer Bedeutung für ein weiteres Verständnis zur Funktionsweise von pCLCA4a. Die computergestützten Analysen unter Verwendung der Programme Kyte-Doolittle, SOSUI, HMMTop, DAS und Psort II ergaben ein einheitliches Bild und favorisierten für pCLCA4a eine Transmembrandomäne, welche sich nahe des C-Terminus um AS 900 befindet. Entgegen den Ergebnissen der genannten Algorithmen variieren die Aussagen durch die TMpred-Analyse, welche sechs potenzielle Transmembrandomänen vorhersagte. Der TMpred-Algorithmus basiert, im Gegensatz zu den anderen Programmen, auf einer statistischen Analyse, die bekannte natürlich vorkommende Transmembranproteine mit der zu analysierenden Sequenz vergleicht. Die zuvor genannten Programme analysieren dagegen die physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren und ihre Abfolge innerhalb der Sequenz. Somit können Computerprogramme in ihren Aussagen variieren und nur eine grobe Schätzung über Transmembranstrukturen abgeben. Da die Mehrzahl der Programme in ihren Aussagen übereinstimmt, kann für pCLCA4a die Struktur eines Ein-TM-Modells angenommen werden. Dies würde sich auch mit den für mCLCA6 bestimmten Transmembran-Strukturanalysen decken, denn auch für mCLCA6 wurde nach *in silico*-Vorhersagen übereinstimmend eine transmembrane Helix nahe des C-Terminus postuliert (Bothe et al., 2008). Plog und ihr Forscherteam führten erst kürzlich *in silico*-Analysen für hCLCA4 durch (Plog et al., 2012). Die Daten suggerieren, dass ebenso hCLCA4 in die CLCA-Gruppe mit einer Transmembrandomäne eingeordnet werden kann.

Der SignalP 3.0 Server identifizierte außerdem eine 20 AS-lange hydrophobe Sequenz (AS 1-20), die das pCLCA4a-Protein für den Transport ins ER markiert. Dort wird die Signalsequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit abgespalten. mCLCA6 besitzt, übereinstimmend mit den für pCLCA4a ermittelten Ergebnissen, ebenfalls solch eine Signalsequenz am aminoterminalen Ende (Bothe et al., 2008). Optional werden die Proteine im ER erstmals auf ihrem sekretorischen Signalweg durch die Zelle durch Mannose-reiche Glykosylierungen modi-

fiziert. Dabei knüpfen Glykosyltransferasen Zuckerreste an bestimmte Asparagine innerhalb der Aminoäuresequenz. Im Golgi-Apparat wird die im ER begonnene Glykosylierung der Proteine fertiggestellt. Die Proteine erreichen dort durch eine teilweise Verkürzung der bereits angehängten Zuckerreste und durch gezieltes Anhängen weiterer Oligosaccharide eine komplexe Glykosylierungsstufe. Dies bedeutet auch eine Größen- bzw. Massenzunahme des primären Translationsproduktes. Anschließend folgt die weitere Sortierung der Proteine zu ihren Bestimmungsorten, für Transmembranproteine ist das die Zellmembran, für sekretorische Proteine der Extrazellularraum (Anelli und Sitia, 2008). Diese posttranslationale Proteinmodifikation in Form von Glykosylierungen ist für den intrazellulären Transport, für die Stabilität der Proteinkonformation und für die Oberflächenexpression der Zelle (bei Membranproteinen) von entscheidender Bedeutung (Abe et al., 2004; Helenius und Aebi, 2001). Der NetGlyc 1.0 Server sagte für das pCLCA4a-Protein acht potenzielle Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen voraus. Von diesen sind zwei im vermuteten carboxy-terminalen Spaltprodukt lokalisiert, die anderen sechs liegen im amino-terminalen Spaltprodukt. Das Glykosylierungsmuster von pCLCA4a wurde während der Forschungsarbeit, die dieser Arbeit zugrunde liegt, zusätzlich proteinbiochemisch bestimmt, diese Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

Posttranslationale Spaltung von pCLCA4a und Einordnung in die Gruppe der partiell sezernierten CLCA-Proteine

Zu den posttranslationalen Proteinmodifikationen zählen neben den Glykosylierungen auch die posttranslationale Spaltung des Vorläuferproteins in ein amino-terminales und ein carboxy-terminales Spaltprodukt. Dieses Phänomen konnte gemeingültig für alle bekannten CLCA-Proteine um AS 680 beschrieben werden (Patel et al., 2009). Folglich wurde für pCLCA4a die Proteinprozessierung der beiden vermeintlichen Spaltprodukte getrennt voneinander im Westernblot untersucht. Unter Zuhilfenahme der bereits erwähnten Antikörper, von denen einer gegen ein Epitop im amino-terminalen Spaltprodukt (p4a-N-1b) gerichtet ist und der andere ein Epitop im carboxy-terminalen Teil des Proteins (p4a-C-1a) erkennt, wurde das pCLCA4a-Protein nach Expression in HEK 293-Zellen in Zellkulturüberstand und Zelllysat getrennt voneinander untersucht. Die erzielten Ergebnisse (Abb. 8) lassen folgende Aussagen über das pCLCA4a-Protein zu:

1. Die posttranslationale Spaltung des detektierten Vorläuferproteins durch beide Antikörper in eine größere amino-terminale Einheit (110 kDa) und ein kürzeres carboxy-terminales Spaltprodukt (zwei Glykosylierungsstufen: 52 kDa und 40 kDa) konnte auch für pCLCA4a bestätigt werden.

2. pCLCA4a kann in die Gruppe der partiell sezernierten Proteine eingeordnet werden. Nur das größere amino-terminale Spaltprodukt war im Zelllkulturüberstand nachweisbar. Das carboxy-terminale Spaltprodukt konnte ausschließlich im Zelllysat detektiert werden, demnach bleibt dieses Spaltprodukt intrazellulär oder membranverankert. Bei vollständig sezernierten CLCA-Proteinen wären dagegen beide Spaltprodukte größtenteils im Medium detektierbar, wie beispielsweise für mCLCA3 und pCLCA1 beschrieben (Mundhenk et al., 2006; Plog et al., 2009).

Auch bei mCLCA6 handelt es sich, analog zu pCLCA4a, um ein Heterodimer, bei dem ein größeres amino-terminales Spaltprodukt partiell sezerniert wird und das kürzere carboxy-terminale Spaltprodukt membranverankert bleibt und daher nur im Zelllysat existiert. Das primäre Translationsprodukt wurde durch beide Antikörper ausschließlich im Zelllysat detektiert (Bothe et al., 2008).

Glykosylierungsmuster und sekretorischer Signalweg

Nicht nur anhand der oben genannten Aspekte wird die enge Verwandtschaft zwischen mCLCA6 und pCLCA4a deutlich, auch der proteinbiochemische Charakter des Glykosylierungsmusters und des sekretorischen Signalweges ist in beiden Spezies nahezu identisch. Das pCLCA4a-Vorläuferprotein wurde als Mannose-reich-glykosyliertes Protein identifiziert und stammt demnach aus dem ER. Durch das Anhängen Mannose-reicher Oligosaccharide nimmt das Vorläuferprotein ~20 kDa an Masse zu (Abb. 14). Diese Größenzunahme stimmt in etwa mit den durch *in silico*-Analysen identifzierten Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen überein. Im ER wird das Vorläuferprotein in zwei unterschiedlich große Produkte gespalten. Bislang ist noch unklar, an welcher Position die Spaltstelle von pCLCA4a liegt. Biochemische Analysen hierzu existieren beispielsweise für den zweiten bovinen CLCA-Vertreter bCLCA2 (Spaltstelle an AS 681; Elble et al., 1997) und für mCLCA3 (Spaltstelle zwischen AS 695 und 696; Bothe et al., 2011). Auf Untersuchungen zur Beantwortung dieser Frage wurde in dieser Arbeit jedoch verzichtet, da dies nicht Teil der Problemstellung war. Beide Spaltprodukte erreichen mit Eintritt in den Golgi-Apparat die nächste Glykosylierungsstufe. Für das amino-terminale Produkt von pCLCA4a wurde eine komplexe Glykosylierungsform identifiziert. Das carboxy-terminale Spaltprodukt liegt offenbar in zwei verschiedenen Glykosylierungsstufen vor. Die ~52 kDa Bande wurde im Golgi-Apparat in eine komplexe Form glykosyliert. Die kleinere ~40 kDa Untereinheit ist noch eine Mannose-reiche Vorstufe des carboxy-terminalen Spaltproduktes aus dem ER. Dies stimmt auch mit seiner Größenzunahme von 10 kDa überein, was der Anzahl an Mannose-reichen Glykosylierungen des carboxy-terminalen Spaltprodukts, die der NetGlyc 1.0 Servers errechnete, entspricht (Abb. 5 und 14). Vom Golgi-Apparat aus wird das pCLCA4a-Protein zu seinem Zielkompartiment, der Zellmembran, transportiert. Dafür sprechen einerseits die

