

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Phänotypisierung der alternden *Ctca1*-Knockout-Maus

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Kristina Dietert, Ph.D., geb. Siegert**  
Tierärztin aus Potsdam

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4186







Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

---

## **Phänotypisierung der alternden *C/ica1*-Knockout-Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Kristina Dietert, Ph.D., geb. Siegert**  
Tierärztin aus Potsdam

**Berlin 2020**  
Journal-Nr.: 4186

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):  
mice, animal models, aging, phenotypes, transgenetic animals, immunity, neoplasm,  
histopathology, haematology, pathology

Tag der Promotion: 21.01.2020

*Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-036-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin  
**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Für Raik und Lisa*



# Inhalt

---

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Die CLCA-Proteinfamilie.....	2
2.2 Das CLCA1-Protein .....	4
2.2.1 Expressionsmuster bei Mensch und Maus .....	4
2.2.2 Rolle von CLCA1 bei Erkrankungen .....	5
2.2.3 Mögliche Funktionen von CLCA1 .....	7
2.3 <i>Clca1</i> -Knockout-Modelle .....	8
2.3.1 <i>Clca1</i> -Knockout-Modell nach Long .....	8
2.3.2 <i>Clca1</i> -Knockout-Modell nach Robichaud .....	9
2.3.3 <i>Clca1</i> -Knockout-Modell nach Patel.....	9
2.4 Die Phänotypisierung von genetisch veränderten Mauslinien .....	15
2.4.1 Die Belastungsbeurteilung von genetisch veränderten Mauslinien .....	16
2.4.2 Die Belastungsbeurteilung der <i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> -Maus.....	18
2.5 Die Phänotypisierung der alternden Maus .....	18
2.5.1 Querschnitts-Studien (engl. <i>cross-sectional studies</i> ) .....	19
2.5.2 Longitudinale Studien (engl. <i>longitudinal studies</i> ).....	20
2.5.3 Die Bedeutung der pathologischen Untersuchung für Altersstudien .....	21
2.5.4 Pathologien der C57BL/6-Maus in bisherigen Altersstudien .....	21
3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung.....	24
4 Material und Methoden .....	25
4.1 Studiendesign.....	25
4.2 Versuchstiere .....	25
4.2.1 Genotypen.....	25
4.2.1 Genotypisierung .....	26
4.2.2 Haltungsbedingungen.....	29

## INHALT

4.3	Präparation der Tiere und Probenentnahme.....	30
4.3.1	Tötung, Präparation und Blutentnahme .....	30
4.3.2	Hämatologie .....	31
4.3.3	Klinische Chemie.....	32
4.3.4	Organentnahme .....	32
4.3.5	Bestimmung der Organgewichte.....	33
4.4	Histopathologische Untersuchung .....	33
4.4.1	Fixierung der Proben .....	33
4.4.2	Zuschnitt und Entkalkung der Proben .....	34
4.4.3	Entwässerung und Einbettung der Proben .....	35
4.4.4	Anfertigung der Schnittpräparate .....	36
4.4.5	Färbung und Eindecken der Schnittpräparate.....	36
4.4.6	Digitalisierung der Schnittpräparate.....	37
4.4.7	Histopathologische Auswertung der Schnittpräparate.....	39
4.5	Statistische Auswertung .....	40
5	Ergebnisse .....	41
5.1	Tatsächliche Gruppengrößen .....	41
5.2	„Systemisch“ erkrankte versus „nicht-systemisch“ erkrankte Tiere .....	41
5.3	Einfluss des Genotyps auf das Körpergewicht.....	44
5.3.1	Adulte Mäuse .....	44
5.3.2	Mittelalte Mäuse .....	44
5.3.3	Alte Mäuse .....	45
5.3.4	Sehr alte Mäuse .....	45
5.3.5	Entwicklung der Körpergewichte im zeitlichen Verlauf .....	45
5.4	Einfluss des Genotyps auf das Organgewicht .....	46
5.4.1	Gehirngewichte, vergleichend .....	46
5.4.2	Herzgewichte, vergleichend.....	47
5.4.3	Lebergewichte, vergleichend .....	48
5.4.4	Nierengewichte, vergleichend.....	49

5.4.5	Milzgewichte, vergleichend.....	50
5.5	Einfluss des Genotyps auf die Hämatologie .....	50
5.6	Einfluss des Genotyps auf die klinische Chemie.....	52
5.7	Einfluss des Genotyps auf pathologische Veränderungen.....	56
5.7.1	„Nicht-altersassoziierte“ Pathologien .....	57
5.7.2	„Altersassoziierte“ Pathologien .....	60
5.7.3	Tumorerkrankungen .....	67
6	Diskussion.....	74
6.1	Klinische Untersuchung.....	76
6.2	Pathologische Untersuchung.....	77
6.2.1	„Nicht-altersassoziierte“, pathologische Veränderungen.....	79
6.2.2	„Altersassoziierte“, pathologische Veränderungen.....	81
6.2.3	Tumorerkrankungen .....	84
6.3	Hat das Fehlen des CLCA1-Proteins einen Einfluss auf altersassoziierte, pathologische Veränderungen?.....	87
6.3.1	Die mögliche Rolle des CLCA1-Proteins bei Entzündungen .....	89
6.3.2	Die mögliche Rolle des CLCA1-Proteins bei Tumorerkrankungen .....	89
6.4	Zeigt die alternde <i>Clca1<sup>-/-</sup></i> - Maus einen Phänotyp? .....	91
6.5	Methodenkritik .....	92
6.6	Ausblick auf mögliche weiterführende Arbeiten .....	92
7	Zusammenfassung.....	94
8	Summary.....	96
9	Abbildungsverzeichnis.....	98
10	Tabellenverzeichnis.....	100
11	Literaturverzeichnis .....	102
12	Anhang.....	118
12.1	Zusammenstellung der detaillierten Untersuchungsergebnisse .....	118
12.1.1	Deskriptive Statistik der Körper- und Organgewichte vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten .....	119

## INHALT

12.1.2	Deskriptive Statistik der Hämatologie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten.....	120
12.1.3	Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere.....	121
12.1.4	Deskriptive Statistik der klinischen Chemie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten.....	125
12.1.5	Graphische Darstellung der klinischen Chemie aller Tiere.....	126
12.1.6	Zusammenfassung der pathologischen Befunde aller untersuchten Tiere .....	129
12.1.7	Zusammenfassung der Schweregrade ausgewählter pathologischer Veränderungen.....	134
	<b>Danksagungen.....</b>	<b>136</b>
	Selbstständigkeitserklärung.....	137

