

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Physiologie von Anionenkanälen

Die meisten Anionenkanäle werden als Cl<sup>-</sup>-Kanäle bezeichnet, weil Cl<sup>-</sup> das am weitesten verbreitete Anion ist, obwohl sie auch für andere Anionen gleichermaßen permeabel sind. Die physiologischen Funktionen von Cl<sup>-</sup>-Kanälen bestehen im wesentlichen in der Volumen- und pH-Regulation, im transepithelialen Transport von Ionen und Wasser, in der Regulation der Zellerregbarkeit und in der Neutralisierung von Kationengradienten in intrazellulären Kompartimenten.

Cl<sup>-</sup> ist das häufigste und mit geringstem energetischen Aufwand transportierte extrazelluläre Anion und ist deswegen leicht recycelbar. Es ist in vielen sekundär-aktiven pH-regulierenden Transportern wie dem Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (Natrium-Bikarbonat/Proton-Chlorid)-Austauscher oder des Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter der Gegenspieler zu dem zu transportierenden Ion und wird hier einfach mit seinem elektrochemischen Gradienten transportiert (JENTSCH et al. 2002).

Volumenregulation ist eine essentielle Fähigkeit nicht nur für Zellen, die sich einer ständig variierenden extrazellulären Osmolarität anpassen müssen, wie Nieren- und Darmepithelien, sondern stellt bereits eine Voraussetzung für die reguläre Zellteilung dar. Bei hypotonem Außenmilieu werden Volumen-sensitive K<sup>+</sup> (Kalium) - und Cl<sup>-</sup>-Kanäle aktiviert, durch die eine schnelle osmotische Anpassung durch einen Ausstrom von K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen erfolgen kann (JENTSCH u. GÜNTHER 1997).

Der transepitheliale Transport von Cl<sup>-</sup>-Ionen erfolgt in den meisten Epithelien sekundär-aktiv oder passiv parazellulär und wird vor allem durch den von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufrechterhaltenen Kationengradienten angetrieben. Meist ist ein intrazellulärer Überschuss an Cl<sup>-</sup>-Ionen über dem Äquilibriumpotenzial der Zelle vorhanden, angehäuft von primär-aktiven Transportsystemen wie dem Na<sup>+</sup>-K/Cl<sup>-</sup>-Kotransport.

Durch selektive Expression von Kanälen in basolateralen und apikalen Zellmembranen wird Cl<sup>-</sup> entweder absorbiert oder sezerniert. So wird beispielsweise im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife der Niere durch den apikalen Na<sup>+</sup>-K/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter Cl<sup>-</sup> absorbiert und nach basolateral durch Vertreter der ClC-Kanalfamilie (siehe Kapitel 2.2.2) wieder ausgeschleust. Im Dünndarm- und respiratorischen Epithel ist die Transportrichtung umgekehrt,

wobei die apikale  $\text{Cl}^-$ -Sekretion passiv oder durch cAMP stimulierte CFTR-Kanäle erfolgt (JENTSCH et al. 2002).

Die Hauptfunktion von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen in Membranen intrazellulärer Kompartimente ist die Herstellung eines Ladungsausgleiches für  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -ATPasen. Die  $\text{H}^+$ -ATPase sorgt in Golgi-Lamellen, Endo- und Lysosomen sowie in synaptischen Vesikeln für einen gegenüber dem Plasma-Milieu sauren pH, der für die intravesikuläre Enzymfunktion und für das Abdiffundieren rezeptorgebundener Liganden von Bedeutung ist.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen treten beispielsweise am sarkoplasmatischen Retikulum auf und sorgen für ein Auffüllen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher nach einer stattgefundenen Muskelkontraktion. Durch gleichzeitigen Transport von  $\text{Cl}^-$  kann die Azidifizierung dieser Zellkompartimente elektroneutral und damit effektiver erfolgen (JENTSCH et al. 2002).

## 2.2 Einteilung von Anionenkanälen

Es existieren drei große Gruppen molekularbiologisch gut charakterisierter Anionenkanäle. Dazu zählen die  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) - und Glycin-aktivierten Anionenkanäle des zentralen Nervensystems (ZNS), die Familie der spannungsabhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (ClC-Kanalfamilie) und der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) -Kanal (JENTSCH et al. 2002). Die Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (ClCA-Kanäle) ist eine Anfang der neunziger Jahre entdeckte Anionenkanalfamilie mit ständig wachsender Zahl an in unterschiedlichen Säugetierspezies identifizierten Vertretern. Bisher konnte für die meisten Vertreter eine zellauswärts gerichtete  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in Patch-Clamp-Versuchen gezeigt werden und auch die vorgeschlagene Transmembrantopologie machten eine Kanalfunktion vorstellbar. Jedoch fehlen bisher eindeutige Daten, die die CLCA-Proteine als Kanäle identifizieren und eine Rolle als regulatorische Proteine anderer Kanäle wird ebenfalls diskutiert (GRUBER et al. 2002; LOEWEN et al. 2004). Des Weiteren existieren eine Reihe weniger gut charakterisierter, putativer Anionenkanäle wie der *Outwardly rectifying Osmolyte and Anion Channel* (ORCC), der *Volume stimulated Osmolyte and Anion Channel* (VSOAC), eine in diversen Zelltypen detektierte  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit (CACC) und die kürzlich entdeckte Familie der Bestrophine.

## 2.3 Wenig charakterisierte Cl<sup>-</sup>-Kanäle

### 2.3.1 Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Ströme (CaCCs)

Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Ströme sind elektrophysiologisch in zahlreichen verschiedenen Zelltypen charakterisiert worden. Die in nicht-erregbaren Zellen vorkommenden Vertreter lassen sich aufgrund ihrer Leitfähigkeit in drei Gruppen einteilen: Ströme mit geringer Leitfähigkeit von ein bis drei pS wie z.B. in *Xenopus*-Oozyten vorkommend (TAKAHASHI et al. 1987), Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit von acht bis 15 pS wie in Endothelien (NILIUS et al. 1997), Hepatozyten (KOUMI et al. 1994) und Gallenepithelien (SCHLENKER u. FITZ 1996) beschrieben und Kanäle mit hohen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten von 40-50 pS, wie sie in Lymphozyten gefunden worden sind (NISHIMOTO et al. 1991). Sie alle weisen ähnliche Eigenschaften auf, nämlich eine zeitverzögerte Aktivierung, eine I<sup>-</sup> (Iodid) > Cl<sup>-</sup>-Selektivität, die Generierung auswärtsgerichteter Cl<sup>-</sup>-Ströme und die Hemmbarkeit durch 4,4'-Diisothiocyanatodihydrostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS), 5-Nitro-2-3-Phenylpropylamino-Benzoesäure (NPPB) und Nifluminsäure (NFA). Kürzlich wurde eine weitere Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Kanalfamilie entdeckt, die Bestrophine, die als Produkt des Vitelliformen Maculadystrophie-Gens (VMD-Gen) identifiziert wurden (MARQUARDT et al. 1998; PETRUKHIN et al. 1998). Die VMD des Menschen, auch Morbus Best genannt, ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des retinalen Pigmentepithels, die mit Verlust der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im Pigmentepithel der Retina und zunehmendem Sehverlust einhergeht. Bestrophine sind in unterschiedlichen Spezies hochkonserviert, sowohl bei Säugern als auch bei Invertebraten (zusammengefasst von STRAUSS u. ROSENTHAL 2004). Beim Menschen sind die Bestrophine -1 bis -4 in der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels exprimiert (MARMORSTEIN et al. 2000), Bestrophin -2, -3 und -4 außerdem in Kolon und Skelettmuskel (STOHR et al. 2002) und Bestrophin -1 in der basolateralen Membran von respiratorischen Epithelzellen (DUTA et al. 2004). In Expressionsstudien in einer vom Menschen stammenden embryonalen Nierenzellkulturlinie verhielten sich die Bestrophine von Mensch, Fruchtfliege und Fadenwurm als Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Kanäle (SUN et al. 2002). Ob Bestrophine eigenständige kanalformende Proteine sind oder ob sie andere Kanäle modulieren, ist bisher nicht geklärt, da noch keine Einzelkanalstudien vorliegen. Die bisherigen Daten zur Proteinstruktur weisen auf

ein Multitransmembranprotein hin, das einen Kanal aus mehreren Untereinheiten bildet (SUN et al. 2002; TSUNENARI et al. 2003; QU et al. 2003). In transfizierten Zellen weist der Kanal eine  $I^- > Br^-$  (Bromid)  $> Cl^-$ -Selektivität auf, die Leitfähigkeit wird durch DIDS und Amino-Ethylmethan-Thiosulfonat (MTSEA) inhibiert (SUN et al. 2002; QU et al. 2003).

### 2.3.2 Der *Volume-stimulated Osmolyte and Anion Channel* (VSOAC)

Der VSOAC ist an einer Vielzahl von wichtigen Funktionen der Zellphysiologie beteiligt wie der Anpassung an Osmolaritätsänderungen im Extrazellularraum, Wachstum, Zellteilung und Apoptose. Je nach Zellsystem sind Einzelkanalleitfähigkeiten von 15-90 pS gemessen worden mit einer Ionenselektivität von  $I^- > Br^- > Cl^-$  (zusammengefasst von JENTSCH et al. 2002; D'ANGLEMENT DE TASSIGNY et al. 2003). Als mögliche molekulare Kandidaten wurden bisher verschiedene Vertreter von  $Cl^-$ -Kanälen diskutiert wie das P-Glycoprotein (VALVERDE et al. 1992), CIC-2 (FURUKAWA et al. 1998), CIC-3 (DUAN et al. 1997), das pICln-Protein (KRAPIVINSKY et al. 1994) und das Phospholemman (MOORMANN et al. 1992).

### 2.3.3 Der *Outwardly rectifying Chloride Channel* (ORCC)

Der ORCC ist vor der Identifizierung des CFTR-Kanals für als mit diesem identisch gehalten worden. Mittlerweile ist bekannt, dass CFTR selbst ein Kanalprotein ist, dass an der Regulation des ORCC über eine cAMP-abhängige Proteinkinase A beteiligt ist (GABRIEL et al. 1993). Dass sich in polarisierten Epithelzellen zwei unterschiedliche  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten stimulieren lassen, wurde schon von CLIFF u. FRIZELL (1990) beobachtet. Die eine ließ sich durch cAMP aktivieren, mit einer Leitfähigkeit von 10 pS und einer Ionenselektivität von  $Br^- > Cl^- > I^-$ , und wurde als dem CFTR-Kanal zugehörig identifiziert (GREGORY et al. 1990). Die andere war durch ATP aktivierbar, zeigte eine Leitfähigkeit von 30-50 pS und eine Ionenselektivität von  $I^- > Br^- > Cl^-$  und wurde dem ORCC zugeordnet (GABRIEL et al. 1993), dessen molekulare Identität bis heute nicht bekannt ist. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Inhibition von ORCC durch DIDS, wohingegen CFTR insensitiv gegenüber

diesem Blocker ist (SCHWIEBERT et al. 1994). Wie bereits erwähnt, wird der ORCC durch den CFTR-Kanal reguliert, wobei extrazelluläres ATP eine Rolle spielt (SCHWIEBERT et al. 1995; REDDY et al. 1996; BRAUNSTEIN et al. 2001).