bereits genannten *in silico*-Transmembran-Strukturanalysen, die eine Membranverankerung des pCLCA4a-Proteins in Form einer Ein-TM-Domäne favorisierten und andererseits auch die Detektion des amino-terminalen pCLCA4a-Spaltprodukts in Medium und Zelllysat. Somit muss das pCLCA4a-Spaltprodukt in der Lage sein, die Zellmembran zu passieren. Bekräftigend waren allerdings auch die immunhistochemischen Ergebnisse. Beide Antikörper identifizierten das pCLCA4a-Protein an der apikalen Membran im respiratorischen Zilienepithel und im Zottenepithel des Dünndarms. Im Respirationstrakt konnten zudem spezifische Signale in Zellkernnähe beobachtet werden. Möglicherweise wurden in diesen Fällen das Vorläuferprotein im ER erfasst oder Spaltprodukte im Golgi-Apparat detektiert (Abb. 15 C). Wie auch bei mCLCA6 (Bothe et al., 2008) wurden keine spezifischen Signale im Extrazellularraum oder in muzinproduzierenden Becherzellen gefunden.

Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit zur Charakterisierung von pCLCA4a in gesunden Schweinen konnten zusammenfassend zeigen, dass das Expressionsmuster, die Transmembranstruktur und die posttranslationalen Proteinmodifikationen innerhalb der Proteinprozessierung von pCLCA4a bei gesunden Schweinen sehr ähnlich zu seinen eng verwandten Orthologen in Mensch und Maus sind, jedoch existieren speziesspezifische Unterschiede innerhalb der Orthologen. hCLCA4 und pCLCA4a weisen jedoch, wie hypothetisiert, bezüglich ihres Expressionsmusters größere Übereinstimmungen auf. Am auffälligsten ist die für hCLCA4 und pCLCA4a gemeinsame Expression im Respirationstrakt, die mCLCA6 fehlt. Dies lässt eine größere Homologie hinsichtlich der Expression dieser beiden Vertreter im Vergleich zu der Maus vermuten. Ob die genannten speziesspezifischen Expressionsdivergenzen zwischen den Tierarten auch unterschiedliche Funktionsmechanismen mit sich bringen, kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden. Fest steht jedoch, dass die Maus, der die mCLCA6-Expression in der Lunge fehlt, im CF-Modell keine bzw. nur eine sehr gering ausgeprägte Symptomatik zeigte (Guilbault et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnten Studien an CF-Schweinen zeigen, das diese Tiere alle typischen Symptome in den CF-relevanten Organen in einem sehr ausgeprägten Maße nachahmten (Meyerholz et al., 2010a und b). Besonders im Hinblick auf den Respirationstrakt scheint das Schwein bezüglich der größeren Homologie zum Menschen ein nahezu ideales Modell zu sein, da es in der Lage ist die typischen CF-Pathologien annähernd exakt widerzuspiegeln. Bezüglich der genannten Aspekte ist das neue CF-Schwein als zukünftiges CF-Tiermodell und als Modell zur Erforschung der CLCA-Funktionsmechanismen als CF-Modulatoren möglicherweise geeigneter als die CF-Maus.

Ausblick

Es bleiben allerdings noch einige Fragen diesbezüglich offen, so müssten nachfolgende Untersuchungen das hCLCA4-Proteinexpressionsmuster beim Menschen analysieren, um

einen direkten Vergleich mit seinem porzinen Orthologen pCLCA4a zu ermöglichen. Auch gibt es derzeit keine proteinbiochemischen Analysen zur Transmembranstruktur oder Proteinprozessierung und zum Funktionsmechanismus des humanen CLCA4-Vertreters, die Vergleiche zuließen. Von großer Bedeutung wäre des Weiteren die Klärung der Frage, ob pCLCA4a, ähnlich wie mCLCA6 (Bothe et al., 2008), eine Kolokalisation mit pCFTR-Kanälen besitzt. Diese unmittelbare Nachbarschaft beider Proteinfamilien könnte die Hypothese untermauern, dass die CLCA-Proteine Modulator-Kandidaten darstellen, die Einfluss auf die „alternative Chloridleitfähigkeit“ bei der CF nehmen (Ritzka et al. 2004; Leverkoehne et al. 2006; Young et al. 2007), wie bereits für mCLCA6 vermutet (Bothe et al., 2008). Das porzine CFTR-Protein ist bekannterweise sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene im oberen Respirationstrakt (Nasenschleimhaut, Trachea und Bronchi) exprimiert (Plog et al., 2010). Das korreliert mit der ermittelten pCLCA4a-Expression im Respirationstrakt. Somit ist hier die Möglichkeit einer räumlichen und funktionellen Interaktion im Respirationstrakt beider Proteine durchaus gegeben. Da der Respirationstrakt bei CF-Patienten zu den am häufigsten betroffenen Organsystemen zählt (Davis, 2006), wären nachfolgende Kolokalisationsanalysen von großem Interesse, um zu beurteilen, ob pCLCA4a möglicherweise im Respirationstrakt mit pCFTR in enger Nachbarschaft lokalisiert ist. Zweifelsohne ist eine Kolokalisation mit pCFTR allein noch kein Beweis für eine kompensatorische Funktion durch pCLCA4a bei der CF. Ebenso ist pCLCA4a gewiss nicht in der Lage, eine CFTR-vermittelte Leitfähigkeit vollständig zu ersetzen. Nachfolgende Studien zum Thema müssten aufklären, ob und in welchem Maße ein kompensatorischer Effekt ausgeübt wird. Möglicherweise besteht eine zumindestens partielle Kompensation der CLCA-Proteine. Dies ist als mögliches therapeuthisches Target sehr interessant. Diesbezüglich müsste vergleichend untersucht werden, wie sich die pCLCA4a-Expression im CF-Schwein verhält und welche funktionellen und regulatorischen Interaktionen dort vorliegen. Möglicherweise existieren gravierende Unterschiede zwischen gesunden Schweinen und den porzinen CF-Modellen.

Auch im Hinblick auf die potenziellen Funktionsmechanismen des pCLCA4a-Proteins als Modulator der Chloridleitfähigkeit und seine pathophysiologische Rolle bei der CF ist weiterer Forschungsaufwand nötig. Ob die *pCLCA*-Genregion ähnlich wie der humane *CLCA*-Genort für Mediatoren codiert, die durch eine Chloridleitfähigkeit den CF-Phänotypen modulieren (Ritzka et al., 2004) oder ob pCLCA4a möglicherweise als Adhäsionsfaktor oder als Regulator der Apoptose funktioniert, müsste nachfolgend aufgeklärt werden.

Nicht vergessen werden soll an dieser Stelle pCLCA4b. Wie bereits erwähnt, ist *pCLCA4b* ebenso wie *pCLCA4a* eine Genvariante aus einer Genduplikatur des *pCLCA*4-Genlocus. Diese Art der Genmutation wurde bislang noch bei keinem anderen CLCA-Vertreter festgestellt (Plog et al., 2009). Demzufolge kommt pCLCA4b gleichermaßen als porziner

Orthologe zu hCLCA4 und mCLCA6 in Betracht und könnte möglicherweise durch pCLCA4a offen gelassene Nischen besetzen. Noch ist unklar, ob es sich bei dieser Genduplikatur um einen evolutiven Mechanismus handelt, durch den ein funktionell neues *pCLCA*-Gen entstehen könnte, welches möglicherweise die ursprüngliche Genaktivität erweitert. Nachfolgende Studien müssten zunächst einmal klären, ob pCLCA4b als funktionsfähiges Protein exprimiert wird und in wieweit beide pCLCA4-Varianten in ihrem Expressionsmuster, ihrer Proteinstrukur, ihrer Proteinprozessierung und ihren Funktionsmechanismen übereinstimmen. Erst dadurch können Rückschlüsse auf die Rolle von pCLCA4b und die Bedeutung, die dieser bei den CLCA-Homologen einzigartigen Genduplikatur zukommt, gezogen werden.