## Abkürzungsverzeichnis

---

3R	engl. <i>Replace, Reduce, Refine</i>
Abb.	<b>Abbildung</b>
ALT	<b>Alanin-Aminotransferase</b>
AMP	engl. <i>Acidophilic Macrophage Pneumonia</i>
AP	<b>Alkalische Phosphatase</b>
AST	<b>Aspartat-Aminotransferase</b>
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BALF	<b>Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit</b>
BfR	<b>Bundesinstitut für Risikobewertung</b>
B6, B6J, B6N	<b>C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6N</b>
Bp	<b>Basenpaare</b>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat, engl. <i>cyclic Adenosinemonophosphate</i>
CF	Zystische Fibrose, engl. <i>Cystic Fibrosis</i>
CFTR	engl. <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
<i>C. rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>
CK	<b>Creatinkinase</b>
CLCA	engl. <i>Chloride channel regulator, Calcium-activated</i> (Protein)
<i>Clca1</i>	engl. <i>Chloride channel regulator, Calcium-activated</i> (Gen)
<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Clca1</i> -Knockout
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, engl. <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
c-terminal	carboxy-terminal
CXCL	<b>CXC-Motiv Ligand</b>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <b>Desoxyribonucleic Acid</b>
DSS	Dextran-Natriumsulfat, engl. <i>Dextran-Sodiumsulfat</i>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
FELASA	engl. <b>Federation of European Laboratory Animal Science Association</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FEM	<b>F</b> orschungseinrichtung für <b>E</b> xperimentelle <b>M</b> edizin
FnIII	<b>F</b> ibronektin Typ-III
FU	<b>F</b> reie <b>U</b> niversität
GEH	<b>G</b> landulärzystische, endometriale <b>H</b> yperplasie
GLDH	<b>G</b> lutamatdehydrogenase
GT	<b>G</b> enotyp
<i>H. billis</i>	<i><b>H</b>elicobacter <b>b</b>illis</i>
<i>H. hepaticus</i>	<i><b>H</b>elicobacter <b>h</b>epaticus</i>
HE	<b>H</b> ämalaun- <b>E</b> osin
IL	<b>I</b> nterleukin
IMSR	engl. <i><b>I</b>nternational <b>M</b>ouse <b>S</b>train <b>R</b>esources</i>
kDa	<b>K</b> ilodalton
KGW	<b>K</b> örpergewicht
KO	<b>K</b> nockout
KRK	<b>K</b> olorektalkarzinom
LaGeSo	<b>L</b> andesamt für <b>G</b> esundheit und <b>S</b> oziales
LM	<b>L</b> ebensmonat
LPS	<b>L</b> ipopolysaccharid
LTA	<b>L</b> ipoteichoic <b>A</b> cid
<i>M. tuberculosis</i>	<i><b>M</b>ycobacterium <b>t</b>uberculosis</i>
mBSA	<b>m</b> ethyliertes, <b>b</b> ovines <b>S</b> erumalbumin
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, engl. <i><b>M</b>ean <b>C</b>orpuscular <b>H</b>emoglobin</i>
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, engl. <i><b>M</b>ean <b>C</b>orpuscular <b>H</b>emoglobin <b>C</b>oncentration</i>
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen, engl. <i><b>M</b>ean <b>C</b>orpuscular <b>V</b>olume</i>
MGI	engl. <i><b>M</b>ouse <b>G</b>enome <b>I</b>nformatics</i>
MIDAS	Metallionen-abhängige Adhäsionsseite, engl. <i><b>M</b>etall <b>I</b>on-<b>d</b>ependent <b>A</b>dhesion <b>S</b>ite</i>
MNV	<b>M</b> urines <b>N</b> orovirus

MPD	engl. <b>Mouse Phenome Database</b>
mRNA	engl. <b>messenger Ribonucleic Acid</b>
MUC	engl. <b>Mucin</b>
n	Anzahl
NACAD	engl. <b>North America Control Animal Database</b>
NIH	engl. <b>National Institute of Health</b>
n-terminal	amino-terminal
OECD	engl. <b>Organisation for Economic Cooperation and Development</b>
OGW	<b>Organgewicht</b>
OVA	<b>Ovalbumin</b>
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion, engl. <b>Periodic acid-Schiff reaction</b>
PCR	engl. <b>Polymerase Chain Reaction</b>
PT	<b>Phänotyp</b>
RBC	Erythrozyten, engl. <b>Red Blood Cells</b>
RITA	engl. <b>Registry of Industrial Toxicology Animal-data</b>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <b>Ribonucleic Acid</b>
<i>S. aureus</i>	<b>Staphylokokkus aureus</b>
SD	Standardabweichung, engl. <b>Standarddeviation</b>
siRNA	engl. <b>small interfering Ribonucleic Acid</b>
SPF	<b>Spezifiziert pathogenfrei</b>
spp.	<b>Subspezies</b>
Tab.	<b>Tabelle</b>
TBE	<b>Tris-Borat-EDTA</b>
Th2	<b>T-Helfer 2</b>
TLR	engl. <b>Toll Like Receptor</b>
TP	<b>Totalprotein</b>
V. cava caudalis	<b>Vena cava caudalis</b>
VWA	<b>von-Willebrand-Faktor-Typ-A</b>
WBC	Leukozyten, engl. <b>White Blood Cells</b>
WT	<b>Wildtyp</b>



# 1 Einleitung

---

Die CLCA-Proteinfamilie (engl. *chloride channel regulator, calcium-activated*) ist bereits seit fast 30 Jahren Forschungsschwerpunkt verschiedener Arbeitsgruppen weltweit. Dabei macht sie ihr komplexer, biochemischer Aufbau mit vielen multifunktionalen Domänen sowie ihr weites Expressionspektrum in über 30 Spezies einzigartig. Ihr bislang am besten charakterisierter Vertreter, CLCA1, wird von Mukuszellen, insbesondere des Respirations- und Intestinaltraktes, vollständig sezerniert und konnte bisher beim Menschen und bei der Maus mit vielen verschiedenen Funktionen, wie z.B. als Strukturprotein, als Signalmolekül oder als Tumormarker sowie mit relevanten, humanmedizinischen Erkrankungen, wie der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose), dem Asthma oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung, in Verbindung gebracht werden.