## **2.4 Molekularbiologisch gut charakterisierte Anionenkanäle sekretorischer Epithelien**

Die im Folgenden vorgestellten Anionenkanäle kommen vorrangig, allerdings nicht ausschließlich, in sekretorischen Epithelien vor. So sind sowohl der CFTR-Kanal als auch bestimmte Vertreter der ClC-Kanalfamilie (zusammengefasst von Bradbury 1999) in intrazellulären Kompartimenten zu finden (zusammengefasst von JENTSCH et al. 1999; JENTSCH et al. 2002).

### **2.4.1 Spannungsabhängige Cl<sup>-</sup> Kanäle (ClC-Familie)**

Der erste klonierte Vertreter dieser Familie, ClC-0, stammt aus dem elektrischen Organ des Rochens *Torpedo marmorata* (JENTSCH et al. 1990). Er ist der am besten untersuchte Cl<sup>-</sup> Kanal unter den ClC-Vertretern, von denen inzwischen neun Kanäle allein bei Säugetieren bekannt sind. Sieben dieser Vertreter wurden bereits in einem entsprechenden Knockout-Mausmodell untersucht. ClC-Kanäle sind spannungsabhängige Kanäle, jedoch spielen auch pH-Wert und extrazelluläre Anionenkonzentration bei der Aktivierung eine Rolle (CHEN u. MILLER 1996). Durch die bekannt gewordene Analyse der Kristallstruktur eines Bakterien-ClC-Kanals mittels hochauflösender Röntgenstrahlen (DUTZLER et al. 2002) konnte das schon viele Jahre zuvor vermutete Zwei-Kanal-Modell bestätigt werden (MILLER 1982). Die beiden Kanalporen werden von je einer Untereinheit gebildet und besitzen Sanduhrform. Aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen wird vermutet, dass die Öffnung beider Kanalporen unabhängig voneinander erfolgt, während ein langsamerer Inaktivierungsmechanismus immer beide Poren gleichzeitig schließt (MILLER 1982; LUDEWIG et al. 1996).

Die meisten ClC-Kanäle besitzen eine  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ -Leitfähigkeit. Die bei den Säugetieren vorkommenden Kanäle lassen sich nach ihrer zellulären Verteilung grob in zwei Gruppen einteilen, wovon die eine in der äußeren Plasmamembran lokalisiert ist, während die zweite Gruppe in der Membran intrazellulärer Organellen vorkommt. Hinsichtlich der gewebespezifischen Verteilung sind einige Vertreter eher ubiquitär anzutreffen, während andere nur in bestimmten Geweben vorkommen (zusammengefasst von JENTSCH et al. 2002).

#### 2.4.2 Der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)

Der CFTR-Kanal ist ein integrales Membranprotein mit einer Länge von 1480 Aminosäuren (ROMMENS et al. 1989; CHANG et al. 1994), das an der apikalen Membran zahlreicher sekretorischer Epithelien exprimiert wird (ROMMENS et al. 1989; CRAWFORD et al. 1991). Defekte im *cftr*-Gen sind für die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung des Menschen verantwortlich, die Zystische Fibrose (CF). Die Identifizierung des defekten *cftr*-Genes bei CF-Patienten auf Chromosom 7 und die Beobachtung, dass die Erkrankung durch eine reduzierte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion exkretorischer Epithelien charakterisiert war, ließ vermuten, dass es sich bei dem Protein um einen  $\text{Cl}^-$ -Kanal oder einen  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Aktivatoren handeln könnte (RIORDAN et al. 1989). Erst die Expression von rekombinantem, aufgereinigtem CFTR-Protein in Doppellipidmembranen erbrachte den Beweis, dass das Protein selbst einen  $\text{Cl}^-$ -Kanal formt (BEAR et al. 1992).

Das Protein besitzt zwölf Transmembrandomänen, von denen jeweils sechs als Tandem-Wiederholungssequenz angeordnet sind. Zu jeder Tandemsequenz gehört eine intrazelluläre Nukleotid-bindende Domäne (NBF-Domäne). Die beiden Tandemsequenzen werden über eine intrazelluläre regulatorische Domäne (R-Domäne), die multiple Phosphorylierungssequenzen enthält, verbunden. Die extrazelluläre Schleife zwischen Transmembrandomäne 7 und 8 beinhaltet zwei Glykosylierungsstellen (CHANG et al. 1994; AKABAS 2000). Strukturanalysen mittels *freeze-fracture* Elektronenmikroskopie deuten darauf hin, dass das Kanalprotein als Dimer vorliegt (ESKANDARI et al. 1998). Dies konnte jedoch anhand neuerer elektronenmikroskopischer Untersuchungen des kristallisierten Proteins nicht bestätigt werden (ROSENBERG et al. 2004). Der Kanal besitzt eine Leitfähigkeit von 6-10

pS mit einer  $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ -Präferenz, die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert wird (BEAR et al. 1991; BERGER et al. 1991). Der CFTR-Kanal ist sensitiv gegenüber dem Anionenkanalblocker Diphenylamin-2-Carboxylsäure (DPC) und Sulfonylharnstoffderivaten wie Glibenclamid (SHEPPARD u. ROBINSON 1997), jedoch insensitive gegenüber DIDS (CLIFF et al. 1992), was ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung gegenüber der CLCA-Genfamilie ist.

Der CFTR-Kanal wurde in zahlreichen  $\text{Cl}^-$ -sezernierenden Epithelien, zum Beispiel den Enterozyten und Becherzellen des Darmes, lokalisiert (CRAWFORD et al. 1991; HOOGEVEN et al. 1991), in den proximalen und distalen Nierentubuli (CRAWFORD et al. 1991), den Pankreas- und Speicheldrüsengängen, den Tubuli seminiferi sowie in den Epithelien der Bronchien und Bronchiolen (TREZISE u. BUCHWALD 1991), in den submukosalen Drüsen der Trachea und großen Bronchien (ENGELHARDT et al. 1992) und den Epithelzellen der kleinen Luftwege bis in die Alveolen (ENGELHARDT et al. 1993). Dabei wurde im Gastrointestinaltrakt eine Abnahme der CFTR-Proteinexpression in der Richtung von proximal nach distal und von der Epithelkrypte zur Zottenspitze hin beobachtet (TREZISE u. BUCHWALD 1991), was mit seiner  $\text{Cl}^-$ -sezernierenden Funktion im Einklang steht.

Für die Aktivierung des Kanals spielt vor allem die Phosphorylierung der Serin-Konsensussequenzen an der R-Domäne durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A eine Rolle (ANDERSON et al. 1991; RICH et al. 1993), sowie die Bindung von Nukleotiden an beide Nukleotid-bindenden-Domänen (BERGER et al. 2005). An der Inhibition des CFTR-Kanals sind Dephosphorylasen und sogenannte *Soluble n-Methylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor*-Proteine (SNARE-Proteine) beteiligt, die direkt an das aminoterminele Ende des CFTR-Kanals binden (CORMET-BOYAKA et al. 2002).

Der CFTR-Kanal übernimmt außerdem eine regulatorische Funktion bei anderen epithelialen Kanälen wie bestimmten  $\text{Na}^+$ -Kanälen (BOUCHER et al. 1986; STUTTS et al. 1995; REDDY et al. 1999), beim *Outwardly rectifying Chloride Channel* (GABRIEL et al. 1993; SCHWIEBERT et al. 1995), sowie bei renalen (MC NICHOLAS et al. 1996) und ubiquitär vorkommenden  $\text{K}^+$ -Kanälen (ISHIDA-TAKAHASHI et al. 1998).

Weiterhin ist der CFTR-Kanal als intrazellulärer  $\text{Cl}^-$ -Kanal an der Azidifizierung von Prälysosomen und des Trans-Golgi-Netzwerkes beteiligt (BARASCH et al. 1991) und es wird eine

regulatorische Funktion des CFTR-Kanals bei der Endo- und Exozytose von Proteinen vermutet (BRADBURY et al. 1994; BRADBURY 1999).

## 2.5 Die CLCA-Genfamilie

### 2.5.1 Identifizierung einer neuen putativen Cl<sup>-</sup>-Kanalfamilie

Anfang der neunziger Jahre wurden unabhängig voneinander in zwei Laboratorien die ersten beiden Vertreter der CLCA-Genfamilie (*Chloride Channels, Calcium activated*) auf Proteinebene aus bovinem Tracheal- (RAN u. BENOS 1992) und Lungengewebe (ZHU u. PAULI 1991) isoliert. Das von erstgenannter Arbeitsgruppe isolierte 38-kD bCaCC1-Protein, später benannt als bCLCA1, zeigte eine DIDS-sensitive Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit, wenn es in Liposomen integriert wurde. Das Ziel der zweitgenannten Arbeitsgruppe war es, mittels eines monoklonalen Antikörpers (6D3) aus einer bovinen, auf Lungenmatrix kultivierten Aortenendothelzelllinie ein für Lungenendothelien spezifisches Adhäsionsmolekül zu finden, das die Adhärenz von Melanommetastasen vermittelt. Deshalb wurde das isolierte 90-kD-Protein nach seiner Funktion als Adhäsionsmolekül *Lung-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (Lu-ECAM-1) genannt. Die Zugehörigkeit der beiden Proteine zu einer Familie wurde erst nach der Identifizierung der cDNA-Sequenzen für bCLCA1 (CUNNINGHAM et al. 1995) und Lu-ECAM-1 (ELBLE et al. 1997) entdeckt, die eine Übereinstimmung von 92% zeigten. Seitdem sind vier humane CLCA-Homologe (GRUBER et al. 1998a; AGNEL et al. 1999; GRUBER et al. 1999; GRUBER u. PAULI 1999b), sechs murine CLCA-Vertreter (GANDHI et al. 1998; LEE et al. 1999; KOMIYA et al. 1999; ELBLE et al. 2002; EVANS et al. 2004), ein porciner (GASPAR et al. 2000), ein equiner (ANTON et al. 2005) und ein Vertreter der Ratte (JEONG et al. 2005) identifiziert worden, die zum Teil biochemisch, zum Teil durch Durchmusterung von cDNA-Banken der respektiven Spezies mit der Sequenz eines bekannten CLCA-Homologen gefunden wurden.