6 Zusammenfassung

Expressionsanalyse, zelluläre Lokalisierung und proteinbiochemische Charakterisierung des porzinen CLCA-Homologen pCLCA4a –
Unterschiede zu seinen Orthologen bei Mensch und Maus?

Tanja Grötzsch

Die CLCA (engl.: *chloride channel regulators, calcium-activated)* - Familie umfasst eine Gruppe heterologer Proteine, die funktionell möglicherweise eine Ca^{2+}-abhängige Chloridleitfähigkeit an epithelialen Grenzflächen induzieren. Die CLCA-Proteine stellen dabei selbst keine echten Kanäle dar, sondern scheinen, neuen Erkenntnissen nach, eine indirekte Wirkung auf bislang unbekannte Proteine zu haben. Der humane Vertreter hCLCA4, der überwiegend im Intestinaltrakt und im Respirationstrakt exprimiert wird, scheint zudem eine bedeutende Rolle bei der Zystischen Fibrose (engl.: *cystic fibrosis*, CF) einzunehmen. Seine möglichen Funktionsmechanismen sind jedoch bislang noch unerforscht. Sein muriner Orthologe mCLCA6 ist mit dem mCFTR-Chloridkanal im Kolonepithel kolokalisiert, was ebenfalls für eine potenzielle Rolle als Modulator der „alternativen Chloridleitfähigkeit“ bei der CF sprechen könnte. Betrachtet man jedoch das Expressionsmuster dieser beiden nahe verwandten Vertreter, fallen gravierende speziesspezifische Unterschiede auf, da mCLCA6 im Gegensatz zu hCLCA4 nicht im CF-relevanten Respirationsepithel exprimiert ist. Daraus resultierende Funktionsunterschiede dieser beiden CLCA-Orthologen müssen daher zu diesem Zeitpunkt angenommen werden. Die somit eingeschränkte Übertragbarkeit von Daten der einen Spezies auf die andere schränkt den Gebrauch von Tiermodellen bei der translationalen Erforschung humaner Krankheiten wie der CF erheblich ein. Das bislang als Tiermodell verwendete CF-Mausmodell zeigt phänotypisch starke Abweichungen gegenüber dem humanen CF-Phänotyp. Gerade die Hauptmanifestation der humanen CF in der Lunge, deren Auswirkung bei den meisten Betroffenen der Grund für den tödlichen Krankheitsverlauf ist, fehlt im murinen CF-Modell fast gänzlich. Dadurch ist der Modellcharakter der CF-Maus zur Erforschung dieser dramatischen Erkrankung erheblich limitiert. Jüngst ist es gelungen, CF-Schweinemodelle zu generieren, die den CF-Phänotyp des Menschen wesentlich besser widerzuspiegeln scheinen.

Insofern verfolgte diese Forschungsarbeit das Ziel, den porzinen Orthologen zu hCLCA4 und mCLCA6, pCLCA4a, proteinbiochemisch zu charakterisieren und sein Expressionsmuster zu ermitteln, um so einen Vergleich zwischen den Spezies zu ermöglichen und eventuell bestehende speziesspezifische Unterschiede zwischen den Orthologen aufzudecken.

RT-PCR-Analysen zur Klärung dieser Frage ermittelten eine mRNA-Expression im oberen Respirationstrakt, im Intestinaltrakt und, deutlich schwächer, auch im Auge und im Uterus. Mittels spezifischer, hier erzeugter anti-pCLCA4a-Antikörper wurde das pCLCA4a-Protein immunhistochemisch im bronchialen Zilienepithel des oberen Respirationstrakts und in der apikalen Bürstensaummembran im oberen Drittel der Zotten des gesamten Dünndarms nachgewiesen. Computergestützte Analysen zur Proteinstruktur und die proteinbiochemischen Untersuchungen mittels Westernblot weisen darauf hin, dass pCLCA4a einen ähnlichen sekretorischen Weg durch die Zelle nimmt wie mCLCA6. Demnach unterliegt auch pCLCA4a den CLCA-typischen Proteinmodifikationen in Form einer posttranslationalen Spaltung des Vorläuferproteins im Endoplasmatischen Retikulum in ein 110 kDa-amino-terminales Spaltprodukt und ein 52 kDa- bzw 42 kDa-carboxy-terminales Spaltprodukt und Glykosylierungen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. Schließlich wird pCLCA4a offensichtlich zur apikalen Zellmembran zielgeleitet, wo es mit einer carboxy-terminalen Transmembrandomäne membranverankert vorliegt. Lediglich das amino-terminale Spaltprodukt des pCLCA4a-Proteins kann in den extrazellulären Raum abgegeben werden.

Trotz einiger hier beobachteter speziesspezifischer Abweichungen des pCLCA4a-Expressionsmusters von dem seiner humanen und murinen Orthologen besteht offensichtlich eine beträchtlich größere Homologie des Expressionsmusters in CF-relevanten Organen zwischen hCLCA4 und pCLCA4a als zwischen hCLCA4 und mCLCA6. Dies stützt die Auffassung, dass CF-Schweinemodelle geeigneter zu sein scheinen, die Rolle von hCLCA4 bei der CF zu studieren, als es durch die Verwendung der heute verfügbaren Mausmodelle möglich wäre. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit könnten damit zum Verständnis der speziesspezifischen Unterschiede beim CF-Phänotypen verhelfen und ermöglichen nachfolgenden Arbeiten, die Funktionsmechanismen dieser Proteine im transepithelialen Ionentransport und ihre möglichen Modulatorfunktionen bei Krankheiten wie der CF aufzudecken.

7 Summary

Expression pattern analysis, cellular localization and biochemical characterization of the porcine homolog CLCA4a –
Are there differences from its human and murine orthologs?

Tanja Grötzsch

The CLCA (chloride channel regulators, calcium-activated) family contains a group of heterologous proteins which induce a Ca^{2+}-dependent chloride current at epithelial interfaces. The CLCA do not represent real chlorid channels but, according to new insights, they have an indirect effect on so far unknown proteins. The human CLCA4 which is predominantly located in the intestinal tract and in the respiratory tract seems to play an important role in cystic fibrosis (CF). Possible functional mechanisms of hCLCA4 have not been investigated to date. Its murine ortholog mCLCA6 is colocalized with the murine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) at the apical surface of colonic crypt cells, which may argue for a potential role as modulator of the “alternative chloride current“ in CF. However, considering the expression patterns of these two closely related CLCA members, species-specific differences are obvious because mCLCA6 is, unlike hCLCA4, not expressed in CF-relevant respiratory epithelial cells. Thus, functional differences of these two CLCA orthologs have to be assumed at the moment. The limited transferability of data from one species to the other restricts the use of animal models for translational research in human diseases such as CF. The CF mouse model which has been used as an animal model for the investigation of CF so far shows considerable variations compared to the human CF phenotype. The predominant CF lung phenotype of human patients is nearly totally missing in the murine CF model. The usefulness of the CF mouse model for the investigation of this severe disease is thus limited. Recently, CF pig models have been successfully generated which seem to reflect the human CF phenotype more closely.

The intention of this work was to characterize biochemical properties of the porcine ortholog to hCLCA4 and mCLCA6, pCLCA4a, and to determine its expression patterns. With this knowledge, a comparison between the species should be possible, and species-specific differences of CLCA orthologs will become obvious.

RT-PCR analyses revealed strong pCLCA4a mRNA expression in the upper respiratory tract, in the intestinal tract and considerably lower in the eye and in the uterus. Using new generated specific anti-pCLCA4a antibodies, the pCLCA4a protein was immunohistochemically detected in the bronchial ciliated epithelium of the upper respiratory tract and in the brush border of enterocytes in the apical third of small intestine villi. Computer-aided

predictions of the protein structure as well as biochemical investigations by immunoblotting analyses suggest a way of intracellular movement for pCLCA4a that is similar to the secretory pathway of mCLCA6. According to this, pCLCA4a is posttranscriptionally regulated similar to other CLCA proteins, being cleaved into a 110 kDa-amino-terminal and two 52 kDa- and 42 kDa-carboxy-terminal products and glycosylated in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. pCLCA4a is obviously transported to the apical cell membrane where it is found anchored by a carboxy-terminal transmembrane domain. Only the amino-terminal cleavage product of the pCLCA4a protein was detected in the extracellular medium.