Genetisch veränderte Mauslinien stellen zum Teil exzellente Modelle sowohl für die menschliche Physiologie als auch für deren Erkrankungen dar. So wurden auch für das *Clca1*-Gen Knockout-Modelle (hier kurz: *Clca1*<sup>-/-</sup>) generiert, um die funktionelle Rolle des CLCA1-Proteins noch genauer aufklären zu können. Bisher konnten für diese *Clca1*<sup>-/-</sup>-Modelle im naiven Zustand und unter höchsten Hygienestandards keine Unterschiede zu den Wildtyptieren, also kein Phänotyp, beschrieben werden. Jedoch zeigten die *Clca1*<sup>-/-</sup>- Mäuse nach Stimulation mit unterschiedlichen Entzündungsreizen, wie z.B. in Form einer bakteriellen Lungeninfektion oder einer durch Dextran-Natriumsulfat-induzierten Colitis, einen vorrangig immunmodulatorischen Phänotyp. Bislang wurden alle experimentellen Untersuchungen an diesen Mäusen im jung-adulten Alter von 6-16 Wochen durchgeführt.

Das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin hält und züchtet seit 2006 *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die bereits bis zu einem Alter von 9 Monaten tierschutzrechtlich als genetisch veränderte Mauslinie „ohne belastenden Phänotyp“ eingestuft wurden. Ältere Mäuse entwickeln jedoch über die Zeit eine Reihe von pathophysiologischen Veränderungen als Teil des natürlichen Alterungsprozesses, wie z.B. das Auftreten von Tumoren oder degenerativen Erkrankungen. Bisher wurde die Rolle des CLCA1-Proteins bei solchen „natürlichen“ Krankheitsprozessen nicht untersucht. Ferner ist bislang nicht geklärt, ob und in welcher Form das Fehlen des CLCA1-Proteins Auswirkungen auf das Altern *per se*, auf die Lebenszeit oder die Entwicklung von alterstypischen, pathologischen Veränderungen hat. Daher wird in dieser Studie der Einfluss des Fehlens des CLCA1-Proteins auf den Alterungsprozess untersucht und die alternde *Clca1*<sup>-/-</sup>- Maus umfassend phänotypisiert.

## 2 Literaturübersicht

---

### 2.1 Die CLCA-Proteinfamilie

Vor fast 30 Jahren wurden die ersten beiden Mitglieder der CLCA-Familie, engl. „*chloride channel regulator, calcium-activated*“, nahezu zeitgleich von zwei unabhängigen Forschergruppen beim Rind entdeckt. Beiden Proteinen wurden zu dieser Zeit schon unabhängige Funktionen zugesprochen. Während Ran und Benos 1991 nach Isolation des Proteins aus der bovinen Trachea einen Modulator der Calcium-abhängigen Chloridleitfähigkeit vermuteten (Ran and Benos 1991; Ran and Benos 1992), entdeckte die andere Arbeitsgruppe ein lungenspezifisches, endotheliales Zell-Adhäsionsmolekül (Zhu et al. 1991). Seit diesen ersten Beschreibungen beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit dieser nun immer komplexer werdenden Genfamilie. Bis jetzt konnten bis zu je acht CLCA-Familienmitglieder in über 30 verschiedenen Spezies entdeckt werden (Wheeler et al. 2008). Hierzu zählen vor allem die vier Vertreter des Menschen sowie die acht Vertreter der Maus neben zahlreichen weiteren. Allen diesen Vertretern ist ein sehr breites und Zelltyp- bzw. Spezies-spezifisches Expressionmuster gemein (Patel et al. 2009). So wird z.B. CLCA2 mit deutlichen Unterschieden zwischen Mensch und Maus in verhornten Plattenepithelien verschiedener Organe sowie in einer spezifischen Zellnische im Respirationstrakt exprimiert.

Anfangs wurden die einzelnen Vertreter nach der Spezies, in der sie entdeckt wurden, sowie nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt. Damit kam es durchaus vor, dass dieselben Orthologen in unterschiedlichen Spezies, wie z.B. humanes CLCA1 und murines CLCA3, auch unterschiedlich nummeriert waren, was mitunter zu großen Verwirrungen führte. Im Jahre 2015 wurde die Nomenklatur durch das „Mouse Genome Nomenclature Committee (MGNC)“, im Einklang mit dem „Human Genome Nomenclature Committee (HUGO)“ und der „Rat Genome Database (RGD)“, revidiert und durch *Erickson et al.* publiziert (Erickson et al. 2015). Die jeweils orthologen Proteine der unterschiedlichen Spezies wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologien in Gruppen zusammengefasst (Song et al. 2012; Winpenny et al. 2009). Die Gruppen der humanen und murinen Vertreter sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Nomenklatur und Eingruppierung der orthologen Gene von Mensch und Maus

Spezies	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Mensch	<i>CLCA1</i>	<i>CLCA2</i>	<i>CLCA3P</i>	<i>CLCA4</i>
Maus	<i>Clca1</i>	<i>Clca2</i>	<i>Clca3a1</i>	<i>Clca4a</i>
			<i>Clca3a2</i>	<i>Clca4b</i>
			<i>Clca3b</i>	<i>Clca4c</i>

Quelle: Mouse Genome Nomenclature Committee, Erickson et al. 2015, CLCA = chloride channel regulator, calcium activated; P = Pseudogen

Allen bisher biochemisch untersuchten CLCA-Proteinen gemein ist deren post-translationale Spaltung des ca. 140 kDa großen Precursor-Proteins in ein größeres, amino (n)-terminales Produkt von ca. 90 kDa und ein kleineres, carboxy (c)-terminales Produkt von ca. 40 kDa Größe (Gruber et al. 1998b; Gruber and Pauli 1999; Mundhenk et al. 2006). Abhängig vom jeweiligen Vertreter werden die jeweiligen Untereinheiten entweder als lösliches Heterodimer vollständig sezerniert, wie z.B. bei CLCA1 (Gibson et al. 2005; Mundhenk et al. 2006), oder aber nur das n-terminale Spaltprodukt wird sezerniert, während das c-terminale Spaltprodukt mittels einer Transmembrandomäne oder mit Hilfe eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers mit der Plasmamembran assoziiert bleibt (Braun et al. 2010; Elble et al. 2006), wie z.B. bei CLCA2.

