

INHALT

<u>I</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	I
<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	3
2.1	Hintergrund: Biomedizinische Relevanz von Anionenkanälen	3
2.2	Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit (CaCC)	4
2.3	CIC-3 als Kandidat für die CaCC	5
2.4	Die Bestrophin-Familie als Kandidat für die CaCC	5
2.5	Tweety als Kandidat für die CaCC	5
2.6	Die Familie der CLCA-Proteine: Kandidaten für die CaCC?	6
2.7	Biomedizinische Bedeutung	8
2.7.1	CLCA und zystische Fibrose.....	8
2.7.2	CLCA und Asthma.....	9
2.7.3	CLCA und chronisch-obstruktive Bronchiolitis des Pferdes.....	12
2.8	Funktionelle Eigenschaften der CLCA-Proteine	12
2.8.1	CLCA- Proteine und Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit.....	12
2.8.2	CLCA- Proteine als Adhäsionsmoleküle.....	14
2.8.3	CLCA- Proteine und Apoptose.....	15
2.8.4	CLCA- Proteine als mögliche Proteasen.....	16
2.9	CLCA-Proteinstruktur und Prozessierung	16
2.10	Gewebeexpression, zelluläre und subzelluläre Lokalisation von CLCA-Proteinen	22

3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	26
3.1	Algorithmen und Programme für die Vorhersage von Signalpeptidsequenzen, Transmembrandomänen und Glykosylierungsstellen	26
3.2	Eingesetzte Plasmide	27
3.3	Klonierung des Offenen Leserahmens von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1	28
3.4	Säugetierzellen und Zellkulturbedingungen	36
3.5	Transiente Transfektion von Säugetierzellen	37
3.6	Radioaktive Markierung von Proteinen	38
3.7	Gewinnung des Proteins aus Zellkulturüberstand und Zelllysate	39
3.7.1	Zelllyse und Gewinnung des Proteins mittels Immunpräzipitation	39
3.7.2	Gewinnung des Proteins mittels Ethanolpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand	40
3.8	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.9	Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten, radioaktiv markierten Proteine	42
3.10	Westernblotanalyse	43
3.11	Bestimmung der Glykosylierungsmuster	45
3.12	Immunfluoreszenz	46
3.13	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	47
3.14	Allgemein verwendete Puffer	48
3.15	Allgemein verwendete Chemikalien und ihre Quellen	48

<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	50
4.1	Computergestützte Sequenzanalyse zur Vorhersage der Proteinstrukturen	50
4.1.1	Bestimmung von potentiellen Signalpeptidsequenzen	50
4.1.2	Bestimmung von potentiellen Transmembrandomänen	50
4.1.3	Bestimmung von potentiellen Glykosylierungsstellen	53
4.2	Proteinbiochemische Analysen der Proteinprozessierung in lebenden Zellen	54
4.2.1	mCLCA3-Protein: amino-terminale Detektion	55
4.2.2	Westernblotanalyse der radioaktiv markierten Banden des mCLCA3-Proteins	56
4.2.3	mCLCA3-YFP-Fusionsprotein: carboxy-terminale Detektion	57
4.2.4	Westernblotanalyse der radioaktiv markierten Banden des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins	59
4.3	Intrazelluläre Lokalisierung des mCLCA3-Proteins mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie	62
4.3.1	Lokalisierung von mCLCA3 in der Zelle	62
4.3.2	Ko-Lokalisierungsstudie von mCLCA3 mit Kompartimentmarkern	63
4.4	Bestimmung des Glykosylierungsmusters	65
4.4.1	Glykosylierungsmuster der mCLCA3- und eCLCA1-Proteine	65
4.4.2	Glykosylierungsmuster des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins	68
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	71
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	85
<u>7</u>	<u>SUMMARY</u>	87
<u>8</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	89
<u>9</u>	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	91
<u>10</u>	<u>LITERATUR</u>	92

<u>11</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	106
<u>12</u>	<u>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</u>	107
<u>13</u>	<u>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u>	109