Despite some species-specific differences between the pCLCA4a expression pattern and that of its human and murine orthologs, the expression patterns of hCLCA4 and pCLCA4a in CF relevant tissues have more in common than hCLCA4 and mCLCA6 have. This supports the idea that porcine CF models are more suitable to study the role of hCLCA4 in CF than currently available murine models are. In this respect, the results of this work could help in investigating the species-specific differences of the CF phenotype. Future studies could use these results as a basis to investigate the functional mechanisms of these proteins in the transepithelial anion conductance and to discover their potential modulatory functions in diseases such as cystic fibrosis.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenetischer Baum zur Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen der porzinen, humanen und murinen CLCA-Familienmitglieder 62

Abb. 2: Signalsequenz (AS 1 bis 21) von pCLCA4a nach Vorhersage des Programms SignalP 3.0.. 63

Abb. 3: Vergleichende Darstellung der potenziellen Transmembrandomänen und deren Positionen innerhalb der pCLCA4a-Aminosäuresequenz durch die verwendeten Computerprogramme..... 64

Abb. 4: Graphische Darstellung des favorisierten Transmembranmodells für das pCLCA4a-Protein nach Vorhersagen des Programms SOSUI. 65

Abb. 5: Schematische Darstellung der potenziellen Glykosylierungsstellen nach Analysen des NetGlyc 1.0 Servers innerhalb der pCLCA4a-Sequenz. 67

Abb. 6: pCLCA4a-mRNA-Expression in den Organen des Schweins, Kreuzreaktivitäten mit pCLCA4a, pCLCA1 und pCLCA2. 69

Abb. 7: Schematische Darstellung der pCLCA4a-Proteinsequenz mit den Positionen der generierten anti-pCLCA4a-Antikörper 71

Abb. 8: Detektion des pCLCA4a-Proteins durch die anti-pCLCA4a-Antikörper im Zelllysat und Zellkulturüberstand und Nachweis der posttranslationalen Spaltung mittels Westernblot 72

Abb. 9: Organspezifische Detektion von pCLCA4a mittels Westernblot 73

Abb. 10: Westernblotanalyse des LCM-Materials zur Detektion des pCLCA4a-Proteins in jejunaler Schleimhaut und Nachweis des Referenzproteins β-Actin..... 75

Abb. 11: Schematische Darstellung des IP-Präzipitats [pCLCA4a-Protein und carboxyterminaler AK (p4a-C-1a)] und Detektion des Präzipitats durch den aminoterminalen AK (p4a-N-1b) im Westernblot 76

Abb. 12: Detektion der IP-Präzipitate (Zelllysat pCLCA4a-transfizierter HEK 293-Zellen bzw. ausgewählter Organlysate) mit den pCLCA4a-spezifischen Antikörpern 77

Abb. 13: Schematische Darstellung einer eukaryontischen Zelle und der posttranslationalen Proteinmodifizierung durch N-Glykosylierungen im rER und im Golgi-Apparat 78

Abb. 14: Bestimmung des Glykosylierungsmusters von pCLCA4a in Zelllysat und Medium nach PNGaseF- bzw. EndoH-Verdau..... 79

Abb. 15: Zelluläres Expressionsmuster von pCLCA4a, immunhistochemisch detektiert unter Verwendung des amino-terminalen Antikörpers (p4a-N-1b) und Kontrolle mittels Präimmunserum 81

Abb. 16: Zelluläres Expressionsmuster von pCLCA4a, immunhistochemisch detektiert unter Verwendung des carboxy-terminalen Antikörpers (p4a-C-1a) und Kontrolle mittels Präimmunserum 82

Abb. 17: Zelluläres Expressionsmuster von pCLCA4a, immunhistochemisch detektiert unter Verwendung des amino-terminalen Antikörper (p4a-N-1b) sowie des carboxy-terminalen Antikörpers (p4a-C-1a) und Kontrolle mittels Präinkubation .. 83

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewebeexpression mit vermuteter Funktion und Referenz der bekannten humanen, murinen und porzinen CLCA-Vertreter……. 8

Tabelle 2: Computerprogramme zur Peptidsequenzanalyse von pCLCA4a…….32

Tabelle 3: Immunisierungsschema der Fa. Biogenes zur Antikörpergenerierung……34

Tabelle 4: BSA-Standardreihe zur Kalibrierung bei der Proteinkonzentrationsbestimmung und BSA-Menge pro Ansatz……37

Tabelle 5: Primersequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Amplifizierung von pCLCA4a und EF-1alpha…… 39

Tabelle 6: PCR-Mix für die DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas)……..40

Tabelle 7: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifizierung von pCLCA4a und EF-1alpha im Gradientencycler……...40

Tabelle 8: Ansatz für den Restriktionsenzymverdau des Vektors pcDNA3.1(+)…….. 41

Tabelle 9: PCR-Ansatz zur T-Addition des linearisierten Vektors pcDNA3.1(+)……...42

Tabelle 10: PCR-Mix für die Amplifizierung des ORF von pCLCA4a……43

Tabelle 11: Temperatur-Zeit-Programm zur Amplifizierung des ORF von pCLCA4a…… 44

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor und Insert…….. 45

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die PCR zur Identifizierung der gepickten pCLCA4a-Klone…….. 46

Tabelle 14: Antikörper-Protein-Verdünnungen für die Immunopräzipitation……50

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese……...52

Tabelle 16: Eingesetzte Erst- und Zweitantikörper und deren optimale Verdünnungen für die Westernblotanalysen des pCLCA4a-Proteins……..54

Tabelle 17: Färbeprotokoll für die Kryostatschnitte zur Proteomanalyse vor LCM…….56

Tabelle 18: Allgemein verwendete Chemikalien und ihre Quellen…… 61

Tabelle 19: Vergleichende Darstellung der Expressionsmuster von pCLCA4a, hCLCA4 und mCLCA6 auf RNA- bzw. Proteinebene……89

10 Literaturverzeichnis

Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU (2001): The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. J Biol Chem. 276:25438-46.

Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU (2002): Focal adhesion kinase activated by β_4 integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. J Biol Chem. 277:34391-400.

Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Lin H, DiBasio J, Pauli BU (2003): The interacting binding domains of the β4 integrin and calcium-activated chloride channels (CLCAs) in metastasis. J Biol Chem. 278:49406-16.

Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S (2004): Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. J Virol. 78:9605-11.

Agnel M, Vermat T, Culouscou JM (1999): Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. FEBS Lett. 455:295-301.

Aigner B, Renner S, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Wünsch A, Wolf E (2010): Transgenic pigs as models for translational biomedical research. J Mol Med (Berl). 88:653-64.

Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT (2006): CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. N Engl J Med. 354:1117-29.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004): Zellkompartimente und Proteinsortierung. in Molekularbiologie der Zelle. Jaenicke L (eds): WILEY-VCH Verlag GmbH & CoKGaA, Weinheim, 4th Ed, 764.

Al-Jumaily M, Kozlenkov A, Mechaly I, Fichard A, Matha V, Scamps F, Valmier J, Carroll P. (2007): Expression of three distinct families of calcium-activated chloride channel genes in the mouse dorsal root ganglion. Neurosci Bull. 23:293-9.

Andersen DH (1938): Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. Am J Dis Child. 56:344-99.

Anelli T, Sitia R (2008): Protein quality control in the early secretory pathway. EMBO J. 27:315-27.

.

Anton F, Leverkoehne I, Mundhenk L, Thoreson WB, Gruber AD (2005): Overexpression of eCLCA1 in small airways of horses with recurrent airway obstruction. J Histochem Cytochem. 53:1011-21.

Atherton HC, Jones G, Danahay H (2003): IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 285:730-9.

Beckley JR, Pauli BU, Elble RC (2004): Re-expression of detachment-inducible chloride channel mCLCA5 suppresses growth of metastatic breast cancer cells. J Biol Chem. 279:41634-41.

Bell JA (1999): Ferret nutrition. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2:169-192.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004): Improved prediction of signalpeptides: SignalP 3.0. J Mol Biol. 340:783-95.

Bertani G (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J Bacteriol. 62:293-300.

Blobel G, Dobberstein B (1975): Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol. 67:835-51.

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. J Mol Biol. 294:1351-62.

Bothe MK, Braun J, Mundhenk L, Gruber AD (2008): Murine mCLCA6 is an integral apical membrane protein of non-goblet cell enterocytes and co-localizes with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Histochem Cytochem. 56:495-509.