### 2.5.2 Nomenklatur der CLCA-Genfamilie

Da an der Identifizierung der CLCA-Genfamilie mehrere Laboratorien beteiligt waren und die ersten Vertreter mit sehr unterschiedlichen Funktionen assoziiert schienen, entstand eine uneinheitliche Nomenklatur, beginnend mit der Benennung von Lu-ECAM-1 und bCACC-1. Die zeitgleiche Klonierung der humanen CLCA-Homologe durch zwei verschiedene Laboratorien (GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999; GRUBER u. PAULI 1999b) gegenüber (AGNEL et al. 1999) führte sogar zu unterschiedlichen Benennungen identischer CLCA-Vertreter. Da die Bezeichnung CLCA vom *Human Genome Nomenclature Committee* offiziell anerkannt wurde und genetische Symbole, die mit „Ca“ beginnen, ausschließlich für Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vorgesehen wurden, sind auch die klonierten Vertreter anderer Spezies mit der offiziellen Bezeichnung CLCA zu benennen. Dabei steht ein vorangestellter Buchstabe für die Speziesbezeichnung und eine nachfolgende arabische Zahl für die Klonierungschronologie. In der Tabelle 1 sind die bisher bekannten klonierten Vertreter der CLCA-Genfamilie mit ursprünglicher und systematisch korrigierter Nomenklatur aufgeführt.

Tabelle1: Nomenklatur der CLCA-Genfamilie

<b>Originalbezeichnung</b>	<b>Systematische Nomenklatur</b>	<b>Referenz</b>	<b>Genbank-Nummer</b>
CaCC	bCLCA1	CUNNINGHAM et al. 1995	U_36455
Lu-ECAM-1	bCLCA2	ELBLE et al. 1997	AF_001261, AF_001264
mCACC	mCLCA1	GANDHI et al. 1998, ROMIO et al. 1999	AF_047838
mCLCA2	mCLCA2	LEE et al. 1999	AF_108501
gob-5	mCLCA3	KOMIYA et al. 1999	AB_017156
mCLCA4	mCLCA4	ELBLE et al. 2002	AY_008277
mCLCA5	mCLCA5	EVANS et al. 2004	AK_028704
	mCLCA6	EVANS et al. 2004	AY_560902
hCACC-1	hCLCA1	GRUBER et al. 1998a, AGNEL et al. 1999	AF_039400, AF_039401, AF_127035
hCACC-2	hCLCA2	GRUBER et al. 1999, AGNEL et al. 1999	AF_043977, AF_127980
hCLCA3	hCLCA3	GRUBER u. PAULI 1999b	AF_043976
hCaCC-2	hCLCA4	AGNEL et al. 1999	AF_127035
pCLCA1	pCLCA1	GASPAR et al. 2000	AF_095584
rbCLCA1	rbCLCA1	JEONG et al. 2005	AB_212889
eCLCA1	eCLCA1	ANTON et al. 2005	AY_524856

### 2.5.3 Proteinstruktur der CLCA-Genfamilie

Die CLCA-Vertreter der unterschiedlichen Spezies weisen eine hochkonservierte Struktur auf (zusammengefasst von GRUBER et al. 2002). So umfasst der offene Leserahmen (ORF) eine

Länge von ungefähr drei kbp und kodiert eine Sequenz von 902 bis 943 Aminosäuren (AS) eines mutmaßlich membranständigen Proteins. Ausnahmen hierzu sind das offenbar sezernierte, einem aminoterminalen Trunkat von 262 AS entsprechende hCLCA3-Protein (GRUBER u. PAULI 1999b) sowie der Lu-ECAM-1-Klon 4 mit einer Länge von 320 AS (ELBLE et al. 1997). Vor allem hCLCA1 und hCLCA2 wurden hinsichtlich ihrer Transmembrantopologie mit Hilfe verschiedener Myc-Tag-cDNA-Konstrukte, Oberflächenbiotinylierung von Zellkulturen, Protease-Protektions-Versuchen und Glykosylierungs-*Knockout*-Konstrukten untersucht (GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999), wobei Voraussagen aus computer-gestützten Hydrophobizitätsanalysen bestätigt werden konnten. Für die meisten Vertreter wurde ein Modell mit vier Transmembrandomänen, für hCLCA2 ein Domänenmodell mit fünf Durchkreuzungen der Plasmamembran und einem intrazellulären Carboxyterminus, postuliert. Die extrazelluläre, aminoternale Domäne weist eine bei allen Vertretern konservierte symmetrische Erkennungssequenz mit multiplen Cysteinresten auf, die einer Zink-Finger-Struktur ähnelt (C-x12-C-x4-C-x4-C-x12 bzw. bei hCLCA2 C-x9-C-x4-C-x4-C-x9). Es wird vermutet, dass sich hier ausbildende Disulfidbrücken an der Stabilisierung des Kanalproteins beteiligt sind (GRUBER et al. 2002). Vor dieser Multicysteinregion befindet sich eine weitere hochkonservierte Konsensussequenz, die mit Metallionen interagiert, eine weitere Bestätigung, dass sich der Aminoterminus vermutlich extrazellulär befindet. Für den hydrophoben Carboxyterminus wurden intra- und extrazelluläre sowie in der Plasmamembran verlaufende Anordnungen postuliert.

Für die meisten CLCA-Proteine konnte in transfizierten humanen embryonalen Nierenzellkulturen (HEK-Zellkulturen) gezeigt werden, dass aus einem 120-130 kilo Dalton (kD) Vorläufer-Molekül zwei Spaltprodukte entstehen, die sich, je nach Ort der Insertion eines Myc-Epitops, mit einem spezifischen, gegen diese Erkennungssequenz gerichteten Antikörper aufreinigen lassen. So konnte man ein aminoternales 80-90 kD und ein carboxyterminales 30-40 kD großes Spaltprodukt unterscheiden. Nach Zusatz von caninen mikrosomalen Membranen werden in vitro sowohl das Vorläufermolekül als auch die Spaltprodukte glykosyliert (CUNNINGHAM et al. 1995; ELBLE et al. 1997; GANDHI et al. 1998; GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999; GRUBER u. PAULI 1999b; LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002).

Eine unter den endothelialen Vertretern (bCLCA2, mCLCA1, mCLCA5, hCLCA2) konservierte Erkennungssequenz, die sich in der zweiten extrazellulären Domäne des 90 kD-Spaltproduktes befindet, bindet an  $\beta$ 4-Integrin, ein Adhäsionsmolekül, das von malignen Tumoren mit Metastasierungsneigung zur Lunge exprimiert wird (ABDEL-GHANY et al. 2001; ABDEL-GHANY et al. 2002; ABDEL-GHANY et al. 2003).

#### 2.5.4 Regulation und Leitfähigkeit der CLCA-Proteine

Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare, anionenselektive Leitfähigkeit ist für viele CLCA-Vertreter identifiziert worden (zusammengefasst von FULLER et al. 2001). Phosphorylierungssequenzen für die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) und Proteinkinase C (PKC) sind in der ersten intrazellulären Domäne von bCLCA1, bCLCA2, mCLCA1 und mCLCA2 konserviert (CUNNINGHAM et al. 1995; ELBLE et al. 1997; GANDHI et al. 1998; LEE et al. 1999).

Weitere CaMKII- und PKC-Phosphorylierungssequenzen finden sich bei mCLCA3 und mCLCA4 sowie bei pCLCA1 (KOMIYA et al. 1999; GASPAR et al. 2000; ELBLE et al. 2002). Die humanen Vertreter hCLCA1 und -2 besitzen eine Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase A (PKA) und PKC (GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999). Die Phosphorylierung durch PKC und CaMKII entspricht der in *patch clamp*-Versuchen beobachteten Regulation durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ . PKA konnte weder pCLCA1, exprimiert in 3T3-Mausfibroblasten (LOEWEN et al. 2002), noch bCLCA1, inkorporiert in artifizielle Doppel-lipidmembranen (FULLER et al. 1994), aktivieren, was ein wichtiges Unterscheidungskriterium gegenüber dem CFTR und dem ORCC ist.

Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit wurde für die meisten Vertreter in CLCA-transfizierten HEK-Zellen gefunden (GANDHI et al. 1998; GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999; ELBLE et al. 2002; EVANS et al. 2004). Ausnahmen davon sind pCLCA1, mit dessen cDNA eine murine Fibroblastenzelllinie (GASPAR et al. 2000; LOEWEN et al. 2002) und eine Kolonkarzinomzelllinie (LOEWEN et al. 2004) transfiziert wurde. Des Weiteren wurde bCLCA2 in einer Kälber-Lungenendothelzelllinie (NILIUS et al. 1997) untersucht und bCLCA1 in *Xenopus*-Oozyten (CUNNINGHAM et al. 1995) sowie in artifiziellen Zell-

membranen (FULLER et al. 1994). Auch mCLCA1 wurde nach seiner heterologen Transfektion in *Xenopus*-Oozyten untersucht (ROMIO et al. 1999).

FULLER et al. (1994) reinigten bCLCA1 aus zytosolischen Vesikeln des bovinen Trachealepithels auf und inkorporierten diese in eine Doppellipidmembran. Der so aufgereinigte bCLCA1-Kanal wies eine sehr geringe Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) in der Anwesenheit sehr niedriger  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (10 nM) auf, während durch Zugabe von Adenosin-triphosphat (ATP), CaMKII, Calmodulin und Anhebung der  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in den physiologischen Bereich (60 nM - 1  $\mu$ M) eine starke Aktivierung mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 25 pS stattfand. Höhere  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen verringerten die Öffnungswahrscheinlichkeit wieder. Die Ionenselektivität zeigte sich in der Reihenfolge  $I^- > Br^- > Cl^-$  mit einer auswärtsgerichteten Leitfähigkeit unter symmetrischen Ionenverteilungsbedingungen. Dieser Versuch unterstützte die These, dass es sich bei den CLCA-Proteinen selbst um kanalformende Einheiten handeln könnte und sie nicht als Aktivatoren endogener Kanäle funktionieren. Potente Inhibitoren waren in den meisten Studien DIDS und Dithiothreitol (DTT), außer bei pCLCA1 (LOEWEN et al. 2002) sowie NFA, außer bei bCLCA1 (CUNNINGHAM et al. 1995). Ein Inaktivierungsmechanismus  $Ca^{2+}$ -aktivierbarer  $Cl^-$ -Leitfähigkeit, der *in vivo* eine Rolle spielen könnte, wird durch Inositol-3,4,5,6-Tetrakisphosphatase (IP4) vermittelt, ein Metabolit der Phospholipase C-Kaskade, der *in vivo* durch cholinerge und  $\alpha$ -adrenerge Stimulation vermehrt in der Zelle anfällt. Die Hemmbarkeit von bCLCA1, exprimiert in Doppellipidmembranen, durch IP4 konnte in Versuchen von ISMAILOV et al. (1996) gezeigt werden.