Alle CLCA-Proteine weisen im n-terminalen Bereich eine hochkonservierte Cystein-reiche Domäne auf (Gruber and Pauli 1999). Diese Region wiederum beinhaltet eine Zink-abhängige Metalloprotease-Domäne (Pawlowski et al. 2006), die für die autokatalytische, posttranslationale Spaltung des Precursor-Proteins verantwortlich zu sein scheint. Experimentell konnte dies bereits für das murine CLCA1 gezeigt werden (Bothe et al. 2011). In unmittelbarer Nähe des Cystein-reichen Bereiches findet sich eine von-Willebrand-Faktor-TypA-Domäne (VWA), die mit ihrer Metallionen-abhängigen Adhäsionsseite (metal ion-dependent adhesion site, MIDAS) dafür bekannt ist, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Whittaker and Hynes 2002). Die MIDAS ist bei allen CLCA-Proteinen, außer bei CLCA2 (Patel et al. 2006), zu finden. CLCA2 weist stattdessen ein  $\beta$ 4-Integrin Bindungsmotiv auf (Abdel-Ghany et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2001; Abdel-Ghany et al. 2002), welches wiederum auch bei anderen Vertretern der CLCA-Familie zu finden ist. Das c-terminale Spaltprodukt weist eine Fibronectin-Typ-III (FnIII)-Domäne auf, die wiederum für Protein-Protein-Interaktionen der Immunglobulin-Superfamilie (Patel et al. 2009) beschrieben ist. Demnach könnte man vermuten, dass auch

## LITERATURÜBERSICHT

CLCA-Proteine zur Interaktion mit anderen Proteinen, z.B. als Signalmolekül (Patel et al. 2006), befähigt sein könnten.

### **2.2 Das CLCA1-Protein**

#### **2.2.1 Expressionsmuster bei Mensch und Maus**

Das CLCA1-Protein ist der am besten charakterisierte und am häufigsten untersuchte Vertreter der CLCA-Familie. Sowohl das murine (Leverkoehne and Gruber 2002) als auch das humane (Gruber et al. 1998a) CLCA1-Protein werden in Muzin-produzierenden Zellen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes sowie des Reproduktionstraktes exprimiert. In weiteren mukuszellhaltigen Organen der Maus, wie z.B. der Gallenblase, dem Pankreas, den Nieren, den Speicheldrüsen, der Milchdrüse oder der Prostata, konnte es bisher nicht nachgewiesen werden (Leverkoehne and Gruber 2002). Beide CLCA1-Spaltprodukte werden vollständig nach extrazellulär sezerniert (Gibson et al. 2005; Mundhenk et al. 2006) und sind im Darm mit der Muskusschicht des Darmepithels assoziiert (Leverkoehne and Gruber 2002).

Von allen beschriebenen Organen (Tab. 2) findet im Colon die stärkste Expression des CLCA1-Proteins bei Mensch und Maus statt (Gruber et al. 1998a; Johansson et al. 2008; Leverkoehne and Gruber 2002). Hier konnte das Protein ausschließlich in den luminalen Becherzellen beschrieben werden (Leverkoehne and Gruber 2002). In den Mukuszellen der Kryptenbasis wurde es interessanterweise nicht nachgewiesen. Aber auch in den weiteren Abschnitten des Dünn- und Dickdarms (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum) sowie im Magen (Nebenzellen) ist das CLCA1-Protein, wenn auch nicht in vergleichbaren Mengen, exprimiert (Leverkoehne and Gruber 2002).

Auch im Respirationstrakt wird das Protein von den Muzin-produzierenden Zellen nach extrazellulär sezerniert (Gibson et al. 2005; Leverkoehne and Gruber 2002; Mundhenk et al. 2006). Hier wurden die orthologen CLCA1-Proteine von Mensch und Maus ausschließlich in Mukuszellen der Trachea, der Hauptbronchien nahe der Bifurkation sowie in den submukosalen Drüsen der oberen Trachea beschrieben (Gaspar et al. 2000; Hauber et al. 2004; Hoshino et al. 2002; Komiya et al. 1999; Leverkoehne and Gruber 2002; Toda et al. 2002; Zhou et al. 2001).

Im Reproduktionstrakt der Maus konnte das CLCA1-Protein in den Mukuszellen des Uterusepithels identifiziert werden (Leverkoehne and Gruber 2002).

Neben diesem physiologischen Expressionsmuster konnte das CLCA1-Protein in relevanten respiratorischen Erkrankungen des Menschen, wie der Zystischen Fibrose (engl. *Cystic fibrosis*, CF oder auch Mukoviszidose), dem Asthma oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) (Brouillard et al. 2005; Hauber

et al. 2010; Hegab et al. 2004; Kamada et al. 2004; Patel et al. 2009; Zhou et al. 2001) sowie den dazu korrespondierenden Mausmodellen (Hauber et al. 2004; Hegab et al. 2004; Patel et al. 2009; Toda et al. 2002) sowohl auf m-RNA- als auch auf Proteinebene differentiell exprimiert vorgefunden werden.

*Tabelle 2: Expressionsmuster von humanem und murinem CLCA1*

Spezies	Organ/Gewebe	Methode
Mensch	Dünn- und Dickdarm	<i>In situ</i> -Hybridisierung, Northern Blot
	Magen, Darm, Uterus, Hoden, Niere, fetale Milz	RNA Dot Blot-Hybridisierung
Maus	Trachea, Magen, Darm, Uterus	<i>In situ</i> -Hybridisierung, Northern Blot
	Trachea, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm, Uterus	Immunhistochemie, Immunelektronenmikroskopie

*Quelle: Agnel et al. 1999, Gruber et al. 1998a, Komiya et al. 1999, Leverkusöhne and Gruber 2002, RNA = engl. Ribonucleic Acid*

### 2.2.2 Rolle von CLCA1 bei Erkrankungen

Erste Zusammenhänge zwischen den T-Helfer (Th)2-vermittelten, respiratorischen Erkrankungen mit einer erhöhten Mukusproduktion, wie CF, Asthma und COPD (Brouillard et al. 2005; Hauber et al. 2010; Hegab et al. 2004; Kamada et al. 2004), vorrangig vermittelt durch die Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-9 und IL-13 (Hauber et al. 2010; Zhou et al. 2001) und den CLCA-Proteinen, wurden aufgrund einer Überexpression verschiedener *Clca*-Gene in den betroffenen Atemwegen aufgestellt. Im Laufe der Zeit wurden vor allem das humane CLCA1-Protein sowie dessen murine Homologe CLCA1 und CLCA2 bezüglich ihrer möglichen Funktion bei der sekretorischen Dysfunktion und der Induktion einer Mukuszellmetaplasie als spezifische Eigenschaft dieser Erkrankung genauer charakterisiert (Long et al. 2006; Mundhenk et al. 2012; Nakanishi et al. 2001; Patel et al. 2006; Robichaud et al. 2005; Thai et al. 2005; Zhang and He 2010).