Bothe MK, Mundhenk L, Kaup M, Weise C, Gruber AD (2011): The murine goblet cell protein mCLCA3 is a zinc-dependent metalloprotease with autoproteolytic activity. Mol Cells. 32:535-41.

Boucher RC (2007): Airway surface dehydration in cystic fibrosis: Pathogenesis and therapy. Annu Rev Med. 58:157-70.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54.

Brambilla G, Cantafora A (2004): Metabolic and cardiovascular disorders in highly inbred lines for intensive pig farming: how animal welfare evaluation could improve the basic knowledge of human obesity. Ann Ist Super Sanita. 40:241-4.

Braun J, Bothe MK; Mundhenk L; Beck C; Gruber AD (2010): Murine mCLCA5 is expressed in granular layer keratinocytes ofstratified epithelia. Histochem Cell Biol. 133:285-99.

Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, Greipel J, Hundrieser J, Halley DJ, Laabs U, Busche R, De Jonge HR, Tummler B, Veeze HJ (2000): Residual chloride secretion in intestinal tissue of deltaF508 homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. The European CF Twin and Sibling Study Consortium. Gastroenterology. 119:32-40.

Brooks SA (2006): Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. Expert Rev Proteomics. 3:345-59.

Brouillard F, Bensalem N, Hinzpeter A, Tondelier D, Trudel S, Gruber AD, Ollero M, Edelman A (2005): Blue native-SDS PAGE analysis reveals reduced expression of the mClCA3 protein in cystic fibrosis knockout mice. Mol Cell Proteomics. 4:1762-75.

Busse WW, Lemanske RF Jr (2001): Asthma. N Engl J Med. 344:350-62.

Bustin SA, Li SR, Dorudi S (2001): Expression of the Ca^{2+}-activated chloride channel genes CLCA1 and CLCa2 is downregulated in human colorectal cancer. DNA Cell Biol. 20:331-8.

Chaber BA, Boral AL, Multani P (1998): Translational Research: Walking the Bridge Between Idea and Cure- Seventeenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. Cancer Res. 58:4211-6.

Cho HJ, Joo NS, Wine JJ (2011): Defective fluid secretion from submucosal glands of nasal turbinates from CFTR-/- and CFTR (ΔF508/ΔF508) pigs. PLoS One. 6:24424.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162:156-9.

Chung C, Fang I, Nguyen V, Luk C, Kent G, Rozmahel R (2001): Investigation of mCLCA3 as a modifier of CF disease in mice. Pediatr Pulmonol. (Suppl) 22:A125.

Clarke AF (1987): A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. Equine Vet J.19:435-41.

Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC (1994): Relationship of a non–cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cftr(−/−) mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 91:479-83.

Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008): The Jpred 3 secondary structure prediction server. Nucleic Acids Res. 36 (Web Server issue):W197-201.

Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, MacVinish LJ, Anderson JR, Cuthbert AW, Evans MJ (1995): Generation and characterization of a *D*F508 cystic fibrosis mouse model. Nature Genet. 10:445-52.

Connon CJ, Yamasaki K, Kawasaki S, Quantock AJ, Koizumi N, Kinoshita S (2004): Calcium-activated chloride channel-2 in human epithelia. J Histochem Cytochem. 52:415-8.

Craven RA, Banks RE (2003): Laser capture microdissection for proteome analysis. Curr Protoc Protein Sci. Chapter 22:Unit 22.3.

Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A (1997): Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. Protein Eng. 10:673-6.

Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, Fuller CM (1995): Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. J Biol Chem. 270:31016-26.

Danahay H, Atherton H, Jones G, Bridges RJ, and Poll CT (2002): Interleukin-13 induces a hypersecretory ion transport phenotype in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 282:226-36.

Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006): The c-Myc target gene network. Semin Cancer Biol. 16:253-64.

Davidson DJ, Dorin JR, McLachlan G, Ranaldi V, Lamb D, Doherty C, Govan J, Porteous DJ (1995): Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. Nat Genet. 9:351-7.

Davidson DJ, Dorin JR (2001): The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. Expert Rev Mol Med. 2001:1-27.

Davidson H, McLachlan G, Wilson A, Boyd AC, Doherty A, MacGregor G, Davies L, Painter HA, Coles R, Hyde SC, Gill DR, Amaral MD, Collie DD, Porteous DJ, Penque D (2006): Human-specific cystic fibrosis transmembrane conductance regulator antibodies detect in vivo gene transfer to ovine airways. Am J Respir Cell Mol Biol. 35:72-83.

Davies JC, Alton EW, Bush A (2007): Cystic fibrosis. BMJ. 335:1255-9.

Davis E, Rush BR (2002): Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. Vet Clin North Am Equine Pract.18:453-67.

Davis PB (2006): Cystic fibrosis since 1938. Am J Respir Crit Care Med. 173:475-82.

Deep G, Gangar S, Agarwal C, Agarwal R. (2011): Role of E-cadherin in anti-migratory and anti-invasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. Cancer Prev Res (Phila). 4:1222-32.

Delaney SJ, Alton EW, Smith SN, Lunn DP, Farley R, Lovelock PK, Thomson SA, Hume DA, Lamb D, Porteous DJ, Dorin JR, Wainwright BJ (1996): Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. EMBO J. 15:955-63.

Donaldson SH, Boucher RC (2007): Sodium channels and cystic fibrosis. Chest. 132:1631-6.

Dorin JR, Dickinson P, Alton EWFW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimbe WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ (1992a): Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. Nature. 359:211-5.

Dorin JR, Dickinson P, Emslie E, Clarke AR, Dobbie L, Hooper ML, Halford S, Wainwright BJ, Porteous DJ (1992b): Successful targeting of the mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonal stem cells. Transgenic Res. 1:101-5.

Ehrenberg L, Fedorcsak I, Solymosy F (1976): Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 16:189-262.

Elble RC, Widom J, Gruber AD, Abdel-Ghany M, Levine R, Goodwin A, Cheng HC, Pauli BU (1997): Cloning und characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. J Biol Chem. 272:27853-61.

Elble RC, Pauli BU (2001): Tumor suppression by a proapoptotic calcium-activated chloride channel in mammary epithelium. J Biol Chem. 276:40510-7.

Elble RC, Ji G, Nehrke K, DeBiasio J, Kingsley PD, Kotlikoff MI, Pauli BU (2002): Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. J Biol Chem. 277:18586-91.

Elble RC, Walia V, Cheng HC, Connon CJ, Mundhenk L, Gruber AD, und Pauli BU (2006): The putative chloride channel hCLCA2 has a single C-terminal transmembrane segment. J Biol Chem. 281:29448-54.

El-Deiry WS (2003): The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. Oncogene. 22:7486-95.

Elferink RO, Beuers U (2009): Are pigs more human than mice? J Hepatol. 50:838-41.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996): Laser capture microdissection. Science. 274:998-1001.

Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM (1992): Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. Nat Genet. 2:240-8.

Engers R, Gabbert HE (2000): Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. J Cancer Res Clin Oncol. 126:682-92.

Espinosa M, Noe G, Troncoso C, Ho SB, Villalon M (2002): Acidic pH and increasing [Ca(2+)] reduce the swelling of mucins in primary cultures of human cervical cells. Hum Reprod. 17:1964-72.

Evans SR, Thoreson WB, Beck CL (2004): Molecular and functional analyses of two new calcium-activated chloride channel family members from mouse eye and intestine. J Biol Chem. 279:41792-800.

Frizzell RA (1995): Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. Am J Respir Crit Care Med. 151:54-8.

Furuya M, Kirschbaum SB, Paulovich A, Pauli BU, Zhang H, Alexander JS, Farr AG, Ruddell A (2010): Lymphatic endothelial murine chloride channel calcium-activated 1 is a ligand for leukocyte LFA-1 and Mac-1. J Immunol. 185:5769-77.

Gabriel SE, Racette KJ, Gaspar KJ, and Forsyth GW (1992): Inhibition of ileal brush-border chloride conductance by specific antibody. J Membr Biol. 129:323-8.

Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ (1993): CFTR and outwardly rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. Nature. 363:263-8.

Gandhi R, Elble RC, Gruber AD, Schreur KD, Ji H-L, Fuller CM, Pauli BU (1998): Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. J Biol Chem. 273:32096-101.

Gaspar KJ, Racette KJ, Gordon JR, Loewen ME, Forsyth GW (2000): Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. Physiol Genomics. 3:101-11.

Gibson A, Lewis AP, Affleck K, Aitken AJ, Meldrum E, Thompson N (2005): hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. J Biol Chem. 280:27205-12.

