

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Zystische Fibrose (CF)	3
2.1.1	Pathologische Veränderungen bei Jugendlichen und Erwachsenen mit CF	3
2.1.2	Pathologische Veränderungen bei Neugeborenen und Säuglingen mit CF	5
2.1.3	Strukturelle Veränderungen des unteren Respirationstrakts bei Feten, Neugeborenen und Säuglingen mit CF	7
2.2	<i>Der Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> CFTR	8
2.2.1	Funktion von CFTR als Ionenkanal	8
2.2.2	Einfluss von CFTR auf andere Ionenkanäle	8
2.2.3	Einfluss des Ionentransports auf den Mukus des Respirationstraktes	9
2.2.4	Einfluss des Ionentransports auf die Mukusschicht des Dickdarms	10
2.2.5	Expressionsmuster von <i>CFTR</i> beim Menschen.....	11
2.2.6	Expressionsmuster von <i>CFTR</i> bei der Organentwicklung des unteren Respirationstraktes und des Darms beim Menschen.....	12
2.2.6.1	Organentwicklung der Lunge.....	12
2.2.6.2	Organentwicklung des Intestinaltrakts	13
2.2.6.3	Pränatale Expression von humanem <i>CFTR</i> im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm	14
2.3	Pathogenese der CF im Zusammenhang mit CFTR und dem epithelialen Natriumkanal ENaC	16
2.3.1	Mutation des <i>CFTR</i> -Gens	16
2.3.2	Auswirkung der <i>CFTR</i> -Mutation auf die Klinik der CF.....	18
2.3.3	Pathophysiologie der CF in den luftführenden Wegen.....	19
2.3.4	Pathophysiologie der CF im Darm.....	20
2.3.5	ENaC und CF – eine kontroverse Diskussion.....	20
2.4	Therapieansätze der CF.....	21

2.4.1	Mutationsunabhängige, symptomatische Behandlung der Lungenerkrankungen bei CF	22
2.4.2	Mutationsspezifische Behandlung der Lungenerkrankungen bei CF durch CFTR-Modulatoren	22
2.4.3	Gentherapie der CF	25
2.4.4	Weitere Therapieansätze	25
2.4.5	Soziale Aspekte bei der Therapie der CF	26
2.5	Tiermodelle für CF	27
2.5.1	CF-Mausmodelle	28
2.5.2	CF-Schweinemodelle	29
2.6	CFTR und seine mögliche Rolle in der Organentwicklung des Respirationstrakts	31
3	Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsaufbau	33
4	Material und Methoden	35
4.1	Studiendesign und Tiere	35
4.2	Eigenschaften der RNA und Extraktion der totalRNA	37
4.3	Konzentrationsmessung der totalRNA	39
4.4	Qualitative Kontrolle der totalRNA	40
4.5	Reverse Transkription der totalRNA zu cDNA	40
4.6	Funktionsweise der PCR und RT-qPCR	41
4.7	Primer Design	43
4.8	Etablierung der Primersysteme	47
4.8.1	Schmelzkurvenanalyse mittels SYBR-Green RT-qPCR	47
4.8.2	Aufreinigung des RT-qPCR Produktes	48
4.8.3	Sequenzierung des RT-qPCR Produktes	49
4.8.4	Funktionstest der Sonden und Ausschluss von Kreuzreaktion mit genomischer DNA	49
4.8.5	Erstellen einer cDNA-Verdünnungsreihe	51
4.8.6	Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur	52

4.8.7	Test auf Effizienz der RT-qPCR mittels Taqman-RT-qPCR mit Verdünnungsreihe.....	53
4.9	Messung des gewebespezifischen Expressionslevels von <i>pCFTR</i> und <i>pSCNN1B</i>	54
4.10	Ermittlung der stabilsten <i>housekeeping</i> Gene mittels GeNorm.....	54
4.11	Statistische Auswertung der mRNA-Expression	55
4.12	Anfertigung von Paraffinblöcken aus den formalinfixierten Gewebeproben	56
4.13	Anfertigung von Leerschnittpräparaten.....	57
4.14	Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte.....	58
4.15	Funktionsweise der Immunhistochemie.....	59
4.16	Immunhistologische Färbung	60
4.17	Auswertung der immunhistologischen Schnittpräparate	64
5	Untersuchungsergebnisse	65
5.1	Ct-Werte der einzelnen Gene in den untersuchten Proben	65
5.2	Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene in der Trachea.....	71
5.3	Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene in der Lunge.....	75
5.4	Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene im Dickdarm.....	79
5.5	Zelluläre Lokalisation des pCFTR-Proteins	81
6	Diskussion.....	84
6.1	Vergleich der prä- und postnatalen zeit- und gewebeabhängigen Expression von pCFTR und hCFTR im Respirationstrakt und Dickdarm.....	85
6.1.1	Expressionsmuster von pCFTR in der Trachea im Vergleich zu hCFTR.....	85
6.1.2	Expressionsmuster von pCFTR in der Lunge im Vergleich zu hCFTR.....	86
6.1.3	Expressionsmuster von pCFTR im Dickdarm im Vergleich zu hCFTR.....	89
6.1.4	Zusammenfassender Vergleich der pCFTR-Expression in der pränatalen Entwicklung mit dem hCFTR im Respirationstrakt und im Dickdarm	90
6.2	Vergleich der prä- und postnatalen zeit- und gewebeabhängigen Expression von pENaC im Vergleich zu hENaC	92

6.3	Zusammenhänge zwischen der Expression der untersuchten Gene und der Organentwicklung im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm.....	94
6.4	Methodenkritik.....	97
6.5	Ausblick.....	98
7	Zusammenfassung.....	101
8	Summary.....	103
9	Abbildungsverzeichnis	105
10	Tabellenverzeichnis	106
11	Literaturverzeichnis	108
12	Anhang.....	128
12.1	Alter, Größe, Gewicht und Konservierungstechnik der verwendeten Tiere	128
12.2	Verwendete Chemikalien und Geräte sowie deren Hersteller	130
13	Publikationsliste.....	134
14	Finanzielle Förderung	135
15	Danksagung	136
16	Selbstständigkeitserklärung	137