Diesen Erkrankungen gemein sind, neben einer Metaplasie und Hyperplasie der Mukuszellen, eine sekretorische Dysfunktion, die sich in einer exzessiven Mukushypersekretion widerspiegelt sowie eine gestörte mukoziliäre Clearance der Atemwege mit konsekutivem Mukus-Plugging bis hin zur Atemwegsobstruktion, eine daraus resultierende Dyspnoe sowie sekundäre, bakterielle Infektionen.

## LITERATURÜBERSICHT

CF ist die häufigste, letale, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung der weißhäutigen Bevölkerung (Dodge et al. 1997; Rogers et al. 2008). Verursacht wird sie durch einen genetischen Defekt des *CFTR* (engl.: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Gens. Dieses führt zu einem Defekt in dem durch das *CFTR*-Gen kodierten, integralen Membranprotein, das funktionell einen cAMP (engl. *cyclic adenosinemonophosphate*)-abhängigen Ionenkanal darstellt. Im Respirationstrakt führt dieser Defekt zu exzessiver Mukusansammlung mit Mukus-Plugging, Atemwegsobstruktion, herabgesetzter mukoziliärer Clearance und folglich begünstigter, bakterieller Besiedlung (Brouillard et al. 2005; McAuley and Elborn 2000; Vankeerberghen et al. 2002). Dabei sind schwere und wiederkehrende Infektionen, vor allem mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus (S.) aureus*, die häufigste Todesursache von CF-Patienten (Barnes 2008; Locksley 2010; Parameswaran et al. 1998). Zusätzlich können CF-Patienten noch eine Reihe weiterer Krankheitsbilder entwickeln. Dazu zählen vor allem Pankreatitiden, Diabetes mellitus, biliäre Zirrhosen, Gallensteine, Obstipationen (Moskowitz et al. 2008), und auch der Mekoniumileus bei Neugeborenen (Rowntree and Harris 2003) ist für die Erkrankung charakteristisch.

Asthma gehört zu den chronischen Atemwegserkrankungen mit reversibler Atemwegsobstruktion, Hyperreaktivität und Entzündung der Bronchien sowie einer Mukus-Hypersekretion (Daser et al. 2001; McFadden and Gilbert 1992). Für dessen Entstehung spielen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine entscheidende Rolle (Barnes and Marsh 1998; Steinke et al. 2003; Tattersfield et al. 2002). Mit einer Prävalenz von über 330 Millionen betroffener Menschen weltweit nimmt die Inzidenz und Ausprägung von Asthma innerhalb der Bevölkerung stetig zu (Barnes 2008). Somit ist diese Erkrankung sowohl in den industriellen als auch in den Entwicklungsländern zu einer starken Belastung des Gesundheitswesens herangewachsen (Locksley 2010; Pearce et al. 2007).

COPD ist eines der größten globalen Gesundheitsprobleme mit steigender Tendenz und die vierthäufigste Todesursache der Bevölkerung in Industrieländern. Bis 2020 wird diese Erkrankung für bis zu sechs Millionen jährliche Todesfälle verantwortlich sein. Sie wird damit einen Sprung von Platz sechs auf Platz drei der Liste der häufigsten Todesursachen weltweit machen (Mannino and Buist 2007; Yao and Rahman 2011). Die Weltgesundheitsorganisation sagt bis 2030 für COPD eine Erkrankungszahl von 64 Millionen Menschen weltweit voraus (WHO 2019). COPD ist durch eine dauerhafte Einschränkung des Atemzugvolumens, einer Mukus-Hypersekretion und einer ausgeprägten chronischen Entzündung der Atemwege charakterisiert. Ausgelöst wird dieses Krankheitsbild durch eine anhaltende Inhalation von schädlichen Partikeln und Gasen (Anthonisen 1988; Rouze et al. 2014; Vestbo 2014).

Bisher konnte im Atemwegsepithel von Asthmapatienten ein deutlicher Anstieg des mRNA- und Protein-Expressionslevels von humanem CLCA1 beschrieben werden (Hoshino et al. 2002; Toda et al. 2002; Wang et al. 2007; Woodruff et al. 2007). Nach einer Inhalationstherapie der Patienten mit Glukokortikoiden kam es wiederum zu einer Abnahme der humanen CLCA1-mRNA (Woodruff et al. 2007). Ebenso wurden in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Asthma- (Gibson et al. 2005) und CF- (Hauber et al. 2003; Hauber et al. 2004; Hoshino et al. 2002; Toda et al. 2002; Wang et al. 2007; Woodruff et al. 2007) Patienten große Mengen des löslichen CLCA1-Proteins festgestellt, und es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass bei CF-Patienten die vermehrte Expression von CLCA1 in der Bronchialschleimhaut auch mit einer Mukus-Hypersekretion einhergeht (Hauber et al. 2003; Hauber et al. 2004). Auch in COPD-Patienten konnte neben weiteren CLCA-Vertretern (CLCA2 und CLCA4) eine Überexpression von humanem CLCA1 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Patel et al. 2009; Wang et al. 2007). Somit könnte das humane CLCA1 durchaus als Biomarker für entzündliche Atemwegserkrankungen genutzt werden (Patel et al. 2009).

### 2.2.3 Mögliche Funktionen von CLCA1

Ihren ursprünglichen Namen, CLCA für „*chloride channel, calcium-activated*“, erlangte die Proteinfamilie im Zuge ihrer Entdeckung, da nach heterologer Transfektion von Säugerzelllinien eine durch Calcium-aktivierbare Chloridleitfähigkeit gemessen werden konnte (Gruber et al. 2002; Pauli et al. 2000). Man ging daher davon aus, dass es sich um eigenständige Kanalproteine handelte. Im Laufe der Jahre konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proteine entweder vollständig sezerniert werden (Gibson et al. 2005; Hamann et al. 2009; Mundhenk et al. 2006) oder mittels einer c-terminalen Membrandomäne mit der Plasmamembran assoziiert bleiben (Bothe et al. 2008; Elble et al. 2006). Somit schied eine Funktion als „echter“ Chloridkanal aus. Dennoch schienen Mitglieder dieser Familie andere Chloridkanäle (Hamann et al. 2009; Loewen et al. 2004), wie z.B. TMEM16A/Anoctamin1 (Brett 2015; Sala-Rabanal et al. 2017) zu modulieren, so dass die CLCA-Genfamilie in „*chloride channel regulator, calcium-activated*“ umbenannt wurde. Ihre eigentlichen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen sind seither Bestandteil umfangreicher Studien und dennoch bis heute nicht restlos geklärt.

