

INHALTSVERZEICHNIS

1 <u>Einleitung</u>	12
2 <u>Literaturübersicht</u>	14
2.1 Physiologie von Anionenkanälen	14
2.2 Einteilung von Anionenkanälen	15
2.3 Wenig charakterisierte Cl⁻-Kanäle	16
2.3.1 Ca ²⁺ -aktivierbare Cl ⁻ -Ströme.....	16
2.3.2 Der <i>Volume-stimulated Osmolyte and Anion Channel</i> (VSOAC).....	17
2.3.3. Der <i>Outwardly rectifying Chloride Channel</i> (ORCC).....	17
2.4 Molekularbiologisch gut charakterisierte Anionenkanäle sekretorischer Epithelien	18
2.4.1 Spannungsabhängige Cl ⁻ -Kanäle (CLC-Familie).....	18
2.4.2 Der <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (CFTR)....	19
2.5 Die CLCA-Genfamilie	21
2.5.1 Identifizierung einer neuen putativen Cl ⁻ -Kanalfamilie.....	21
2.5.2 Nomenklatur der CLCA-Genfamilie.....	22
2.5.3 Proteinstruktur der CLCA-Genfamilie.....	23
2.5.4 Regulation und Leitfähigkeit der CLCA-Proteine.....	25
2.5.5 Genomische Organisation.....	26
2.5.6 CLCA-Vertreter der Maus.....	27
2.5.7 CLCA-Vertreter des Menschen.....	30
2.5.8 CLCA-Vertreter des Rindes.....	32
2.5.9 CLCA-Vertreter des Schweines.....	33
2.5.10 CLCA-Vertreter des Pferdes.....	33
2.5.11 CLCA-Vertreter der Ratte.....	34
2.6. Pathomechanismen der Zystischen Fibrose beim Menschen	34
2.7 Zystische Fibrose im Mausmodell	36
2.7.1 Generierung und Charakterisierung des <i>cftr</i> ^{TgH(neoim)1Hgu} -Mausmodells....	37
2.7.2 Generierung und Charakterisierung des <i>cftr</i> ^{tm1Cam} -Mausmodells.....	39

2.8 Alternative Cl⁻-Leitfähigkeiten im Komplex der Zystischen Fibrose.....	40
2.8.1 Der ClC-2-Kanal als alternativer Cl ⁻ -Kanal.....	41
2.8.2 Ca ²⁺ -aktivierbare Cl ⁻ -Kanäle als alternative Cl ⁻ -Kanäle der Lunge.....	42
2.8.3 Ca ²⁺ -aktivierbare Cl ⁻ -Kanäle als alternative Cl ⁻ -Kanäle des Darmes.....	43
3 <u>Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit</u>.....	46
4 <u>Material und Methoden</u>.....	48
4.1 Versuchsplanung.....	48
4.2 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	49
4.3 Tiere und Untersuchungsmaterial.....	50
4.3.1 Haltung und genetische Überwachung.....	52
4.4 Methoden.....	54
4.4.1 Organentnahme und -konservierung.....	54
4.4.2 RNA-Isolierung.....	55
4.4.3 cDNA-Synthese.....	55
4.4.4 PCR zur Herstellung von Standardverdünnungsreihen.....	57
4.4.5 Präzipitation der PCR-Produkte.....	61
4.4.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	61
4.4.7 Quantitative <i>real time</i> PCR.....	62
4.4.8 Quantifizierung der Genexpression.....	67
4.4.9 Statistik.....	68
4.4.10 Sequenzierungen der mCLCA3-kodierenden cDNA-Sequenzen bei den eingesetzten Mausstämmen.....	68
4.4.11 Histologische Methoden.....	71
4.4.11.1 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	71
4.4.11.2 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	72
4.4.11.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus.....	72
4.4.11.4 Immunhistochemie.....	73
4.4.11.5 Lichtmikroskopische Beurteilung.....	74
4.4.11.6 Statistik.....	75

5 Ergebnisse	76
5.1 Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR	76
5.1.1 Quantifizierung der Expression von mCLCA1 bis -4.....	80
5.1.2 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA1.....	81
5.1.3 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA2.....	82
5.1.4 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA3.....	84
5.1.5 mRNA-Kopienzahlen von mCLCA4.....	86
5.2 Histologische Quantifizierung der Becherzellen	88
5.2.1 Quantifizierung der Becherzellen in den Zotten.....	89
5.2.2 Quantifizierung der Becherzellen in den Krypten.....	91
5.3 Histologische Quantifizierung von mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen	95
5.3.1 Quantifizierung der mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen in den Zotten.....	95
5.3.2 Quantifizierung der mCLCA3-Protein-haltigen Becherzellen in den Krypten.....	96
5.4 Ergebnisse der Darmepithelzellzahlauswertung	101
5.5 Histologische Quantifizierung der apoptotischen Darmepithelzellen	102
5.6 Histologische Quantifizierung der proliferationsaktiven Darmepithelzellen	106
5.7 Ergebnisse der Sequenzierungen der mCLCA3 cDNA-Sequenzen bei den eingesetzten Mausstämmen	109
6 Diskussion	110
7 Zusammenfassung	131
8 Summary	133
9 Literaturverzeichnis	134
10 Anhang	157
10.1 Anhang zum Kapitel Material und Methoden	157
10.1.1 Reagenzien für die Gewebeentnahme, Gefrier- und Formalinfixierung...	157
10.1.2 Reagenzien und Kits für die molekularbiologischen Arbeiten.....	157
10.1.3 Geräte für die molekularbiologischen Arbeiten.....	158
10.1.4 Verbrauchsmaterialien für die molekularbiologischen Arbeiten.....	159

10.1.5	Geräte für die Herstellung von Paraffinschnitten.....	160
10.1.6	Verbrauchsmaterialien für die Herstellung von Paraffinschnitten.....	161
10.1.7	Reagenzien für die Immunhistochemie.....	161
10.1.8	Geräte für die Immunhistochemie.....	162
10.1.9	Färbelösungen.....	163
10.1.10	Pufferlösungen.....	163
10.2	Anhang der RT-qPCR-Messdaten (Rohdaten).....	165
10.3	Anhang der immunhistochemischen und PAS-Auswertungen sowie der Zellzahl der Krypt-Villus-Achse.....	181