

# 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	Der <i>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 CFTR 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
<b>3</b>	<b>Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsaufbau .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
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
<b>5</b>	<b>Untersuchungsergebnisse .....</b>	<b>65</b>
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
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
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	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
8	<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
9	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
10	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
11	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
12	<b>Anhang.....</b>	<b>128</b>
12.1	Alter, Größe, Gewicht und Konservierungstechnik der verwendeten Tiere ....	128
12.2	Verwendete Chemikalien und Geräte sowie deren Hersteller.....	130
13	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>134</b>
14	<b>Finanzielle Förderung .....</b>	<b>135</b>
15	<b>Danksagung .....</b>	<b>136</b>
16	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>137</b>