

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Forschungsstand	4
2.1 Die CLCA (<i>chloride channel regulators, calcium-activated</i>) - Familie	4
2.1.1 Proteinstruktur und Proteinprozessierung	5
2.1.2 Expressionsvielfalt der CLCA-Proteine	7
2.1.3 Funktionsdiversität der CLCA-Proteine	10
2.1.3.1 Die Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit der CLCA-Proteine	10
2.1.3.2 Eigenständige Chloridkanäle oder Modulatoren von Chloridkanälen?	11
2.1.3.3 Funktion als Adressine	11
2.1.3.4 Funktion als Apoptoseregulatoren	12
2.1.4 Biomedizinische Relevanz der CLCA-Proteine	13
2.1.4.1 Rolle der CLCA bei der Zystischen Fibrose	14
2.1.4.2 Rolle der CLCA beim Asthma	17
2.1.4.3 Rolle der CLCA bei der recurrent airway obstruction (RAO) des Pferdes ..	18
2.1.5 Die porzinen CLCA-Homologen	19
2.1.5.1 Charakterisierung der porzinen CLCA-Genomstruktur	19
2.1.5.2 pCLCA1	21
2.2 Bedeutung von Tiermodellen in der translationalen Forschung	22
2.2.1 Bislang verwendete Tiermodelle in der Zystische Fibrose-Forschung	23
2.2.2 Das Schweine-Modell in der Zystische Fibrose-Forschung	27
3 Material und Methoden	31
3.1 Erstellung eines phylogenetischen Baumes	31
3.2 <i>In silico</i> -Analysen zur Vorhersage der Signalpeptidsequenz, Transmembran- domänen und Glykosylierungsstellen	31
3.3 Untersuchungsmaterial und Probengewinnung	32
3.4 Generierung spezifischer Antikörper gegen pCLCA4a	33

3.5	Probenaufbereitung für nachfolgende Untersuchungen.....	34
3.5.1	Paraffineinbettung und Herstellung von Gewebeschnitten	34
3.5.2	Anfertigung von Kryostatschnitten.....	35
3.5.3	Aufbereitung der Proben für molekularbiologische Untersuchungen	35
3.5.3.1	Allgemeine Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen	35
3.5.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	35
3.5.3.3	Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA	36
3.5.4	Herstellung von Organlysaten und Ermittlung der Proteinkonzentrationen	37
3.6	Polymerase-Kettenreaktion zum organspezifischen Nachweis von pCLCA4a auf RNA-Ebene und zur Amplifizierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a.....	38
3.7	Klonierung des Offenen Leserahmens von pCLCA4a in den Vektor pcDNA3.1(+)	41
3.7.1	Differenzierung zu pCLCA4b	47
3.8	Gewinnung von spezifischem Protein nach heterologer Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem pCLCA4a-Plasmid.....	48
3.8.1	Zellyse und Gewinnung des Proteins mittels Immunopräzipitation	50
3.8.2	Gewinnung des Proteins mittels Ethanolpräzipitation aus dem Zellkultur- überstand sowie Zellyse.....	51
3.9	Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese	52
3.10	Westernblotanalyse.....	53
3.11	Bestimmung des Glykosylierungsmusters	55
3.12	Laser Capture Microdissection zur Proteomanalyse.....	55
3.13	Immunhistochemischer Nachweis des pCLCA4a-Proteins	57
3.14	Allgemein verwendete Puffer, Lösungen und Chemikalien	59
4	Ergebnisse	62
4.1	Phylogenetische Einordnung.....	62
4.2	Die pCLCA4a-Proteinstruktur nach <i>in silico</i> -Analysen	63
4.2.1	Potenzielle Signalsequenzen	63
4.2.2	Potenzielle Transmembrandomänen.....	64

4.2.3	Potenzielle Asparagin-Glykosylierungsstellen und die mutmaßliche Spaltstelle	66
4.3	Das gewebliche mRNA-Expressionsmuster von pCLCA4a	67
4.4	Die Sequenz des Offenen Leserahmens von pCLCA4a	70
4.5	Proteinbiochemische Charakteristika von pCLCA4a.....	70
4.5.1	Kriterien der Antikörpergenerierung	70
4.5.2	Detektion des amino-terminalen und des carboxy-terminalen Spaltprodukts von pCLCA4a in Zelllysat und Zellkulturüberstand sowie Nachweis der posttranslationalen Spaltung.....	71
4.6	Die gewebliche Verteilung von pCLCA4a in den Organen des Schweins	73
4.7	Das Asparagin-Glykosylierungsmuster von pCLCA4a.....	77
4.8	Zelluläres Expressionsmuster des pCLCA4a-Proteins	80
5	Diskussion	85
6	Zusammenfassung	98
7	Summary	100
8	Abbildungsverzeichnis.....	102
9	Tabellenverzeichnis.....	104
10	Literaturverzeichnis.....	105
	Publikationsverzeichnis	123
	Danksagung.....	124
	Eidesstattliche Erklärung	125