### 2.5.5 Genomische Organisation

Eine vollständige Sequenzierung des hCLCA1-Gens zeigte eine Länge von 31.902 Basenpaaren mit 15 Exons und 14 Introns (GRUBER et al. 1998a). Die vollständigen Sequenzen aller murinen und humanen CLCA-Vertreter sind mittlerweile bekannt und in öffentlich zugänglichen Genomdatenbanken einsehbar ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq)).

Die chromosomale Lokalisation von hCLCA1, hCLCA2, hCLCA3 und hCLCA4 liegt in Form eines Genclusters auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p22-31) (GRUBER u. PAULI 1999a; RITZKA et al. 2004) im Bereich von 86,6 bis 86,83 mbp ([www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview/)). Alle sechs murinen CLCA-Vertreter liegen gleichartig geclustert auf Chromosom 3 der Maus (Bande H2-H3) und umfassen den Bereich von 143,70 bis 144,07 mbp ([www.ensembl.org/Mus\\_musculus/geneview/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/geneview/); LEVERKOEHNE u. GRUBER 2000).

### 2.5.6 CLCA-Vertreter der Maus

GANDHI et al. (1998) klonierten den ORF von mCLCA1 mit Hilfe von Homologiescreening einer Mäuselungen-cDNA-Bibliothek mit einer Sondensequenz, die einem Teil von bCLCA2 entsprach. Das Expressionsmuster wurde auf RNA-Ebene mittels *Northern Blot*, RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung untersucht. In dieser ersten Expressionsstudie wurde deutlich, dass es sich um einen Vertreter mit einem breiten Expressionsspektrum in vielen Organen, vor allem in sekretorischen Epithelien, handelt. Mittels *Northern Blot* und RT-PCR wurden Signale in Haut, Trachealepithel und Niere detektiert (ROMIO et al. 1999). In einer weiteren Studie wurde die RNA-Expression umfassender untersucht, wobei dieselben Methoden verwendet wurden wie bei Gandhi (GRUBER et al. 1998b). Die RNA-Expression wurde in Alveolar- und Gangepithelien der Milchdrüse, Enterozyten der Krypten in Dünn- und Dickdarm, respiratorischem Epithel und submukosalen Drüsen der Trachea und der Bronchien, Epithelzellen der Eileiter, des Endometriums, der Nebenhoden, der Nierentubuli, der Gallenblase, der Pankreasazini und der Speicheldrüsen detektiert. Des Weiteren waren in Keratinozyten der Haut und der Kornea, in Milz und Lymphknoten und in Spermatogonien zweiter Ordnung mRNA-Signale nachweisbar. Außerdem wurde mCLCA1 mittels RT-PCR in Zellkulturen muriner Lungen- und Aortenendothelzellen entdeckt und seine Funktion als Adhäsionsmolekül für bestimmte metastasierende Tumorzellen demonstriert (ABDEL-GHANY et al. 2002).

Nachdem mCLCA2 identifiziert wurde (LEE et al. 1999), ist eine spezifische quantitative RT-PCR etabliert worden, mit der eine Diskriminierung der mRNA beider Maushomologen, die eine 96%ige Übereinstimmung der Nukleinsäuresquenz aufweisen, möglich wurde (LEVER-

KOEHNE et al. 2002). Damit ist das oben beschriebene mRNA-Expressionsmuster als Summensignal aus mCLCA1 und mCLCA2 zu bewerten. LEE et al. (1999) untersuchten die involvierende Milchdrüse auf in diesem Prozess signifikant hochregulierte mRNA und identifizierten dabei als zweite Arbeitsgruppe den Homolog mCLCA2. Nach den Expressionsstudien von LEVERKOEHNE et al. (2002) wurde mCLCA1-RNA vor allem in Milz, Lymphknoten, Knochenmark, juveniler Milchdrüse, Lunge und Niere detektiert und mCLCA2-RNA in Thymus, juveniler, involvierender und laktierender Milchdrüse, Haut, in bestimmten Stadien der embryonalen Entwicklung im Gesamtembryo, in Dünn- und Dickdarm und im Nebenhoden.

Der dritte murine CLCA-Vertreter, mCLCA3, wurde aus einer cDNA-Bibliothek des Mäusedarmes isoliert. Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, dass die mRNA in Becherzellen des gesamten Dünn- und Dickdarmes stark exprimiert wird. *Northern Blot*-Analysen zeigten außerdem eine Expression in Magen, Uterus und Trachea (KOMIYA et al. 1999), woraufhin eine schleim-assoziierte Sekretion von Cl<sup>-</sup> und Wasser mit mCLCA3 als fungierendem Kanal postuliert wurde. Studien über eine mit dem mCLCA3-Protein zusammenhängende Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit existieren noch nicht. Weitere Hinweise für einen engen Zusammenhang von Schleimproduktion und mCLCA3-mRNA-Expression ergaben sich aus drei weiteren Studien. So konnte in einem murinen Asthmodell gezeigt werden, dass ein gravierender Asthma-Phänotyp durch die intratracheale Inokulation der Mäuse mit mCLCA3-cDNA in einem Adenovirusvektor provoziert wurde, während die Inokulation mit *antisense*-mCLCA3-cDNA eine Becherzellhyperplasie verhinderte, wie an PAS-gefärbten (*Periodic Acid Schiff*) histologischen Präparaten der Lungen anschließend demonstriert wurde (NAKANISHI et al. 2001). In einer weiteren Studie wurde an Interleukin-9 (IL-9) überexprimierenden, transgenen Mäusen gezeigt, dass eine Hochregulation von mCLCA3 und damit einhergehende Ausprägung eines asthmaartigen Phänotyps von der Expression von Th2-Zytokinen gesteuert wird. Neutralisierende Antikörper gegen IL-9 milderten den Phänotyp ab und führten zu einer verminderten mCLCA3-Expression (ZHOU et al. 2001). Eine ausführliche proteinbiochemische Charakterisierung und immunhistochemische Studie auf Ebene der Licht-, Elektronen- und konfokalen Lasermikroskopie bestätigte die ausschließliche Expression von mCLCA3 in schleimproduzierenden Zellen bestimmter Organe auch auf Proteinebene (LEVERKOEHNE

u. GRUBER 2002). Die subzelluläre Lokalisation zeigte eine Assoziation mit intrazellulären Vesikelmembranen in Becherzellen.

Der vierte murine CLCA-Vertreter, mCLCA4, wurde mit Hilfe von PCR-Primern, die homolog zur Sequenz von mCLCA1 generiert wurden, aus Gesamt-cDNA von Mäusedärmen identifiziert (ELBLE et al. 2002). Mittels RT-PCR wurde die RNA in Skelettmuskel, Uterus, Herz, Harnblase, Magen sowie Dünn- und Dickdarm detektiert und anschließend mit *in situ*-Hybridisierung auf zellulärer Ebene lokalisiert. Dabei wurden folgende Zellen als positiv identifiziert: Endothel der Aorta und der kleinen Lungengefäße, Aorten- und Pulmonalwand, AV-Knoten, glatte Muskulatur um die Lungenbronchiolen und Lungengefäße, isolierte glatte Muskulatur der Harnblasen- und Magenwand und glatte Muskulatur und Epithel des Darmes. Im Darm erschienen die Enterozyten stärker markiert als die Muskelzellen, dabei war vor allem das Villusepithel und nicht die Krypten positiv, wie es bei mCLCA1 und mCLCA2 beobachtet wurde. In *Patch-Clamp*-Versuchen in HEK-Zellen wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit beobachtet, worauf eine eventuelle Funktion als Regulator der Erregbarkeit der glatten Muskulatur vorgeschlagen wurde.

Der fünfte murine CLCA-Vertreter, mCLCA5, wurde mit computergestützter Homologiesuche mit einer Sequenz aus hCLCA2-cDNA als Sonde identifiziert (BECKLEY et al. 2004). Diese Arbeitsgruppe war auf der Suche nach dem Maus-Orthologen zu hCLCA2 und testete die Hypothese, ob der murine Vertreter sich ebenfalls als Tumorsuppressorgen verhält. Mittels semiquantitativer RT-PCR detektierten sie mCLCA5-RNA in Lunge, Niere, Uterus, Endothelzellen, Herz, Milz und Gastrointestinaltrakt und kamen zu dem Ergebnis, dass das Expressionsspektrum mit hCLCA2 überlappt, aber insgesamt breiter ist. In verschiedenen epithelialen Zelllinien von Mausmammatumoren mit unterschiedlicher Malignität wurde gezeigt, dass mCLCA5 präapoptotisch heraufreguliert wird und dass diese Zelllinien eine geringere Zellteilungsrate aufweisen, wenn sie mCLCA5 überexprimieren. Etwa zeitgleich entdeckten EVANS und Mitarbeiter (2004) ebenfalls mit Hilfe computergestützter Homologiesuche mCLCA5 und mCLCA6, die sie vor allem in Auge und Milz (mCLCA5) bzw. in Magen und Dickdarm (mCLCA6) detektierten. Für mCLCA6 wurde eine Spleiß-Variante mit demselben Expressionsmuster gefunden, in der das Exon 8 komplett und das Exon 10 teilweise deletiert sind. Auch für diese beiden Vertreter wurde eine mit NFA inhibierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in HEK-Zellen beobachtet. Eine hohe sequenzielle Ähnlichkeit

wurde zwischen mCLCA5 und hCLCA2 sowie zwischen mCLCA6 und hCLCA4 gefunden, so dass es sich hierbei eventuell jeweils um die entsprechenden Orthologen bei den beiden Spezies handelt. Allerdings konnte keine Expression im ZNS für den murinen Vertreter nachgewiesen werden, was das besondere Merkmal von hCLCA4 ist.

Neben ihrer beschriebenen Funktion als Cl<sup>-</sup>-Kanal wird mCLCA2 eine Rolle bei der Apoptoseregulation zugeschrieben, und mCLCA1 und mCLCA2 werden als potentielle Tumorsuppressorgene diskutiert (ELBLE u. PAULI 2001): In einer Milchdrüsenepithelzellkultur (HC11) wurde eine Hochregulation von mCLCA2 auf mRNA-Ebene beobachtet, wenn die Zellkultur apoptotischen Stimuli ausgesetzt wurde. In Adenokarzinomen der Milchdrüse ist die mRNA beider muriner Vertreter herunterreguliert. Auch für mCLCA5 wurde eine solche Funktion vorgeschlagen (BECKLEY et al. 2004).

