

1 Einleitung

Die murinen Ca^{2+} (Calcium)-aktivierten Cl^- (Chlorid)-Kanäle (mCLCA) 1 bis -4 sind Mitglieder der Anfang der neunziger Jahre entdeckten CLCA-Genfamilie bei der Maus. Es handelt sich bei dieser Familie um eine funktionell und strukturell komplexe Gruppe von mutmaßlichen Transmembranproteinen. Bislang wurden 15 Vertreter dieser Familie in unterschiedlichen Spezies identifiziert, zuletzt eCLCA1, der erste equine CLCA-Vertreter, durch unsere Arbeitsgruppe. Die CLCA-Genfamilie kommt in zahlreichen Geweben, insbesondere in sekretorischen Epithelien vor, in denen sie vermutlich an Ca^{2+} -aktivierbaren Sekretionsmechanismen beteiligt ist. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass einzelne Vertreter dieser Genfamilie zu dem komplexen Krankheitsbild der Zystischen Fibrose (englisch *Cystic Fibrosis*, CF, Mukoviszidose) beitragen könnten. Die CF des Menschen ist die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die bei homozygot betroffenen Individuen tödlich endet. Der Defekt ist dabei im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (*cftr*)-Gen, das für einen Cl^- -Kanal kodiert, lokalisiert. Obwohl bekannt ist, dass es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit handelt, besteht keine enge Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp von CF-Patienten, woraus geschlossen wird, dass andere genetische Faktoren (Modulatoren) den klinischen Verlauf beeinflussen. Zu den potentiellen Modulatoren zählen unter anderem bestimmte epitheliale Cl^- -Kanäle, von denen man annimmt, dass sie eine alternative Cl^- -Leitfähigkeit in den betroffenen Epithelien übernehmen könnten. Elektrophysiologische Untersuchungen, mRNA-Expressionsdaten und Allelstudien deuten darauf hin, dass ein Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanal in CF-Epithelien die gestörte Cl^- -Sekretion teilweise kompensieren kann und damit als modifizierendes Gen in diesem Krankheitskomplex in Frage kommen könnte.

Für die Erforschung der CF-Pathogenese stehen Mausmodelle zur Verfügung, in denen das *cftr*-Gen auf unterschiedliche Weise verändert oder ausgeschaltet wurde. Im Gegensatz zu CF-Patienten weisen diese Mausmodelle alle letale obstruktive Darmveränderungen auf, die beim Menschen in dieser schweren Form nur bei etwa 10% der Patienten beobachtet werden. Die humane CF dagegen ist durch eine schwerwiegende obstruktive Lungenentzündung gekennzeichnet, die im Mausmodell extrem selten vorkommt. Darüber hinaus ist neben diesem Interspezies-Unterschied zwischen Maus und Mensch bekannt, dass der genetische

Hintergrund des jeweils eingesetzten Mausstammes einen entscheidenden Einfluss auf den Phänotyp nimmt. Sowohl der beobachtete Interspezies-Unterschied als auch die Stammesvariabilität ist offensichtlich mit dem Ausprägungsgrad einer Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Leitfähigkeit korreliert, deren molekulare Basis bislang unbekannt ist. Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis zellulärer und molekularer Grundlagen bei der CF beitragen und insbesondere die mögliche Rolle von CLCA-Kanälen als „alternative“ Cl^- -Kanäle untersuchen. Die Arbeitshypothese dieser Arbeit lautete, dass mCLCA-Homologe im Darm von Zystische Fibrose-Mäusen als Vermittler einer alternativen Cl^- -Leitfähigkeit fungieren könnten und im Zuge dieser Funktion eine signifikante Heraufregulation von mRNA- und Proteinexpression bei CF-Mäusen zu detektieren wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Expressionen von mCLCA1, mCLCA2, mCLCA3 und mCLCA4 mittels quantitativer RT-PCR im Dünndarm von vier verschiedenen Mausstämmen (BALB/cJ, DBA/2J, C57BL/6J, NMRI) ermittelt und zwar jeweils in einer CF- und einer Wildtyp (WT) -Mausgruppe. Während bei drei der ausgewählten Stämme (BALB/cJ, DBA/2J, C57BL/6J) die CF-Mutation $\text{cfr}^{\text{TgH(neoim)1Hgu}}$ untersucht wurde, trug die CF-Gruppe des vierten Mausstammes (NMRI) die CF-Mutation $\text{cfr}^{\text{tm1Cam}}$, die durch einen letalen Phänotyp gekennzeichnet ist. Zusätzlich wurden mit immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von mCLCA3-Protein, phosphoryliertem Histon3 und aktivierter Caspase3 sowie der *Periodic Acid Schiff*-Reaktion (PAS-Reaktion) anteilige Veränderungen dieser Zellfraktionen sowie Veränderungen der Proliferationskinetik der Epithelzellen im Dünndarm dieser Tiere erfasst. Auf diese Weise konnten die mRNA-Expressionsdaten anhand der Häufigkeit des für die jeweiligen Homologen stehenden Zelltypen (Becherzellen=mCLCA3 exprimierend, Enterozyten=mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4 exprimierend) relativiert werden und eine mRNA-Hochregulation pro Einzelzelle von einer mRNA-Hochregulation aufgrund der Zunahme einer Zellfraktion unterschieden werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden CLCA-Mitglieder mCLCA2 und mCLCA3 tatsächlich in CF-Mausmodellen differentiell reguliert werden, während dies für mCLCA1 und mCLCA4 nicht beobachtet werden konnte.