Für CLCA1 wurden bisher viele unterschiedliche Funktionen hypothetisiert, z.B. als modulierendes oder integrales Strukturprotein der Mukusbarriere, insbesondere des Intestinaltraktes (Gibson et al. 2005; Johansson et al. 2008; Leverkoehne and Gruber 2002; Mundhenk et al. 2006; Nystrom et al. 2019; Rodriguez-Pineiro et al. 2013), als Modulator-Protein einer Calcium-abhängigen Chloridleitfähigkeit (Gibson et al. 2005; Gruber et al. 1998b; Hamann et al.

## LITERATURÜBERSICHT

2009; Patel et al. 2006; Winpenny et al. 2009; Yurtsever et al. 2012), als Zink-abhängige Metalloprotease (Bothe et al. 2011; Chen et al. 1998; Nystrom et al. 2018; Patel et al. 2009; Pawlowski et al. 2006; Young et al. 2007), als Auslöser der Mukuszellmetaplasie in der Lunge (Alevy et al. 2012; Nakanishi et al. 2001; Patel et al. 2009; Patel et al. 2006; Zhou et al. 2001), als Modulator der Zytokinexpression bzw. Signalmolekül der angeborenen Immunabwehr im Entzündungsmodell (Ching et al. 2013; Dietert et al. 2014; Erickson et al. 2018; Erickson et al. 2016; Long et al. 2006; Song et al. 2012; Zhang and He 2010) sowie als Tumorsuppressor oder prognostischer Tumormarker bei Adenokarzinomen des Pankreas, des Ovars sowie des Colons (Hu et al. 2019; Hu et al. 2018; Li et al. 2017; Musrap et al. 2015).

Um die funktionelle Rolle des CLCA1-Proteins weiter aufzuklären, wurden in der Vergangenheit verschiedene *Clca1*-Knockout (*Clca1*<sup>-/-</sup>)-Modelle generiert (Long et al. 2006; Patel et al. 2006; Robichaud et al. 2005) und vielfältig eingesetzt.

### **2.3 *Clca1*-Knockout-Modelle**

#### **2.3.1 *Clca1*-Knockout-Modell nach Long**

Die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus (*Clca1*<sup>tm1.1Lex</sup>) von der Arbeitsgruppe um Long (Tab. 3) wurde durch eine gezielte Gen-Mutagenese in 129SvEvBrd embryonalen Stammzellen und anschließender Rekombination mit Cre-Mäusen generiert. Das konditionale Knockout (KO)-Allel mit einer Fragmentgröße von 8 kb beinhaltete das Exon 7, ein Neomycin-resistentes, selektives Markergen (Neomycinkassette) sowie die flankierenden Lox P Seiten. Durch Kreuzung mit Protamin-Cre-transgenen Mäusen kam es zu einem Herausschneiden und damit zur Deletion des Exons 7, einschließlich der Neomycinkassette (Long et al. 2006). Die so generierte KO-Maus zeigte unter naiven Bedingungen (Kontrolltiere) keinen Phänotyp (PT).

In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass bei dieser *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus, nach einer Antigenstimulierung mit Ovalbumin (OVA) sowie mit Lipopolysaccharid (LPS), die Entzündungszellzahl in der BALF und hier insbesondere die der neutrophilen Granulozyten signifikant höher war als die der Wildtyp (WT)-Tiere. Im LPS-Modell ging die Erhöhung der neutrophilen Granulozyten auch zusätzlich mit einer Erhöhung des Chemokins CXCL1 einher. Auch konnte gezeigt werden, dass die perivaskuläre Entzündungsreaktion des Lungengewebes in beiden Modellen signifikant schwächer ausgeprägt war. Ebenso war der max. Atemwegswiderstand bei den Ova-stimulierten *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich herabgesetzt. Die Epitheldicke sowie die Epithelfläche waren im OVA-Modell zwar aufgrund der Antigenapplikation gegenüber den Kontrolltieren erhöht, jedoch signifikant weniger ausgeprägt als die der Antigen-behandelten WT-

Tiere. Nach LPS-Applikation fehlte die Zunahme der Epithelschichtdicke bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen vollständig. Weiterhin kam es nur unter OVA-Exposition zwar zu einer Zunahme der Periodic Acid Schiff (PAS)-positiven Mukuszellen, jedoch war diese wiederum deutlich geringer in ihrer Anzahl und in der Färbeintensität ausgeprägt als bei den WT-Tieren. Somit scheint CLCA1 zumindest nicht allein für die Mukuszell-Metaplasie in Th2-vermittelten Atemwegserkrankungen verantwortlich zu sein (Long et al. 2006).

### 2.3.2 *Clca1*-Knockout-Modell nach Robichaud

Diese *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus (*Clca1*<sup>tm1Dgen</sup>) auf einem 129 x C57BL/6 (B6)-Hintergrund (Tab. 3) wurde durch die übergreifende Entfernung eines 244 bp großen Segmentes der für CLCA1 kodierenden Region mit Exon 7 und Exon 8 generiert. Stattdessen wurde eine LacZ-Neo Reporter-Kassette eingesetzt, um die sonst stattgefundene CLCA1-Expression auch *in vivo* nachweisen zu können (Robichaud et al. 2005). In diesem Modell konnte bei der naiven *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus kein PT festgestellt werden. Nach Antigen-Challenge mit Ovalbumin und IL-13 konnten keine Unterschiede in der Entzündungsantwort, im Vergleich zu den WT-Tieren, festgestellt werden. Im Gegensatz zur *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus nach Long war in diesen KO-Tieren die Muzinproduktion nach OVA-Stimulation sogar noch erhöht. Dieses konnte auch durch erhöhte MUC5ac-Proteinlevel und Mukuszellzahlen in den IL-13 behandelten *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt werden. Damit kam die Arbeitsgruppe zu der Ansicht, dass CLCA1 für eine Mukusüberproduktion nicht von Nöten sei. Andere, möglicherweise kompensatorische Gene, wie *Clca2* und *Clca4*, wurden mittels Genexpressionsanalyse ausgeschlossen (Robichaud et al. 2005).