Die endothelialen Vertreter mCLCA1 und mCLCA5 sollen außerdem Funktionen als Adhäsionsmoleküle übernehmen. Sie besitzen je eine konservierte Erkennungssequenz in der 90- und 35- kD-Untereinheit für das  $\beta$ 4-Integrin, über das sie an metastasierende Tumorzellen binden und so eine Adhäsion und Wachstumsstimulation am Gefäßendothel vermitteln (ABDEL-GHANY et al. 2002).

Eine Besonderheit der Regulation von mCLCA1 wurde in einer Koexpressionsstudie mit der regulatorischen Untereinheit eines K<sup>a</sup><sup>+</sup>-Kanals (KCNMRIB) in HEK-Zellen beobachtet, die die Sensitivität der nachgewiesenen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit gegenüber einer Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen deutlich steigerte (GREENWOOD et al. 2002).

### 2.5.7 CLCA-Vertreter des Menschen

Die vier CLCA-Vertreter des Menschen wurden mittels Homologiesuche aus menschlichen genomischen und cDNA-Bibliotheken isoliert. Mit der Sequenz der bCLCA2-cDNA als Sonde wurden hCLCA1, hCLCA2 und hCLCA3 isoliert (GRUBER et al. 1998a; GRUBER et al. 1999; GRUBER u. PAULI 1999b). Für diese Vertreter wurde die Transmembrantopologie am eingehendsten untersucht, außerdem wurde für hCLCA1 und hCLCA2 eine Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare, mit DIDS, DTT und NFA hemmbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in HEK-Zellen demonstriert. Die Expressionsdaten wurden auf RNA-Ebene mittels *Northern Blot*, *in situ*-Hybridisierung und

RT-PCR erhoben. So wurde die hCLCA1-mRNA ausschließlich im Zytosol des Dün- und Dickdarmepithels mit stärkster Ausprägung in den Krypten und Becherzellen detektiert. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurden zusätzlich mit *Northern Blot*- und *Dot Blot*-Hybridisierung schwache Signale in Uterus, Hoden und Niere gefunden (AGNEL et al. 1999). Eine erhöhte mRNA-Expression von hCLCA1 bei Asthmapatienten (HOSHINO et al. 2002) ist ein weiterer Hinweis, dass es sich bei hCLCA1 um den orthologen Vertreter von mCLCA3 handelt, für den dasselbe Phänomen im Mausmodell beschrieben wurde (NAKANISHI et al. 2001). KAMADA et al. (2004) konnten zeigen, dass bestimmte Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) des hCLCA1-Gens mit einem erhöhten Risiko einer Asthmaerkrankung bei Kindern assoziiert sind.

Der zweite humane CLCA-Vertreter, hCLCA2, wurde in Lunge, Trachea und Milchdrüse (GRUBER et al. 1999) sowie im Urogenitaltrakt (AGNEL et al. 1999) nachgewiesen. Außer der Funktion als Cl<sup>-</sup>-Kanäle wird eine Tumorsuppressorfunktion für hCLCA1 und hCLCA2 diskutiert. So konnte in humanen Mammakarzinomen und in davon abstammenden Zelllinien ein Verlust der hCLCA2-Expression gezeigt werden. Mit hCLCA2 transfizierte Zelllinien dagegen zeigten ein weniger aggressives Wachstum *in vivo* und *in vitro* (GRUBER u. PAULI 1999c). Des Weiteren ist die mRNA-Expression von hCLCA1 und hCLCA2 in Kolonkarzinomen herunterreguliert (BUSTIN et al. 2001).

Eine weitere Studie charakterisierte die hCLCA2-Expression auf Proteinebene (CONNON et al. 2004). Vor allem verhornende Plattenepithelien des Ösophagus, des Larynx, der Vagina, der äußeren Haut und der Cornea zeigten in den basalen Zellschichten eine starke Proteinexpression von hCLCA2. In diesem Zusammenhang wurde für diesen Vertreter eine Funktion als Vermittler von Zell-Basalmembran-Adhäsionen postuliert. Diese Studie wurde kürzlich durch Charakterisierung des mRNA-Expressionsmusters mittels quantitativer *real-time* RT-PCR unterstützt. Starke Signale wurden in verhornenden mehrschichtigen Epithelien gefunden (Kornea, Ösophagus, Larynx, Haut und Vagina), schwache Signale in einigen einschichtigen Epithelien (Lunge, Trachea, Kolon, Uterus). Als negativ erwiesen sich Herz, Leber, Milz, Gehirn, Magen und Niere. Mammagewebe wurde nicht untersucht (CONNON et al. 2005). Des Weiteren wurde mittels Doppel-Immunhistochemie eine enge Kollokalisierung von hCLCA2 mit  $\beta$ 4-Integrin demonstriert (CONNON et al. 2005).

Die hCLCA3-cDNA kodiert zwei kurze ORFs, von denen nur einer in Zellexpressionssystemen translatiert wird (GRUBER und PAULI 1999b). Dieser kurze ORF kodiert für 262 Aminosäuren und entspricht mit seiner konservierten Multicysteinregion einem aminoterminalen Trunkat der übrigen Vertreter. Der durchgeführte Protease-Protektionsversuch deutet darauf hin, dass das Trunkat sezerniert wird, außerdem konnte es im Zellkulturüberstand der transfizierten HEK- und CHO-Zellen nachgewiesen werden. In einer Reihe untersuchter Gewebe konnten keine signifikanten RNA-Mengen mittels *Northern Blot*-Hybridisierung gefunden werden, eine schwache Expression wurde mit Hilfe von *nested*-RT-PCR in Milchdrüse, Lunge, Trachea, Milz und Thymus gemessen (GRUBER und PAULI 1999b). Es wird vermutet, dass es sich hier um ein Pseudogen handeln könnte (GRUBER et al. 2000; GRUBER et al. 2002).

Das mittels *Northern*- und *Dot Blot*-Hybridisierung ermittelte Expressionsmuster für hCLCA4 erstreckt sich auf Dünn- und Dickdarm, Trachea, Urogenitaltrakt und Gehirn. Das zelluläre Verteilungsmuster wurde nicht untersucht (AGNEL et al. 1999).

#### 2.5.8 CLCA-Vertreter des Rindes

Im Gegensatz zu den übrigen CLCA-Vertretern wurden bCLCA1 und bCLCA2 zuerst auf dem Proteinlevel entdeckt (ZHU et al. 1991; ZHU u. PAULI 1991; Ran u. BENOS 1992). Nach der Klonierung von bCLCA1 zeigte eine RT-PCR-Analyse (CUNNINGHAM et al. 1995) eine exklusive Expression in der Trachea. In weiteren Untersuchungen wurde die RNA im Tracheal- und Bronchialepithel detektiert (ELBLE et al. 1997). Die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von bCLCA1 ist am intensivsten von allen Vertretern der CLCA-Genfamilie in unterschiedlichen Expressionssystemen untersucht worden (FULLER et al. 1994; CUNNINGHAM et al. 1995; JI et al. 1998).

Die Klonierung und systematische Expressionanalyse von bCLCA2 auf Protein- und mRNA-Ebene (ELBLE et al. 1997) ergab deutliche Signale in Milz, Pleural- und Lungenvenulen und im Bronchialepithel der Lunge.

### 2.5.9 CLCA-Vertreter des Schweines

Die Isolierung von pCLCA1 aus einer porcinen Darm-cDNA-Bibliothek gelang mit Hilfe eines Antikörpers, der die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im Schweinedarm inhibieren konnte (GASPAR et al. 2000). Mittels RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung wurde dieser CLCA-Vertreter im Ileumepithel, Trachealepithel einschließlich submukosaler Drüsen und in den großen Kopfspeicheldrüsen nachgewiesen. Seine Sequenzverwandtschaft zu hCLCA1 und mCLCA3 legen nahe, dass es sich auch um einen engen funktionellen Verwandten handeln könnte. Eine ähnliche Rolle bei Atemwegserkrankungen, die mit massiver Mukusproduktion einhergehen, wurde bisher jedoch nicht berichtet. Der pCLCA1-Homolog scheint außerdem gleichmäßig in allen Epithelzellen des Ileums ohne besondere Assoziation zu Becherzellen exprimiert zu sein und wurde in den Darmabschnitten mit den meisten Becherzellen (Kolon) gar nicht detektiert. Damit ist eine enge funktionelle Verwandtschaft zu hCLCA1 und mCLCA3 eher zu relativieren. Ausführlich wurde die Elektrophysiologie dieses potentiellen Cl<sup>-</sup>-Kanals in 3T3-Mausfibroblastenzellen (LOEWEN et al. 2002) und Kolonkarzinomzellen (LOEWEN et al. 2004) untersucht. Das Verhalten von pCLCA1 in der epithelialen Zelllinie, die den nativen Bedingungen näher kommt, glich dabei eher dem eines Aktivators einer endogenen cAMP-aktivierten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit als dem eines eigenständigen Kanalproteins. Im Gegensatz zu allen anderen CLCA-Vertretern, die bereits elektrophysiologisch charakterisiert worden sind, ist pCLCA1 nicht sensibel gegenüber DIDS und DTT (LOEWEN et al. 2002).

### 2.5.10 CLCA-Vertreter des Pferdes

Die Entdeckung des ersten CLCA-Vertreterers beim Pferd wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe publiziert (ANTON et al. 2005). Die enge Verwandtschaft zu hCLCA1 und mCLCA3 legt nahe, dass es sich hier um den entsprechenden equinen orthologen Vertreter handelt. Mittels spezifischer Antikörper gegen das eCLCA1-Protein wurde eine systematische Expressionsanalyse sämtlicher Organe und Gewebe des Pferdes durchgeführt und mittels quantitativer *real-time* RT-PCR auf RNA-Ebene bestätigt. Dabei zeigte sich, dass ebenso wie seine engsten Verwandten hCLCA1 und mCLCA3 das Hauptvorkommen dieses CLCA-

Vertreter die Becherzellen unter anderem des Bronchialepithels der Lunge und des Dün- und Dickdarmepithels sind. Als Besonderheit zeigten sich auch schleimproduzierende Zellen der harnableitenden Wege, die bei den anderen beiden Spezies nicht vorkommen, und der Hautschweißdrüsen des Pferdes positiv. Erste Ergebnisse, die mittels *Northern-* und *Western Blot*-Hybridisierungen, immunhistochemisch und mittels RT-qPCR generiert wurden, zeigten weiterhin, dass eCLCA1 eine Rolle bei der Pathogenese der Chronisch-obstruktiven Bronchiolitis des Pferdes spielen könnte (ANTON et al. 2005).