Gilljam M, Moltyaner Y, Downey GP, Devlin R, Durie P, Cantin AM, Zielenski J, Tullis DE (2004): Airway inflammation andinfection in congenital bilateral absence of the vas deferens. Am J Respir Crit Care Med. 169:174-9.

Glavac D, Ravnik-Glavac M, Potocnik U, Dean M, Wine J (2000): Screening methods for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in non-human primates. Pflugers Arch. 439:12-3.

Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. (2008): RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. FEBS Lett. 582:1977-86.

Goldblatt EM, Lee WH (2010): From bench to bedside: the growing use of translational research in cancer medicine. Am J Transl Res. 2:1-18.

Govan JR, Nelson JW (1992): Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. Br Med Bull. 48:912-30.

Grubb BR, Boucher RC (1999): Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. Physiol Rev. 79:193-214.

Gruber AD, Levine RA (1997): *In situ* assessment of mRNA accessibility in heterogeneous tissue samples using Elongation Factor-1a. Histochem Cell Biol. 107:411-6.

Gruber AD, Elble RC, Ji HL, Schreur KD, Fuller CM, Pauli BU (1998a): Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca2+-activated Cl−channel proteins. Genomics. 54:200-14.

Gruber AD, Gandhi R, Pauli BU (1998b): The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. Histochem Cell Biol. 110:43-9.

Gruber AD, Pauli BU. (1999a): Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca2+-activated Cl- channels. Biochim Biophys Acta. 1444:418-23.

Gruber AD, Pauli BU (1999b): Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca2+-activated chloride channel CLCA2. Cancer Res. 59:5488-91.

Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, Pauli BU (1999c): Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. Am J Physiol. 276:1261-70.

Gruber AD, Fuller CM, Elble RC, Benos DJ, Pauli BU (2000): The CLCA gene family: a novel family of putative chloride channels. Curr Genomics. 1:201-22.

Gruber AD, Elble RC, Pauli BU (2002): Discovery and cloning of the CLCA gene family. Curr Top Membr. 53:367-87.

Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D (2007): Cystic fibrosis mouse models. Am J Respir Cell Mol Biol. 36:1-7.

Hamann M, Gibson A, Davies N, Jowett A, Walhin JP, Partington L, Affleck K, Trezise D, Main M (2009): Human ClCa1 modulates anionic conduction of calcium-dependent chloride currents. J Physiol. 587:2255-74.

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 166:557-80.

Harris A (1997): Towards an ovine model of cystic fibrosis. Hum Mol Genet. 6:2191-4.

Hauber HP, Tsicopoulos A, Wallaert B, Griffin S, McElvaney NG, Daigneault P, Mueller Z, Olivenstein R, Holroyd KJ, Levitt RC und Hamid Q (2004): Expression of HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction. Eur Respir J. 23:846-50.

Helenius A, Aebi M (2001): Intracellular functions of N-linked glycans. Science. 291:2364-9.

Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T (2005): Role of the beta1-integrin subunit in the adhesion, extravasation and migration of T24 human bladder carcinoma cells. Clin Exp Metastasis. 22:99-106.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998): SOSUI: classification und secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics. 14:378-9.

Hofman K, Stoffel W (1993): TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol Chem Hoppe Seyler. 374:166.

Hoshino M, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Nagi T, Nakanishi A, Ashida Y, Nishimura O, Fujisawa Y, Fujino M (2002): Increased expression of the human Ca2+-activated Cl-channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. Am J Respir Crit Care Med. 165:1132-6.

Houdebine LM (2007): Transgenic animal models in biomedical research. Methods Mol Biol. 360:163-202.

Huan C, Greene KS, Shui B, Spizz G, Sun H, Doran RM, Fisher PJ, Roberson MS, Elble RC, Kotlikoff MI (2008): mCLCA4 ER processing and secretion requires luminal sorting motifs. Am J Physiol Cell Physiol. 295:279-87.

Ip WF, Bronsveld I, Kent G, Corey M, Durie PR (1996): Exocrine pancreatic alterations in long-lived surviving cystic fibrosis mice. Pediatr Res. 40:242-9.

Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Mochimaru Y (2012): Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. Nagoya J Med Sci. 74:1-18.

Itani OA, Chen JH, Karp PH, Ernst S, Keshavjee S, Parekh K, Klesney-Tait J, Zabner J, Welsh MJ (2011): Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl- conductance but not increased Na+ conductance. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:10260-5.

Itoh R, Kawamoto S, Miyamoto Y, Kinoshita S, Okubo K. (2000): Isolation and characterization of a Ca2+-activated chloride channel from human corneal epithelium. Curr Eye Res. 21:918-25.

Johnson LG, Boyles SE, Wilson J, Boucher RC (1995): Normalization of raised sodium absorption and raised calcium-mediated chloride secretion by adenovirus-mediated expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary human cystic fibrosis airway epithelial cells. J Clin Invest. 95:1377-82.

Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y (2004): Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. Genes Immun. 5:540-7.

Keene JD (2007): RNA regulons: Coordination of post-transcriptional events. Nat Rev Genet. 8:533-43.

Keiser NW, Engelhardt JF (2011): New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? Curr Opin Pulm Med. 17:478-83.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 245:1073-80.

Khansaheb M, Choi JY, Joo NS, Yang YM, Krouse M, Wine JJ (2011): Properties of substance P-stimulated mucus secretion from porcine tracheal submucosal glands. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 300:370-9.

Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kröner C, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritzi K, Gruber AD, Wolf E (2011) Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. J Mol Med (Berl). 90:597-608.

Knowles MR, Gatzy J, Boucher R (1981): Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. N Engl J Med. 305:1489-95.

Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzy JT, Boucher RC (1983): Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. Science. 221:1067-70.

Kobata A (1992): Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. Eur J Biochem. 209:483-501.

Kohn EC, Liotta LA (1995): Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. Cancer Res. 55:1856-62.

Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S (1999): Cloning and identification of the gene gob-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. Biochem Biophys Res Commun. 255:347-51.

Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV (2002): Selection in the evolution of gene duplications. Genome Biol. 3:Research0008.

Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol. 157:105-32.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-5.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0.Bioinformatics. 23:2947-8.

Lee D, Ha S, Kho Y, Kim J, Cho K, Baik M, Choi Y (1999): Induction of mouse Ca(2+)-sensitive chloride channel 2 gene during involution of mammary gland. Biochem Biophys Res Commun. 264:933-7.

Leguillette R (2003): Recurrent airway obstruction - heaves. Vet Clin North Am Equine Pract. 19:63-86.

Leigh MW, Gambling TM, Carson JL, Collier AM, Wood RE, Boat TF (1986): Postnatal development of tracheal surface epithelium and submucosal glands in the ferret. Exp Lung Res. 10:153-69.

Leverkoehne I, Gruber AD (2002) The murine mCLCA3 (alias gob-5) protein is located in the mucin granule membranes of intestinal, respiratory, und uterine goblet cells. J Histochem Cytochem. 50:829-38.

Leverkoehne I, Horstmeier BA, von Samson-Himmelstjerna G, Scholte BJ, Gruber AD (2002): Real-time RT-PCR quantitation of mCLCA1 and mCLCA2 reveals

differentially regulated expression in pre- and postnatal murine tissues. Histochem Cell Biol. 118:11-7.

Leverkoehne I, Holle H, Anton F, Gruber AD (2006): Differential expression of calcium-activated chloride channels (CLCA) gene family members in the small intestine of cystic fibrosis mouse models. Histochem Cell Biol. 126:239-50.

Li Z, Engelhardt JF (2003): Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis bysomatic cell nuclear transfer. Reprod Biol Endocrinol. 1:83.

Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF (2006): Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. Dev Biol. 293:439-48.

Liu X, Luo M, Zhang L, Ding W, Yan Z, Engelhardt JF (2007): Bioelectric properties of chloride channels in human, pig, ferret, and mouse airway epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. 36:313-23.

Loewen ME, Gabriel SE, Forsyth GW (2002a): The calcium-dependent chloride conductance mediator pCLCA1. Am J Physiol Cell Physiol. 283:412-21.

Loewen ME, Bekar LK, Gabriel SE, Walz W, Forsyth GW (2002b): pCLCA1 becomes a cAMP-dependent chloride conductance mediator in Caco-2 cells. Biochem Biophys Res Commun. 298:531-6.

Loewen ME, Bekar LK, Walz W, Forsyth GW, Gabriel SE (2004): pCLCA1 lacks inherent chloride channel activity in an epithelial colon carcinoma cell line. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287:33-41.

