

## 1 Einleitung

Die beiden Proteine eCLCA1 und mCLCA3 sind Mitglieder der kürzlich entdeckten CLCA (engl. *Chloride channel, Calcium-activated*)-Proteinfamilie. Diese Familie stellt eine funktionell und strukturell sehr komplexe Gruppe von Proteinen dar. Ihre Funktion besteht unter anderem in der Induktion einer Kalzium-aktivierten Chloridleitfähigkeit. Bislang sind 16 Mitglieder dieser Familie in fünf unterschiedlichen Spezies identifiziert worden. Sowohl mCLCA3, ein Vertreter bei der Maus, als auch sein orthologer Vertreter beim Pferd, eCLCA1, werden in Becherzellen exprimiert. Beide Vertreter haben offenbar eine große biomedizinische Relevanz bei Krankheiten mit gestörter sekretorischer Funktion, zum Beispiel als Modulator der Chloridleitfähigkeit bei zystischen Fibrose-Patienten und als Modulator der Schleimsekretion bei Asthma sowie bei der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis (COB) des Pferdes. Basierend auf vorläufigen proteinbiochemischen Untersuchungen ist zuerst ein vier- bis fünf-Transmembranmodell für die CLCA-Proteine aufgestellt worden. Dies ist mit einer Funktion der CLCA-Proteine als echte Kanäle vereinbar. Jedoch konnte mCLCA3 in immunhistochemischen und immuntransmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen neben einer membranassoziierten Lokalisation in Becherzellen auch frei im Darmschleim lokalisiert werden, was gegen ein Transmembranprotein sprechen würde.

Die vorliegende Arbeit nimmt mit eCLCA1 und mCLCA3 gezielt zwei Mitglieder der CLCA-Proteinfamilie in den Blick, die möglicherweise eine große biomedizinische Relevanz bei den oben genannten Krankheiten haben. Aus tiermedizinischer Sicht interessierte der Vertreter beim Pferd im Hinblick auf seine Relevanz zu COB sowie der Modellfunktion dieser Krankheit für das humane Asthma. Als Modellprotein wurde jedoch zunächst der orthologe Vertreter bei der Maus, mCLCA3, gewählt, da initial die weitaus besseren Nachweisreagenzien (Antikörper) vorlagen und auf zahlreiche frühere Ergebnisse experimentell aufgebaut werden konnte. Einige der Schlüsselexperimente wurden dann an der Zielspezies Pferd wiederholt. Dabei adressierte die Studie die Frage, ob es sich bei eCLCA1 und mCLCA3 um echte Transmembranproteine handelt, welche in der Lage sind, Poren für den Flux von Ionen durch die Plasmamembran zu bilden, oder ob eCLCA1 und mCLCA3 sezernierte Proteine sind. Dazu kamen umfangreiche proteinbiochemische Analysen in vier Arbeitsschritten zum Einsatz: Zuerst wurde mit Hilfe von unterschiedlichen Computer-Algorithmen die Aminosäuresequenz der Proteine nach möglichen Signalpeptidsequenzen, Transmembrandomänen und Glykosylierungsstelle durchgemustert. Danach wurden die

Transportkinetiken in der Zelle und im extrazellulären Raum nach heterologer Expression von mCLCA3 in Säugerzelllinien in *pulse chase*-Experimenten untersucht und das mCLCA3-Protein mittels Westernblotanalyse näher charakterisiert. Anschließend wurde unter Anwendung von konfokalen Fluoreszenz-Analysen mCLCA3 in transfizierten Zellen intrazellulär lokalisiert. Schließlich wurde das Glykosylierungsmuster der Proteine proteinbiochemisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass eCLCA1 und mCLCA3 sezernierte Proteine sind und somit keine echten Kanalproteine darstellen können. Dabei waren die Ergebnisse für die beiden orthologen Proteine beim Pferd und der Maus praktisch identisch. Damit leistet die Arbeit mit neuer Erkenntnis über die Struktur der Proteine einen entscheidenden Beitrag zum Überdenken und besseren Verständnis der Funktionsweise, wie eCLCA1 und mCLCA3 als Modulatoren der Chloridleitfähigkeit und der Schleimsekretion wirken könnten.

.