#### 2.5.11 CLCA-Vertreter der Ratte

Ein CLCA-Vertreter der Ratte wurde bei der Untersuchung von Mechanismen bei der Calcium-induzierten Sekretion von pankreatischen Zymogenvesikeln identifiziert (THEVENOD et al. 2002). In dieser Untersuchung wurde nur ein 580 bp langes Teilstück mit Hilfe von Primern, die an die mCLCA1-Sequenz angelehnt waren, sequenziert. Die Leitfähigkeit, Hemmbarkeit und  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit zeigten die Eigenschaften eines CLCA-Vertreter. Die komplette codierende Sequenz wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, die die inhibitorische Wirkung von phosphorylierenden Agenzien auf die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Kanälen in der glatten Gefäßmuskulatur untersuchte (YAMAZAKI u. KITAMURA 2003). Das mRNA-Expressionsmuster dieses Vertreter wurde erst kürzlich veröffentlicht. Es zeigten sich starke Signale in Neuronen und Gliazellen des Gehirns, der Niere, Dünndarm und Magen, während keine mRNA-Expression in Dickdarm, Leber, Lunge, Herz und Milz detektiert werden konnte (JEONG et al. 2005).

## 2.6 Pathomechanismen der Zystischen Fibrose beim Menschen

Die Zystische Fibrose, auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste erbliche letale Stoffwechselerkrankung des Menschen mit einer Inzidenz von etwa 1 pro 2500 geborenen Kindern in der kaukasischen Bevölkerung und einer Gendefekt-Häufigkeit von etwa 4%. Ein natürliches Vorkommen des Gendefektes ist bei keinem anderen Säugetier bekannt. Die

Krankheit beruht auf einer defekten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit exokriner Epithelien, ausgelöst durch Mutationen im *cftr*-Gen. Sie äußert sich beim Menschen klassischerweise durch eine schwerwiegende Lungenerkrankung, die mit Akkumulation eines zähen Schleimes, sekundären bakteriellen Infektionen und Fibrose des Organs einhergeht. Weiterhin sind häufig Pankreas, Gallenepithelien, Darm, Schweißdrüsen und männliche Geschlechtsorgane betroffen, so dass erkrankte Individuen häufig außerdem an Pankreasinsuffizienz, Gallensteinen, Konstipationen und Infertilität (männlich) leiden (ROWNTREE u. HARRIS 2003). Eine tödliche Komplikation bei Neugeborenen ist außerdem ein mit ca. 15%iger Häufigkeit auftretender Mekoniumileus, von dem bekannt ist, dass sein Auftreten mit bestimmten Allelen eines Genlocus auf dem humanen Chromosom 19 korreliert ist (ZIELINSKY et al. 1999).

Aufgrund der hohen Konservierung des Gendefektes in der Bevölkerung wird vermutet, dass heterozygote Merkmalsträger einen Selektionsvorteil besitzen. Dieser scheint in Resistenzen gegenüber bestimmten Bakterien oder deren Toxinen zu bestehen, die ihre Pathogenität durch Bindung an Wildtyp-CFTR entfalten (GABRIEL et al. 1994; GOLDSTEIN et al. 1994; PIER et al. 1998; HOGENAUER et al. 2000).

Es sind mittlerweile über 1000 Mutationen des *cftr*-Gens bekannt, davon kommt jedoch bei 75% der Patienten die Mutation  $\Delta F508$  vor, bei der ein einzelner Phenylalaninrest deletiert ist, was zu einer inkorrekten Prozessierung des Proteins distal des Golgi-Apparates führt (CHENG et al. 1990). Die Mutationen werden in fünf Klassen eingeteilt, wobei die Klassen eins bis drei mit den schwersten Phänotypen korreliert sind. Es handelt sich hierbei um Mutationen, die zu Translationsabbruch und vollständiger CFTR-Protein-Defizienz an der Plasmamembran führen (Klasse eins), Mutationen, die zu missgefaltetem oder missprozessiertem Protein führen ( $\Delta F508$ ) (Klasse zwei), Mutationen, die die NBF-Domänen betreffen und die Regulation der Öffnung beeinflussen (Klasse drei), Mutationen, welche die Leitfähigkeitseigenschaften betreffen und in den vermuteten Porenformenden Domänen lokalisiert sind (Klasse vier) und solche, die aufgrund eines deletierten Carboxyterminus zu einer stark reduzierten Proteinstabilität führen (Klasse fünf) (zusammengefasst von ROWNTREE u. HARRIS 2003).

Da eine große Variabilität des phänotypischen Ausprägungsgrades, vor allem der Lungenmanifestation, ohne feste Assoziation zu bestimmten Mutationen besteht, werden eine Reihe von weiteren genetischen- und Umwelteinflüssen diskutiert, die das Krankheitsbild zu beein-

flussen scheinen. Dazu zählen Nukleotidpolymorphismen, die sowohl in Introns als auch in Exons oder der Promoterregion des *cftr*-Gens selbst gelegen sind (DORK et al. 1991; ROMÉY et al. 1999; CLAIN et al. 2001), aber auch eine Reihe von Allelvariationen, die Gen-Loci außerhalb des *cftr*-Gens betreffen (zusammengefasst von DRUMM 2001). Studien an *cftr*-Knockout-Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen (ROZMAHEL et al. 1996) sowie an mono- und dizygoten Zwillingen- und Geschwisterpaaren (BRONSVELD et al. 2001) lassen vermuten, dass vor allem Gene außerhalb des *cftr*-Locus an der Modulation des Phänotyps beteiligt sind. Zu diesen modifizierenden Genen gehören zumindest beim Menschen wahrscheinlich auch Mitglieder der CLCA-Kanalfamilie. So konnte kürzlich in einer Studie an CF-Patienten gezeigt werden, dass eine erhöhte DIDS-sensitive Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in Rektumschleimhautbiopsien signifikant mit bestimmten Allelen des hCLCA1-Gens korreliert ist (RITZKA et al. 2004).

## 2.7 Zystische Fibrose im Mausmodell

Das murine *cftr*-Gen wurde 1991 auf Chromosom 6 kartiert. Der ORF enthält 6,3 kbp (humaner *cftr* 6,5 kbp) und kodiert für 1476 Aminosäuren (humaner *cftr* 1480). Die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Spezies beträgt 78% (TATA et al. 1991). Ähnlich wie beim Menschen wird murine CFTR-mRNA in Lunge, Magen, Darm, Niere, Leber, Pankreas und Speicheldrüse exprimiert (KELLEY et al. 1992). Im Darm scheint das CFTR-Protein der Maus hauptsächlich in Becherzellen exprimiert zu sein (HAYDEN u. CAREY 1996).

Das erste *cftr*-Knockout-Mausmodell wurde 1992 generiert (SNOUWAERT et al. 1992). Bis heute wurden zehn unterschiedliche Mausmodelle beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Mutation und ihrem Phänotyp unterscheiden (zusammengefasst von GRUBB u. BOUCHER 1999).

Das Ziel der Generierung dieser Modelle war es, durch Disruption eines Exons im *cftr*-Gen, zum Beispiel durch Einfügen eines Stop-Kodons oder durch Deletion, eine defekte Prozessierung des Proteins in der Zelle und defekte Expression in der Zellmembran zu produzieren. Um die Vergleichbarkeit des Modells mit dem menschlichen Defekt zu verbessern, wurden

später auch Mausmodelle generiert, die den beiden häufigsten Mutationen beim Menschen ( $\Delta F508$  und  $G551D$ ) entsprechen, was aufgrund der identischen Lokalisationen der jeweiligen Aminosäuren in den beiden Orthologen Genen möglich war. Allen Mausmodellen ist gemeinsam, dass sie in respiratorischen und gastrointestinalen Epithelien eine reduzierte oder abwesende cAMP-aktivierbare  $Cl^-$ -Leitfähigkeit besitzen (zusammengefasst von GRUBB u. GABRIEL 1997; GRUBB u. BOUCHER 1999). Weiterhin manifestiert sich die Erkrankung bei allen Modellen vor allem im Darm, während Lungen-, Pankreas- und Lebermanifestationen auch bei über 90 Tage alten CF-Tieren nicht auftreten (KENT et al. 1996) bzw. nur vereinzelt beschrieben sind (RATCLIFF et al. 1993). Dies wiederum ist stark vom genetischen Hintergrund abhängig (KENT et al. 1997; CHUNG et al. 2001; HASTON et al. 2002).

Bei den meisten Mausmodellen sind die gastrointestinalen Komplikationen letal, wobei häufig kurz nach der Geburt ein Mekoniumileus auftritt oder ein Mukus-Ileus nach dem Absetzen. Es ist beschrieben, dass die Überlebenszeiten der CF-Tiere mit Flüssignahrung oder Zugabe von Laxativa zum Trinkwasser deutlich verbessert werden können (CLARKE et al. 1996; KENT et al. 1996).

### 2.7.1 Generierung und Charakterisierung des $cftr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Mausmodells

Das  $cftr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Mausmodell wurde durch Insertion eines 3,5 kb großen Vektors in das Exon 10 des  $cftr$ -Gens der Maus hergestellt. Dieses eingesetzte Genfragment stellt Teile des Introns 9 und des Exons 10 des  $cftr$ -Gens dar. Dieser Vektor wurde mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht, die dem Mausstamm 129/Sv entnommen worden waren. Durch gezielte Integration in das Stammzellgenom wurde dadurch eine teilweise Duplikation des Exons 10 produziert, was zu einer Unterbrechung des Leserahmens führt (DORIN et al. 1992). Nachdem die Stammzellen auf erfolgreiche und homologe Rekombination mittels positiver und negativer Selektion überprüft worden waren, wurden sie anschließend in C57BL/6J Blastozysten injiziert und weiblichen scheinträchtigen Mäusen eingepflanzt, um chimäre Tiere zu erzeugen. Da ein Teil der chimären Tiere den genetischen Defekt auch in Zellen der Keimbahn aufweist, können anschließend mit diesen Tieren heterozygote und durch Verpaaren der heterozygoten Tiere homozygote Merkmalsträger generiert

werden. Die Identifizierung von Chimären und die Keimzelltransmission des Gendefektes erfolgt anhand von unterschiedlichen Fellfarben, die jeweils mit dem Stammzellen-, Blastozysten- und Zuchtstamm gekoppelt vererbt werden.