Loewen ME, Forsyth GW (2005): Structure and function of CLCA proteins. Physiol Rev. 85:1061-92.

Lunney JK (2007): Advances in swine biomedical model genomics. Int J Biol Sci. 3:179-84.

Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH (1989): Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Anal Biochem. 180:195-204.

Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K (2003): Modulation of Ca2+-activated Cl- secretion by basolateral K+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. Pediatr Res. 53:608-18.

Martoglio B, Dobberstein B (1998): Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends Cell Biol. 8:410-5.

Mata J, Marguerat S, Bahler J. (2005): Post-transcriptional control of gene expression: A genome-wide perspective. Trends Biochem Sci. 30:506-14.

Matsui H, Grubb BR, Tarran R,Randell SH, Gatzy JT, Davis CW, Boucher RC (1998): Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. Cell. 95:1005-15.

Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, Welsh MJ (2010a): Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. Am J Pathol. 176:1377-89.

Meyerholz DK, Stoltz DA, Namati E, Ramachandran S, Pezzulo AA, Smith AR, Rector MV, Suter MJ, Kao S, McLennan G, Tearney GJ, Zabner J, McCray PB Jr, Welsh MJ (2010b): Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. Am J Respir Crit Care Med. 182:1251-61.

Miller TL, Touch SM, Shaffer TH (2006): Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression profiles in tracheal aspirates do not adequately reflect tracheal or lung tissue profiles in neonatal respiratory distress: observations from an animal model. Pediatr Crit Care Med. 7:63-9.

Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR (2008): Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genet Med. 10:851-68.

Mundhenk L, Alfalah M, Elble RC, Pauli BU, Naim HY, Gruber AD (2006): Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. J Biol Chem. 281:30072-80.

Nakai K, Horton P (1999): PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends Biochem Sci. 24:34-6.

Nakanishi A, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Ashida Y, Shirafuji H, Fujisawa Y, Nishimura O, Fujino M (2001): Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyper-responsiveness in asthma. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:5175-80.

Ohno S (1999): Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. Semin Cell Dev Biol. 10:517-22.

O‘Neal WK, Hasty P, McCray PB, Casey B, Pérez JM, Welsh J, Beaudet AL, Bradley A (1993): A severe phenotype in mice with duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. Hum Mol Genet. 2:1561-9.

Oppenheimer EH, Esterley JR (1975): Pathology of cystic fibrosis: review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. Perspect Pediatr Pathol. 2:241-78.

Ostedgaard LS, Rogers CS, Dong Q, Randak CO, Vermeer DW, Rokhlina T, Karp PH, Welsh MJ (2007): Processing and function of CFTR-ΔF508 are species-dependent. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:15370-5.

Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen JH, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, Ernst SE, Hanfland RA, Reznikov LR, Ludwig PS, Rogan MP, Davis GJ, Dohrn CL, Wohlford-Lenane C, Taft PJ, Rector MV, Hornick E, Nassar BS, Samuel M, Zhang Y, Richter SS, Uc A, Shilyansky J, Prather RS, McCray PB Jr, Zabner J, Welsh MJ, Stoltz DA (2011): The ΔF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. Sci Transl Med. 3:74ra24.

Panja S, Aich P, Jana B, Basu T (2008): How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli? Mol Membr Biol. 25:411-22.

Patel AC, Morton JD, Kim EY, Alevy Y, Swanson S, Tucker J, Huang G, Agapov E, Phillips TE, Fuentes ME, Iglesias A, Aud D, Allard JD, Dabbagh K, Peltz G Holtzman MJ (2006): Genetic segregation of airway disease traits despite redundancy of calcium-activated chloride channel family members. Physiol Genomics. 25:502-13.

Patel AC, Brett TJ, Holtzman MJ (2009): The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. Annu Rev Physiol. 71:425-49.

Pawlowski K, Lepisto M, Meinander N, Sivars U, Varga M, Wieslander E (2006): Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels. Proteins. 63:424-39.

Perlman CE, Cook KE, Seipelt JR Mavroudis JC, Backer JC, Mockros LF. (2005): In vivo hemodynamic responses to thoracic artificial lung attachment. ASAIO J. 51:412-25.

Peters RHPC, Van Doorninck JH, French PJ, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH, Buman J,Scholte BJ (1997): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates the cyclic adenosine monophosphate-induced fluid secretion but not the inhibition of resorption in mouse gallbladder epithelium. Hepatology. 25:270-7.

Pierucci-Alves F, Akoyev V, Stewart JC 3rd, Wang LH, Janardhan KS, Schultz BD (2011): Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth. Biol Reprod. 85:442-51.

Plog S, Mundhenk L, Klymiuk N, Gruber AD (2009): Genomic, tissue expression, and protein characterization of pCLCA1, a putative modulator of cystic fibrosis in the pig. J Histochem Cytochem. 57:1169-81.

Plog S, Mundhenk L, Bothe MK, Klymiuk N, Gruber AD (2010): Tissue and cellular expression patterns of porcine CFTR: similarities to and differences from human CFTR. J Histochem Cytochem. 58:785-97.

Plog S, Grötzsch T, Klymiuk N, Kobalz U, Gruber AD, Mundhenk L (2012): The Porcine Chloride Channel Calcium-Activated Family Member pCLCA4a Mirrors Lung Expression of the Human hCLCA4. J Histochem Cytochem. 60:45-56.

Quinton PM (1999): Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. Physiol Rev. 79:3-S22.

Quinton PM (2010): Role of epithelial HCO_3^- transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. J Physiol Cell Physiol. 299:C1222-33.

Racay P (2002): Genetically modified animals and human medicine. Bratisl Lek Listy. 103:121-6.

Ran S, Benos DJ (1991): Isolation and functional reconstitution of a 38-kDa chloride channel protein from bovine tracheal membranes. J Biol Chem. 266:4782-8.

Ran S, Benos DJ (1992): Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl- channel protein isolated from bovine trachea. J Biol Chem. 267:3618-25.

Range F, Mundhenk L, Gruber AD (2007): A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction. Vet Pathol. 44:901-11.

Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993): Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. Nature Genet. 4:35-41.

Reynaert I, Van Der Schueren B, Degeest G, Manin M, Cuppens H, Scholte B, Cassiman JJ (2000): Morphological changes in the vas deferens and expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in control, delta F508 and knock-out CFTR mice during postnatal life. Mol Reprod Dev. 55:125-35.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 245:1066-73.

Ritzka M, Weinel C, Stanke F, Tümmler B (2003): Sequence comparison of the whole murine and human CLCA locus reveals conserved synteny between both species. Genome Lett. 2:149-154.

Ritzka M, Stanke F, Jansen S, Gruber AD, Pusch L, Woelfl S, Veeze HJ, Halley DJ, Tummler B (2004): The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. Hum Genet. 115:483-91.

Robbins PW, Trimble RB, Wirth DF, Hering C, Maley F, Maley GF, Das R, Gibson BW, Royal N, Biemann K (1984): Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. J Biol Chem. 259:7577-83.

Robinson NE (2001): International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. Equine Vet J. 33:5-19.

Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo AA, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB Jr, Welsh MJ, Stoltz DA (2010): Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:20571-5.

Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, Samuel M, Stoltz DA, Li Y, Petroff E, Vermeer DW, Kabel AC, Yan Z, Spate L, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Linville ML, Korte SW, Engelhardt JF, Welsh MJ, Prather RS (2008a): Production of CFTR null and ΔF508 heterozygous pigs by AAV-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. J Clin Invest. 118:1571-7.

Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB Jr, McLennan G, Meyerholz DK, Namati E, Ostedgaard LS, Prather RS, Sabater JR, Stoltz DA, Zabner J, Welsh MJ (2008b): The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 295:240-63.

Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ (2008c): Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. Science. 321:1837-41.

Roussa E, Wittschen P, Wolff NA, Torchalski B, Gruber AD, Thevenod F (2010): Cellular distribution and subcellular localization of mCLCA1/2 in murine gastrointestinal epithelia. J Histochem Cytochem. 58:653-68.

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005): Cystic fibrosis. N Engl J Med. 352:1992-2001.

Rowntree RK, Harris A (2003): The phenotypic consequences of CFTR mutations. Ann Hum Genet. 67:471-85.

Schook L, Beattie C, Beever J, Donovan S, Jamison R, Zuckermann F, Niemi S, Rothschild M, Rutherford M, Smith D (2005): Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. Anim Biotechnol. 16:183-90.

