

### 3 Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse der Zystischen-Fibrose-Forschung weisen zahlreiche Ergebnisse auf eine zentrale Bedeutung von modifizierenden Genen bei der Pathogenese der Erkrankung hin, die außerhalb des *cftr*-Locus gelegen sind. Als Beispiele sind hier besonders hervorzuheben: 1.) Dass die phänotypischen Daten von homozygoten Zwillingspatienten mit derselben *cftr*-Mutation sich deutlich ähnlicher sind als die von Geschwistern mit derselben *cftr*-Mutation (BRONSVELD et al. 2000; BRONSVELD et al. 2001), 2.) dass trotz eines identischen zellulären Verteilungsmusters des CFTR-Kanals bei Maus und Mensch ein starker Interspezies-Unterschied hinsichtlich der Organmanifestation der Erkrankung existiert (CLARKE et al. 1994; KENT et al. 1996; GRUBB u. BOUCHER 1999) und 3.) dass Mäuse, die dieselbe *cftr*-Mutation tragen, sehr unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund aufweisen (ROZMAHEL et al. 1996; KENT et al. 1997; CHUNG et al. 2001; HASTON et al. 2002). Aufgrund bisheriger elektrophysiologischer Daten (ANDERSON u. WELSH 1991; CLARKE et al. 1994; ROZMAHEL et al. 1996; WILSCHANSKY et al. 1996), mRNA-Expressionsanalysen (CHUNG et al. 2001) und kürzlich veröffentlichter Allelvariationsstudien mit Mikrosatellitenmarkern (RITZKA et al. 2004) gibt es zunehmend Hinweise, dass zumindest ein Teil dieser modifizierenden Einflüsse von Mitgliedern der CLCA-Genfamilie durch die Vermittlung einer alternativen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit vermittelt werden könnte.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass CLCA-mRNA und -Protein im Darm von Zystische Fibrose-Mäusen vermehrt exprimiert sein könnten, sofern diese Genfamilie tatsächlich als Vermittler einer alternativen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit fungiert. Ziel der Arbeit war es daher, mit kombinierten immunhistochemischen und quantitativen mRNA-Expressionsstudien eine eventuelle Heraufregulation der CLCA-Vertreter mCLCA1 bis mCLCA4 im Darm von CF-Mäusen unterschiedlicher genetischer Defekte und Stämme zu detektieren und damit einen Hinweis zu erhalten, ob der in elektrophysiologischen Studien beobachteten Ca<sup>2+</sup>-aktivierbaren Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit einer dieser vier murinen Vertreter zugrunde liegen könnte. Gleichzeitig sollte mit einer Quantifizierung der mCLCA3- und PAS-positiven Becherzellfraktion getestet werden, ob die mCLCA3-mRNA-Expression mit Zu- oder Abnahmen der Becherzellen zusammenhängt, oder ob sich die Syntheseleistung der Einzel-

zellen verändert. Außerdem wurden mit spezifischen immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von Apoptosen und Mitosen in Kombination mit der durchschnittlichen Erfassung der Darmepithelzellzahl die Zellturnoverrate der Darmepithelien 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.

Beim Menschen konnte kürzlich erstmals beschrieben werden, dass das Vorkommen bestimmter Mikrosatellitenallele im Bereich des *hclca1*-Locus mit einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Rektumepithel von CF-Patienten signifikant miteinander korreliert ist (RITZKA et al. 2004). Aufgrunddessen sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob in Analogie zu den Verhältnissen beim Menschen bestimmte genetische Hintergründe bei Mäusen mit bestimmten Allelvarianten des entsprechenden Orthologen bei der Maus, im *mclca3*-Gen, assoziiert sind. Dazu wurde der gesamte offene Leserahmen der mCLCA3-mRNA aller vier genetischen Hintergründe sequenziert und die mCLCA3-Sequenzen der einzelnen Stämme miteinander verglichen. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob Allelvariationen des mCLCA3-Proteins eine Rolle bei einer Modulatorfunktion der Zystischen Fibrose zukommen könnten.