Die phänotypische Charakterisierung der *cftr*<sup>TgH(neoim)1Hgu</sup>-Knockout-Mäuse wurde in dem ausgekreuzten Stamm MF1 durchgeführt (DORIN et al. 1992), wobei die Tiere zum Untersuchungszeitpunkt bis zu 30 Tage alt waren. Alle homozygot betroffenen Tiere zeigten eine erhöhte basale Potenzialdifferenz des Nasenschleimhautepithels, die sensitiver gegenüber Amilorid war als die der Wildtyp-Tiere. Dieses Phänomen wird beim Menschen zur CF-Diagnostik verwendet und ist mit einer erhöhten Na<sup>+</sup>-Absorption durch die fehlende Hemmung des ENaC-Kanals in Anwesenheit eines intakten, regulativen CFTR-Kanals zu erklären (STUTTS et al. 1995). Anders als beim Menschen trat diese Absorptionsstörung jedoch nicht im Darmkanal und in der Trachea der CF-Tiere auf. Des Weiteren zeigten die Tiere eine reduzierte cAMP-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im respiratorischen- und im Darmepithel, sowie eine erhaltene Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in der Lunge, die im Darm reduziert war (SMITH et al. 1995). Auch diese Leitfähigkeitseigenschaften wurden beim Menschen beobachtet. Es wurde vermutet, dass in der Lunge von Mäusen und Menschen eine Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit, die unabhängig von funktionellem CFTR ist, existiert (WIDDICOMBE 1986; BOUCHER et al. 1989) und die bei Mäusen sogar wichtiger als die CFTR-Leitfähigkeit zu sein scheint (CLARKE et al. 1994).

Histopathologisch wurden milde Dilatationen des Kolons mit abnormalen Mukusansammlungen bei homozygot betroffenen Tieren beobachtet, heterozygote- und Wildtyp-Mäuse waren nicht voneinander zu unterscheiden. Sporadisch wurden weiterhin geringgradige, fokale Lungenatelektasen, Dilatationen der Speicheldrüsengänge und Mukusansammlungen im Vas deferens beschrieben. Das Pankreas war bei allen Tieren unverändert. Bei zwei von sechs der untersuchten CF-Tiere lagen keinerlei histopathologische Veränderungen vor.

Die sehr mild ausgeprägten histopathologischen Veränderungen dieses Mausmodells sind darauf zurückzuführen, dass durch alternatives Spleißen ca. 10% Wildtyp-CFTR-mRNA in der Lunge und 20% im Darm produziert werden (DORIN et al. 1994), wodurch in homozygot betroffenen Tieren etwa 50% der CFTR-vermittelten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufrechterhalten werden im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (SMITH et al. 1995). Eine erhöhte Sterblichkeit aufgrund gastrointestinaler Komplikationen scheint bei diesem Defekt keine Rolle zu spielen.

Die Expression von Wildtyp-CFTR-mRNA ist hochvariabel von Tier zu Tier sowie von Organ zu Organ. In der Lunge und Niere ist sie zudem stark altersabhängig mit hohen Expressionsraten in den ersten beiden Lebensmonaten (LARBIG et al. 2002).

### 2.7.2 Generierung und Charakterisierung des *cftr*<sup>tm1Cam</sup>-Mausmodells

Das *cftr*<sup>tm1Cam</sup>-Mausmodell wurde durch Insertion eines Stop-Kodons, integriert in ein Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Mini-Gen (HPRT-Mini-Gen), in zuvor hinsichtlich des HPRT-Locus mutierten embryonalen Stammzellen hergestellt. Durch homologe Rekombination erfolgte die Insertion des Mini-Gens im Exon 10 des *cftr*-Gens der embryonalen Stammzellen, wodurch das HPRT-Gen wieder hergestellt wurde (RATCLIFF et al. 1993). Mit Hilfe alternativer Primerpaare konnten dann homo- und heterozygote embryonale Stammzellen bzw. Tiere selektiert werden, in denen wieder ein vollständiges HPRT-Gen und damit auch das Stop-Kodon erfolgreich durch homologe Rekombination eingeschleust wurde. Die Züchtung von Chimären, Identifizierung von Keimzellchimären und Generierung eines Stammes mit konstanter Expression der Mutation erfolgten nach denselben Prinzipien wie bereits beschrieben.

Durch Integration eines Stop-Kodons in das *cftr*-Gen werden die Transkription und die Translation des Proteinprodukts vollständig unterbunden, so dass diese Mutation zu einem sehr viel schwerwiegenderen Phänotyp führt im Vergleich zur Mutation *cftr*<sup>TgH(neoim)1Hgu</sup>.

Das Mausmodell wurde anschließend histopathologisch und elektrophysiologisch in einem ausgekreuzten Stamm charakterisiert, wobei die Tiere bis zu 4 Wochen alt waren (RATCLIFF et al. 1993). Es zeigte sich eine Mortalitätsrate von 80% in den ersten Tagen nach der Geburt, wobei die Mäuse an Mekonium-Ileus und schwerer Peritonitis verendeten. Überlebende Tiere wiesen vom ersten Lebenstag an eine Mukusüberproduktion in Dick- und Dünndarm auf, während die Lungen völlig unverändert waren. Ähnliche histopathologische Veränderungen fanden sich in Pankreas und Tränendrüse, jedoch waren hier nicht alle Tiere betroffen.

Elektrophysiologische Untersuchungen des Trachealepithels zeigten eine signifikant schwächere cAMP-vermittelte Stimulation eines *Short Circuit Current* und eine ausbleibende Stimulation bei Untersuchung des Zäkumepithels (RATCLIFF et al. 1993). Ob es sich bei

dieser Leitfähigkeitsmessung um  $\text{Cl}^-$ -Ströme handelt, wurde hier nicht näher untersucht. Eine erhöhte Sensitivität der beiden Organe gegenüber Amilorid, assoziiert mit einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Absorption in den CF-Epithelien der Tiere wurde nicht beobachtet. In einer weiteren Studie wurden diese Leitfähigkeiten als  $\text{Cl}^-$ -Ströme identifiziert, außerdem wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Trachealepithel von CF- und Wildtyp-Tieren detektiert, die im Darm nicht näher untersucht wurde. In dieser Studie konnte der Sekretionsdefekt in diesem Mausmodell erfolgreich durch Einschleusen eines Vektors, der humanes *cfr* enthielt, korrigiert werden (HYDE et al. 1993).

## 2.8 Alternative $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten im Komplex der Zystischen Fibrose

Zu den Genen, für die ein modifizierender Einfluss auf den Defekt der Zystischen Fibrose beschrieben worden ist, zählen zum Einen solche, die für Genprodukte von Entzündungs- und Immunabwehrfaktoren kodieren, wie *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ),  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Mannose-bindendes-Lektin, *Nitric-Oxide-Synthase* oder Glutathiontransferase (zusammengefasst von DRUMM 2001; ROWNTREE u. HARRIS 2003). Zum Anderen handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, welche sogenannte alternative  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten vermitteln könnten. Dabei wurde die Existenz einer  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit, die in CF-Epithelien unabhängig von einer CFTR-vermittelten  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit vorkommt, vielfach beschrieben (WILSCHANSKY et al. 1996; BRONSVELD et al. 2000), jedoch ist deren molekulare Identität bisher nicht bekannt. In einer Studie an  $\Delta$ F508-Patienten konnte vor Kurzem erstmalig gezeigt werden, dass ein humaner Vertreter der CLCA-Genfamilie signifikant den Ausprägungsgrad einer  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Darm dieser CF-Patienten beeinflusst (RITZKA et al. 2004). Ob das CLCA-Protein dabei als eigenständiger Kanal oder als Aktivator eines bisher unbekanntes  $\text{Cl}^-$ -Kanals fungiert, blieb bisher ungeklärt, jedoch ist dies ein starker Hinweis, dass die Mitglieder der CLCA-Genfamilie der gesuchten  $\text{Cl}^-$ -Kanalfamilie entsprechen könnten, die die erhaltene  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in CF-Epithelien vermittelt.

### 2.8.1 Der CIC-2-Kanal als alternativer Cl<sup>-</sup>-Kanal

Nachdem gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche genetische Hintergründe einen starken Einfluss auf den Ausprägungsgrad gastrointestinaler Obstruktionen in CF-Mäusen haben, wurde mittels genetischem *mapping* eine Region auf dem murinen Chromosom 7 identifiziert (HASTON et al. 2002), der ein modulierender Faktor bei der Darmpathologie zu sein scheint. Analog dazu war zuvor beim Menschen eine Region auf Chromosom 19 identifiziert worden (ZIELINSKY et al. 1999), die mit dem Vorkommen eines Mekonium-Ileus beim Säugling signifikant korreliert ist. Da auf diesem Genlocus unter anderem die kodierende Sequenz eines CIC-Kanals gelegen ist, wurden CIC-Kanäle weiter hinsichtlich ihres modulierenden Einflusses studiert.

Der CIC-2-Kanal beispielsweise zeigt ähnliche Eigenschaften wie der CFTR-Kanal hinsichtlich der Ionenselektivität, Insensitivität gegenüber DIDS und des Expressionsmusters unter anderem in Lunge, Leber Darm und Pankreas (THIEMANN et al. 1992). Hauptaktivierungsmechanismen für den CIC-2-Kanal sind ein niedriger extrazellulärer pH und eine zelluläre Hyperpolarisation. Mittels extrazellulärer pH-Erniedrigung konnte *in vitro* eine gesteigerte Cl<sup>-</sup>-Sekretion in einer humanen CF-Lungenepithelzelllinie, die CIC-2 überexprimierte, stimuliert werden (SCHWIEBERT et al. 1998). Durch die Generierung einer CIC-2-*Knockout*-Maus wurde jedoch zweifelhaft, ob der CIC-2-Kanal überhaupt ähnliche physiologische Funktionen übernimmt wie der CFTR-Kanal. Diese Mäuse zeigten keine gestörte Cl<sup>-</sup>-Kanalfunktion in sekretorischen Epithelien sondern eine Degeneration von Spermatogonien und Photorezeptorzellen der Retina (BÖSL et al. 2001). Spätere Untersuchungen an CF-Mäusen, die gleichzeitig einen CIC-2-Kanal-*Knockout* besaßen, führten zudem zu keiner weiteren Verstärkung des CF-Phänotyps, woraus geschlossen wurde, dass die CIC-2-vermittelte Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit kein modifizierender Faktor bei der Zystischen Fibrose ist (ZDEBIK et al. 2004). Auch die Untersuchung von  $\Delta F508$ -Patienten mit unterschiedlich stark ausgeprägter Lungenaffektion auf eine eventuelle Assoziation mit *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) im CIC-2-Gen verlief negativ (BLAISDELL et al. 2004). Eine quantitative Expressionsanalyse von CIC-2- und CIC-4-mRNA im Darm von *cfr*<sup>tm1Unc</sup>-Mäusen zeigte keine Unterschiede zwischen unterschiedlich stark betroffenen Gruppen oder im Vergleich zum Wildtyp (GYÖMÖREY et al. 2001).