Scholte BJ, Davidson DJ, Wilke M, De Jonge HR (2004): Animal models of cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 3:183-90.

Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB (1999): CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol Rev. 79:145-66.

Sehgal A, Presente A, Engelhardt JF (1996): Developmental expression patterns of CFTR in ferret tracheal surface airway and submucosal gland epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. 15:122-31.

Sheppard DN, Welsh MJ (1999): Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Physiol Rev. 9:23-45.

Sive H (2011): 'Model' or 'tool'? New definitions for translational research. Dis Model Mech. 4:137-8.

Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH (1992): An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. Science. 257:1083-8.

Spiro RG, Spiro MJ, Adamany AM (1974): Enzymic assembly of the carbohydrate units of glycoproteins and the role of lipid intermediates. Biochem Soc Symp. 40:37-55.

Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, Rogan MP, Davis GJ, Hanfland RA, Wohlford-Lenane C, Dohrn CL, Bartlett JA, Nelson GA 4th, Chang EH, Taft PJ, Ludwig PS, Estin M, Hornick EE, Launspach JL, Samuel M, Rokhlina T, Karp PH, Ostedgaard LS, Uc A, Starner TD, Horswill AR, Brogden KA, Prather RS, Richter SS, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Welsh MJ (2010): Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. Sci Transl Med. 2:29ra31.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC (1995): CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science. 269:847-50.

Sun QY, Nagai T (2003): Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. J Reprod Dev. 49:347-59.

Sun X, Sui H, Fisher JT, Yan Z, Liu X, Cho HJ, Joo NS, Zhang Y, Zhou W, Yi Y, Kinyon JM, Lei-Butters DC, Griffin MA, Naumann P, Luo M, Ascher J, Wang K, Frana T, Wine JJ,

Meyerholz DK, Engelhardt JF (2010): Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. J Clin Invest. 120:3149-60.

Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F (2009): The pre-clinical animal model in the translational research of interventional cardiology. JACC Cardiovasc Interv. 2:373-83.

Tan S (2008): Membrane proteins and membrane proteomics. Proteomics. 8:3924-32.

Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr (1985): Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. Biochemistry. 24:4665-71.

Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell. 51:503-12.

Turk JR, Henderson KK, Vanvickle GD, Watkins J, Laughlin MH (2005): Arterial endothelial function in a porcine model of early stage atherosclerotic vascular disease. Int J Exp Pathol. 86:335-45.

Turner DJ, Noble PB, Lucas MP, Mitchell HW (2002): Decreased airway narrowing and smooth muscle contraction in hyperresponsive pigs. J Appl Physiol. 93:1296-300.

Tusnády GE, Simon I (2001): The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics.17:849-50.

Van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RHPC, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ (1995): A mouse model for the cystic fibrosis *D*F508 mutation. EMBO J. 14:4403-11.

Vuillaumier S, Kaltenboeck B, Lecointre G, Lehn P, Denamur E (1997): Phylogenetic analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in mammalian species argues for the development of a rabbit model for cystic fibrosis. Mol Biol Evol. 14:372-80.

Walia V, Ding M, Kumar S, Nie D, Premkumar LS, Elble RC (2009): hCLCA2 Is a p53-Inducible Inhibitor of Breast Cancer Cell Proliferation. Cancer Res. 69:6624-32.

Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL (1995): The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. in Cystic fibrosis Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) McGraw–Hill, New York, 7th Ed, 3799-876.

Welsh MJ, Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Prather RS (2009): Development of a porcine model of cystic fibrosis. Trans Am Clin Climatol Assoc. 120:149-62.

Welply JK, Shenbagamurthi P, Lennarz WJ, Naider F (1983): Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides. J Biol Chem. 258:11856-63.

Whittaker CA, Hynes RO (2002): Distribution und evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion und elsewhere. Mol Biol Cell. 13:3369-87.

Williams SH, Sahota V, Palmai-Pallag T, Tebbutt SJ, Walker J, Harris A (2003): Evaluation of gene targeting by homologous recombination in ovine somatic cells. Mol Reprod Dev. 66:115-25.

Winckler J (1970): The application of histological and histochemical techniques to freeze-dried cryostat sections. Histochemie. 24:168-86.

Wine JJ, Glavac D, Hurlock G, Robinson C, Lee M, Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Dean M (1998): Genomic DNA sequence of Rhesus (M. mulatta) cystic fibrosis (CFTR) gene. Mamm Genome. 9:301-5.

Winpenny JP, Marsey LL, Sexton DW (2009): The CLCA gene family: putative therapeutic target for respiratory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets. 8:146-60.

Young FD, Newbigging S, Choi C, Keet M, Kent G, Rozmahel RF (2007): Amelioration of cystic fibrosis intestinal mucous disease in mice by restoration of mCLCA3. Gastroenterology. 133:1928-37.

Zhou Y, Dong Q, Louahed J, Dragwa C, Savio D, Huang M, Weiss C, Tomer Y, McLane MP, Nicolaides NC, and Levitt RC (2001): Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 25:486-91.

Zhou Y, Shapiro M, Dong Q, Louahed J, Weiss C, Wan S, Chen Q, Dragwa C, Savio D, Huang M, Fuller C, Tomer Y, Nicolaides NC, McLane M, Levitt RC (2002): A calcium activated chloride channel blocker inhibits goblet cell metaplasia und mucus overproduction. Novartis Found Symp. 248:150-65.

Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU (1991): Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:9568-72.

Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Originalartikel:

Plog S, Grötzsch T, Klymiuk N, Kobalz U, Gruber AD, Mundhenk L (2012):

„The porcine chloride channel, calcium-activated family member pCLCA4a mirrors lung expression of the human hCLCA4"

Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 60(1): 45-56

Eigenanteil:
Aufbereitung der Proben, *in silico*-Analysen, Klonierung, Sequenzierung des Offenen Leserahmens (ORF), Westernblot-Analysen, Immunopräzipitation, Laser-Mikrodissektion, Expressionsanalysen (PCR, Immunhistochemie), Bestimmung des Glykosylierungsmusters, Evaluierung und Auswertung der Daten

Vortrag:

1.) Plog S, Klymiuk N, Grötzsch T, Gruber AD, Mundhenk L (2011):

„Modulatoren der Mukoviszidose im Schweinemodell: Welche Rolle spielen allelische Variationen von pCLCA4a und pCLCA4b?"

54. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fulda

2.) Plog S, Klymiuk N, Grötzsch T, Gruber AD, Mundhenk L (2011):

„The porcine pCLCA4a and pCLCA4b as putative modulators in CF: Relevance of genomic variations."

6. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences"

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., für die Bereitstellung des interessanten Themas und für seine uneingeschränkte und kompetente Betreuung.

Herrn Dr. Lars Mundhenk danke ich sehr für seine immer zielgerichtete Betreuung, seine konstruktiven Ratschläge und seine humorvolle Motivation während der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Stephanie Plog, die mich in das Laborleben eingeführt hat. Ich danke dir für deine uneingeschränkte Betreuung und dein unermüdliches Mutmachen.

Frau Ursula Kobalz danke ich dafür, dass sie ihre wertvollen Laborerfahrungen mit mir geteilt hat und mich im richtigen Moment aufgemuntert hat.

Bei Frau Michaela Dauer und Frau Monika Schaerig bedanke ich mich für kompetente technische Unterstützung.

Bei meinen Mitdoktoranden Kathleen Lange, Anja Meyer, Anne Meyer, Kristina Dietert und Patricia Klose, bedanke ich mich für ganz viel Spaß bei der Arbeit, ein tolles Miteinander und hilfreiche Gespräche in der Mittagspause.

Bei all meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin bedanke ich mich für die nette Atmosphäre und ihr Verständnis.

Meiner Schwester Antje Grötzsch danke ich fürs Korrekturlesen und dafür, dass sie mir immer den Rücken gestärkt hat. Danke, dass du an mich geglaubt hast.

Claudia Leucht und Sarah Wibbeler danke ich für ihre schnelle und unkomplizierte Hilfe beim Korrigieren der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und für die nötige Abwechslung außerhalb des wissenschaftlichen Dunstkreises.

Und ich danke Sven, der mich in Allem unterstützt hat und immer für mich da war.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel:

Expressionsanalyse, zelluläre Lokalisierung und proteinbiochemische Charakterisierung des porzinen CLCA-Homologen pCLCA4a –
Unterschiede zu seinen Orthologen bei Mensch und Maus?

selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Berlin den, 03.05.2012 Tanja Grötzsch