### 2.8.2 $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare $\text{Cl}^-$ -Kanäle als alternative $\text{Cl}^-$ -Kanäle der Lunge

Bei Maus und Mensch wurden in Organen, die von dem Defekt der Zystischen Fibrose betroffen sind,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeiten beschrieben, welche die Symptomatik vermutlich zumindest teilweise kompensieren können (WIDDICOMBE 1986; BOUCHER et al. 1989; ANDERSON u. WELSH 1991; GRAY et al. 1994; VEEZE et al. 1994; ROZMAHEL et al. 1996; WILSCHANSKI et al. 1996; KENT et al. 1997; BRONSVELD et al. 2000). WIDDICOMBE stellte bei CF-Patienten 1986 zum ersten Mal eine erhaltene  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in primären Zellkulturen von Nasen- und Trachealepithelzelllinien fest. Diese  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in respiratorischen CF-Epithelien des Menschen wurde von weiteren Autoren bestätigt (BOUCHER et al. 1989; WILLUMSEN u. BOUCHER 1989) und näher charakterisiert (ANDERSON u. WELSH 1991). In letztgenannter Studie wurde an Nasenepithelzellkulturen von CF- und gesunden Patienten gezeigt, dass die Leitfähigkeit nicht nur durch unterschiedliche Aktivatoren, nämlich  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP stimuliert wurde, sondern, dass es sich tatsächlich um unterschiedliche Kanäle, lokalisiert in denselben Zellen, handelte. Die cAMP-aktivierbare Leitfähigkeit war DIDS-insensitiv, zeigte eine  $\text{Cl}^- > \text{I}^-$ -Selektivität, war in gesunden Epithelzellen additiv zur  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit auslösbar und fehlte in CF-Epithelien. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit war DIDS-sensitiv, zeigte eine  $\text{I}^- > \text{Cl}^-$ -Selektivität, ließ sich additiv zur cAMP-aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit auslösen und war in gesundem- und im CF-Nasenepithel vorhanden. In einer Studie an 55 Zwillings- und Geschwisterpaaren, die als homozygote Träger der  $\Delta\text{F508}$ -Mutation identifiziert worden waren, konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ausprägungsgrad einer  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren, DIDS-sensitiven  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit und einer verbesserten Lungenfunktion festgestellt werden (BRONSVELD et al. 2001).

Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen im CF-Mausmodell. Hier scheint die basale und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare DIDS-sensitive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit stärker in der Lunge ausgeprägt zu sein als beim Menschen. Da CF-Mäuse generell nahezu keine Lungenaffektion zeigen, könnte dies ein Hinweis auf einen Kompensationsmechanismus sein (CLARKE et al. 1994), der auch für das Pankreas (GRAY et al. 1994; CLARKE et al. 1996) und den Ovidukt der Maus (LEUNG et al. 1995) postuliert wird. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im respiratorischen Epithel ist offenbar nicht nur für diesen Interspezies-Unterschied verantwortlich, sondern bedingt

wahrscheinlich auch Stammesunterschiede. So zeigten kombinierte histopathologische und elektrophysiologische Untersuchungen von KENT et al. (1997) an CF-Mäusen (*cftr*<sup>tm1Unc</sup>; Disruption von Exon 10) des Stammes C57BL/6J, dass dieser genetische Hintergrund einen Phänotyp mit kürzerer Überlebenszeit, verminderter Lungenfunktion, spontaner Lungenentzündung und -fibrose bei fehlender Ca<sup>2+</sup>-aktivierbarer Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit aufwies. Frühere Untersuchungen an einem ausgezüchteten Stamm mit derselben *cftr*-Mutation dagegen hatten keine pathophysiologischen Veränderungen der Lunge bei heraufregulierter Ca<sup>2+</sup>-aktivierbarer Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im Vergleich mit Wildtyp-Tieren gezeigt (GRUBB et al. 1994). Beim Vergleich der Lungenpathologie von C57BL/6J-Stämmen mit BALB/cJ-Stämmen, die ebenfalls beide die *cftr*<sup>tm1Unc</sup>-Mutation besaßen, wurden ebenfalls nur bei den C57BL/6J-Tieren spontane Lungenveränderungen von mehreren Autoren festgestellt. Diese schlugen zwei Kanäle als alternative Leitfähigkeiten für den Stamm vor: einen mittels *Quantitative Trait Loci-mapping Strategy* (QTL) identifizierten Genort auf dem murinen Chromosom 6, der für CLC-4 kodiert (HASTON et al. 2002) und einen Ca<sup>2+</sup>-aktivierbaren Cl<sup>-</sup>-Kanal (mCLCA3) (CHUNG et al. 2001). Dessen mRNA war in BALB/cJ-Mäusen, die kaum Lungenveränderungen zeigten, hochreguliert im Vergleich zu den C57BL/6J-Tieren. Eine DIDS-sensitive Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im Nasenepithel einer Subpopulation von CF-Mäusen mit milder Symptomatik, die weder in Wildtyp- noch in den übrigen schwer betroffenen Tieren der Gruppe vorhanden war, konnte von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (WILSCHANSKI et al. 1996).

### 2.8.3 Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Cl<sup>-</sup>-Kanäle als alternative Cl<sup>-</sup>-Kanäle des Darmes

Das Vorhandensein einer eigenständigen Ca<sup>2+</sup>-aktivierbaren Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im Darm wird sowohl für den Menschen als auch für das Mausmodell kontrovers diskutiert. Viele Autoren beschreiben das Vorhandensein einer Ca<sup>2+</sup>-aktivierbaren Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in CF-Darmepithelien des Menschen (BÖHME et al. 1991; VEEZE et al. 1994; BRONSVELD et al. 2000; HIRTZ et al. 2004). Hierbei handelt es sich jedoch größtenteils um eine Restleitfähigkeit, die durch Wildtyp-CFTR vermittelt wird, der in geringen Mengen bei der  $\Delta F508$ -Mutation produziert wird. Durch Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird die Zelle

hyperpolarisiert und basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle öffnen sich.  $\text{K}^+$  strömt ein und erhöht den apikalen  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom durch noch vorhandene CFTR-Kanäle (MALL et al. 1998; MALL et al. 2000). Andere Untersuchungen identifizierten eine DIDS-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Darm von  $\Delta\text{F508}$ -CF-Patienten (BRONSVELD et al. 2000; BRONSVELD et al. 2001; RITZKA et al. 2004), die jedoch nicht mit einem milderem Phänotyp korreliert war (BRONSVELD et al. 2001). Als mögliches Kandidatengen für diese Leitfähigkeit wurde kürzlich der humane CLCA1-Genlocus auf Chromosom 1 vorgeschlagen (RITZKA et al. 2004). In dieser Studie wurde in 22% der untersuchten CF-Patienten eine DIDS-sensitive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in der Rektumschleimhaut detektiert, und die Allelhäufigkeiten auf dem CLCA-Locus zeigten eine signifikante Variation zwischen dieser Gruppe und den Patienten mit fehlender  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit. Auch hier war diese Leitfähigkeit nicht mit einer verbesserten Lungenfunktion assoziiert, wie schon zuvor festgestellt worden war (BRONSVELD et al. 2001). Dagegen ist die CFTR-vermittelte DIDS-insensitive Restleitfähigkeit signifikant mit einem milden Darm-, Pankreas- und Lungenphänotyp und mit einem höheren Durchschnittsalter beim Zeitpunkt der Diagnosestellung korreliert (BRONSVELD et al. 2001; HIRTZ et al. 2004). Andere Autoren bezweifeln das Vorhandensein  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbarer  $\text{Cl}^-$ -Kanäle im CF-Dünn- und Dickdarmepithel des Menschen (BERSCHNEIDER et al. 1988; TAYLOR et al. 1988; ANDERSON u. WELSH 1991; HARDTCASTLE et al. 1991; O'LOUGHLIN et al. 1991; GOLDSTEIN et al. 1994). Einige Untersuchungen legen nahe, dass die intestinale  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im gesunden Darmepithel vermutlich größtenteils CFTR-vermittelt ist (BÖHME et al. 1991; MALL et al. 1998). Auch für CF-Mäuse wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit einer  $\text{Cl}^-$ -Sekretion kontrovers diskutiert. In einigen Untersuchungen konnte keine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Darm von CF-Tieren, sondern nur in Wildtyp-Mäusen detektiert werden (CLARKE et al. 1994; CUTHBERT et al. 1994; GRUBB 1997).

In einer Studie an den drei genetischen Hintergründen BALB/cJ, C57BL/6J und DBA/2J mit der Mutation  $cftr^{\text{tm1Hsc}}$  (Disruption von Exon1) wurden große Unterschiede hinsichtlich der Sterblichkeit infolge intestinaler Komplikationen beobachtet (ROZMAHEL et al. 1996). Dabei konnten Mäuse des Stammes DBA/2J zu 92% den Klasse I-Tieren zugeordnet werden, die wenige Tage nach der Geburt versterben, während die beiden anderen Stämme 24-30% an Klasse III-Tieren aufwiesen (Überleben länger als 6 Wochen). Im ausgekreuzten Hintergrund CD1x129/SV wurde bei den Klasse III-Mäusen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in den

Ileumkryptzellen detektiert, die nicht im Wildtyp vorhanden war. Eine ähnliche Studie wurde später an BALB/cJ-CF-Mäusen im Vergleich mit einer ausgekreuzten Mauspopulation durchgeführt, wobei untersucht wurde, ob ein Zusammenhang zwischen dem phänotypischen Klassifizierungsmuster und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit besteht (GYÖMÖREY et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare  $\text{Cl}^-$ -Restleitfähigkeit mit einer längeren Überlebenszeit korreliert war, jedoch war diese nicht DIDS-sensitiv. In einer anderen Studie, in der die *cftr*<sup>tm1Unc</sup>-Mutation (Disruption von Exon 10; schwerer Phänotyp) mit der *cftr*<sup>tm1Hsc</sup>-Mutation (milder Phänotyp) verglichen wurde, konnte bei den geringgradig betroffenen Tieren eine stärker ausgeprägte basale  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit detektiert werden, die jedoch nicht  $\text{Ca}^{2+}$ - oder cAMP-aktivierbar war (GYÖMÖREY et al. 2001). Andere Autoren beschreiben eine  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare, DIDS-sensitive  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in Klasse III-Mäusen (*cftr*<sup>tm1Hsc</sup>, *cftr*<sup>tm1Unc</sup>) die mit einem milden Phänotyp korreliert ist (WILSCHANSKI et al. 1996) und die sowohl im Nasen- als auch im Rektumepithel der CF-Tiere im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert war. Die von der *cftr*<sup>TgH(neoim)1Hgu</sup>-Mutation betroffenen Mäuse zeigten einen milden Phänotyp und eine  $\text{Cl}^-$ -Restleitfähigkeit, die mit der Rest-Expression von Wildtyp-CFTR-Protein assoziiert war (SMITH et al. 1995). Die Mutationen *cftr*<sup>tm1Hsc</sup> und *cftr*<sup>tm1Unc</sup> führen jedoch zu einem kompletten Verlust an funktionellem CFTR-Protein. Die Klasse III-Mäuse müssen also eine eigenständige  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit, unabhängig vom CFTR-Kanal, im Darm besitzen.