### 2.3.3 *Clca1*-Knockout-Modell nach Patel

Diese *Clca1*-KO-Maus (C57BL/6-*Clca1*<sup>tm1Htz</sup>) wurde durch homologe Rekombination mit einem mutierten *Clca1*-Gen auf einem C57BL/6J (B6J)-Hintergrund generiert (Tab. 3). Dazu wurde die Hälfte des Exons 7 sowie die Exone 8-11 mit den dazugehörigen Intronen deletiert und durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt (Patel et al. 2006). Auch diese Maus zeigte im naiven Zustand keinen PT. Nach Stimulation mit Ovalbumin und Infektion mit dem Sendai-Virus konnte in den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Unterschied in der Ausprägung der entstandenen Mukuszellmetaplasie festgestellt werden. Auch zeigten die Mäuse im Grad der Hyperreaktivität der Atemwege nach Methacholin-Inhalation keinen Unterschied zu den WT-Tieren. Somit schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass CLCA1 nicht für die viral oder Antigen-vermittelte Mukuszellmetaplasie oder Hyperreaktivität der Atemwege verantwortlich sein kann. Stattdessen wurde nach weiteren Kandidaten der CLCA-Genfamilie gesucht, die eine mögliche kompensatorische Funktion übernehmen könnten. Hierbei stieß man auf CLCA2, das im viralen Infektionsmodell einen ebenso hohen Expressionsanstieg aufwies wie CLCA1 und das

## LITERATURÜBERSICHT

ebenso in der Lage war, nach Überexpression durch einen *Clca2*-Gentransfer eine Mukuszellmetaplasie auszulösen. Damit könnten beide Proteine redundante Funktionen aufweisen und sich gegenseitig beim Fehlen des jeweils anderen ersetzen (Patel et al. 2006).

Auch in einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe Mundhenk und Kollegen konnte nach IL-13 Stimulation kein Unterschied in der Ausbildung der Mukuszellmetaplasie beobachtet werden. Dafür wurde auch hier eine stark erhöhte, möglicherweise kompensierende Expression von CLCA2, unabhängig vom Genotyp (GT), festgestellt (Mundhenk et al. 2012).

In einer dritten Studie mit Fokus auf die akute Infektion der Lunge mit *S. aureus*, einem Toll-like Rezeptor (TLR)2-Agonisten, konnten Unterschiede in der Zytokinexpression sowie in der Immunzellrekrutierung festgestellt werden. So zeigten die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, im Gegensatz zum sonst eingesetzten LPS, einem TLR4-Agonisten, eine deutlich verminderte Expression des Chemokins CXCL1 sowie des Zytokins IL-17 mit konsekutiver, verminderter Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum bzw. in die BALF. Auch hier konnten keine Unterschiede in der Mukuszellverteilung, in der Muzininduktion oder aber in der kompensatorischen Regulation durch andere CLCA-Vertreter beobachtet werden (Dietert et al. 2014).

In Anlehnung an diese Studie wurden von Erickson *et al.* Alveolar- und Knochenmarksmakrophagen von *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf ihren PT nach Antigenstimulation hin untersucht. Hierfür wurde sowohl ein TLR2- (Lipoteichoic acid, LTA) als auch ein TLR4-Agonist (LPS) sowie das Protein CLCA1 selbst eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockout des *Clca1*-Gens nicht in einer Fehlfunktion der Makrophagen resultiert und dass diese auch in den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Lage sind, auf Stimulation hin mit einer vergleichbaren Immunantwort zu reagieren, wie die der WT-Tiere. Damit kann keine Makrophagen-Fehlfunktion für die verminderte Expression von CXCL1 und IL-17 in den KO-Tieren verantwortlich sein (Erickson et al. 2018).

Ebenfalls im Jahr 2014 wurde von der Arbeitsgruppe Ebbinghaus und Kollegen aufgrund einer initialen Beobachtung bei einer Mikroarray-Analyse von arthritischen Mäusen die Rolle des *Clca1*-Gens in der Schmerzweiterleitung nach experimentell-induzierter Arthritis untersucht. Nach Antigen-induzierter Arthritis konnte eine stark erhöhte mRNA-Expression (1724-fach) von *Clca1* in der dorsalen Nervenwurzel des Rückenmarks festgestellt werden. Daraufhin wurde die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus für eine vergleichende Studie im Antigen-induzierten Arthritis-Modell (AIA) eingesetzt. Man stellte fest, dass die KO-Maus eine signifikant schwächer ausgebildete Gelenksschwellung in der akuten Phase der Entzündung aufwies, und auch in der chronischen Phase der Entzündung der Arthritis-Score bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringer ausfiel. Alle weiteren untersuchten Parameter, wie z.B. Schmerzwahrnehmung und -weiterleitung, waren hingegen zwischen den GT unverändert (Ebbinghaus et al. 2014).

Aufgrund der konstant hohen Expression von CLCA1 im Darm untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen jüngst die Funktion von CLCA1 in einem murinen Entzündungsmodell des Darmes, der Dextran-Natriumsulfat (engl. *Dextran-Sodiumsulfat*, DSS)-Colitis (Erickson et al. 2016) sowie im Hinblick auf dessen mögliche Funktion für die Beschaffenheit des Darmmukus (Erickson et al. 2018; Nystrom et al. 2019; Nystrom et al. 2018). In der DSS-Colitis konnten nur vereinzelt Unterschiede festgestellt werden. So waren hier, im Gegensatz zum Staphylokokken-Lungenmodell, die Zytokine Cxcl-1 und Il-17 auf mRNA-Basis bei den *Clca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen im distalen Colon signifikant erhöht, jedoch ohne zelluläres Korrelat. Dennoch zeigt auch diese Studie die Beteiligung von CLCA1 an der Regulation der akuten Immunantwort (Erickson et al. 2016). In einer weiteren Studie von Erickson *et al.* konnte gezeigt werden, dass CLCA1 keinen Einfluss auf die Mukussynthese, die Mukusstruktur und -zusammensetzung, die Mukusdicke sowie dessen Barrierefunktion und auch nicht auf die Beschaffenheit der Mikrobiota im Darm hat. Hierfür wurden sowohl naive als auch DSS-behandelte Mäuse umfänglich untersucht (Erickson et al. 2015). Eine weitere Studie zur Mukusstruktur zeigte zwar keine Unterschiede zwischen den untersuchten GT, *Clca1<sup>-/-</sup>* und WT, es konnte aber nachgewiesen werden, dass die externe Zugabe von rekombinantem CLCA1-Protein zu einem Anstieg der Mukusdicke und zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Mukusschicht führt. Hierfür wurde die Metallohydrolase-Aktivität des Proteins verantwortlich gemacht, die in den KO-Tieren durch eine Cystein-Protease kompensiert wird (Nystrom et al. 2018). In einer Folgestudie der Autorin zur Funktion des CLCA1-Proteins in Bezug auf eines der zentralen Strukturproteine des Mukus, MUC (engl. *Mucin*) 2, konnte kein Einfluss des Fehlens von CLCA1 bei den *Clca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen beobachtet werden. Weder die Menge noch die Struktur des MUC2-Proteins schienen verändert. Jedoch konnte mittels Lektin-basierter *ex vivo*-Bildgebung eine veränderte Faltstruktur des MUC2-Oligomers beobachtet werden, so dass die Hypothese aufgestellt wurde, dass CLCA1 wohlmöglich in der Lage ist, das MUC2-Protein zu prozessieren (Nystrom et al. 2019).

LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 3: Zusammenfassung der *Clca1*-Knockout-Modelle

<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> - Modell nach...	Genetisches Konstrukt	Mausstamm	Untersuchungs- schwerpunkt	Stimulus	Phänotyp	Quelle
Long	Konditionaler KO Deletion Exon 7	129 SvJ	naiv	-	Kein Phänotyp	Long <i>et al.</i> 2006
			Inflammation/ Mukuszellen	OVA	Entzündungszellzahl BALF↑ Neutrophile Granulozyten BALF↑ Perivaskuläre Inflammation↓ Max. Atemwegswiderstand↓ Epitheldicke↓ PAS-positive Zellen↓	
				LPS	Entzündungszellzahl BALF↑ Neutrophile Granulozyten BALF↑ Chemokin CXCL1↑ Perivaskuläre Inflammation↓ Epitheldickenzunahme fehlt	
Robichaud	Konventioneller KO Deletion Exone 7, 8	C57BL/6-129 (gemischt)	naiv	-	Kein Phänotyp	Robichaud <i>et al.</i> 2005
			Inflammation/ Mukuszellen	OVA	Muzinproduktion↑	
				IL-13	Muc5ac↑ PAS-positive Zellen↑	

LITERATURÜBERSICHT

Fortsetzung Tabelle 3: Zusammenfassung der *Clca1*-Knockout-Modelle

<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> - Modell nach...	Genetisches Konstrukt	Mausstamm	Untersuchungs- schwerpunkt	Stimulus	Phänotyp (im Vergleich zu identisch behan- delten WT Mäusen)	Quelle
Patel	Konventioneller KO Deletion Exone 7, 8-11	C57BL/6J	naiv	-	Kein Phänotyp	Patel <i>et al.</i> 2006
			Inflammation/ Mukuszellen (Lunge)	OVA	Kein Phänotyp	
				Sendai-Virus	Kein Phänotyp	
			Reaktivität der Atemwege (Lunge)	Methacholin	Kein Phänotyp	
			Inflammation/ Mukuszellen (Lunge)	IL-13	Kein Phänotyp	Mundhenk <i>et al.</i> 2012
			Inflammation/ Mukuszellen (Lunge)	<i>S. aureus</i>	Chemokin CXLC1↓ IL-17↓ Neutrophile Granulozyten BALF↓	Dietert <i>et al.</i> 2014
			Inflammation/ Makrophagen (Lunge und Knochenmark)	LPS	Kein Phänotyp	Erickson <i>et al.</i> 2018
				LTA	Kein Phänotyp	
				CLCA1	Kein Phänotyp	

# LITERATURÜBERSICHT

Fortsetzung Tabelle 3: Zusammenfassung der *Clca1*-Knockout-Modelle

<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> - Modell nach...	Genetisches Konstrukt	Mausstamm	Untersuchungs- schwerpunkt	Stimulus	Phänotyp (im Vergleich zu identisch behan- delten WT-Mäusen)	Quelle
Patel	Konventioneller KO Deletion Exone 7, 8-11	C57BL/6J	Arthritis/ Schmerzweiterleitung (Kniegelenk)	mBSA, Freunds-Adjuvanz, <i>M. tuberculosis</i> , <i>B. pertussis</i>	Gelenksschwellung↓ Arthritis Score↓	Ebbinghaus <i>et al.</i> 2014
			Inflammation/ Mukuszellen (Darm)	DSS	Cxcl1↑ Il-17↑	Erickson <i>et al.</i> 2016
			Mucus/ -aufbau (Darm)	-	Kein Phänotyp	Erickson <i>et al.</i> 2015
				DSS	Kein Phänotyp	
			Mucus/ -struktur (Darm)	-	Kein Phänotyp	Nystrom <i>et al.</i> 2018
			Mucus/ -prozessierung (Darm)	-	Muc2-Prozessierung↓	Nystrom <i>et al.</i> 2019

*Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, KO = Knockout, OVA = Ovalbumin, PAS = Periodic acid-Schiff, IL = Interleukin, LPS = Lipopolysaccharid, BALF = bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, *S. aureus* = Staphylokokkus aureus, LTA = Lipoteichoic acid, mBSA = methyliertes, bovines Serumalbumin, *M. tuberculosis* = Mycobacterium tuberculosis, *B. pertussis* = Bordetella pertussis, DSS = Dextran-Sodiumsulfat

Aufgrund der teils kontroversen Ergebnisse der einzelnen Studien, abhängig vom eingesetzten KO-Maus-Modell, der hohen Anzahl an Studien und somit besseren Charakterisierung der *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Maus nach Patel sowie deren Verfügbarkeit, wurde diese Maus für die vorliegende Arbeit ausgewählt. In den zuvor beschriebenen Studien waren diese *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Tiere in einem Alter von 6 bis 16 Wochen eingesetzt und untersucht worden.

## **2.4 Die Phänotypisierung von genetisch veränderten Mauslinien**

Genetisch veränderte Mauslinien stellen zum Teil exzellente Modelle für die menschliche Physiologie und für humane Erkrankungen dar. Sie erlauben uns, die Effekte von einzelnen, veränderten Genen in Bezug auf den gesamten Organismus zu untersuchen und geben dadurch einen enormen Einblick in die Funktion der untersuchten Gene. Eine Phänotypisierungs-Studie erhebt alle klinischen, physiologischen, morphologischen oder pathologischen Veränderungen eines genetisch veränderten Organismus (Zeiss et al. 2012). Die Mehrzahl der Studien über genetisch veränderte Mäuse, wie auch diese Studie, sind Hypothesen-getrieben. Hierbei wird der PT, verursacht durch die Mutation eines einzelnen, bekannten Gens, welches sehr häufig mit einer humanen Erkrankung assoziiert ist, untersucht. In diesen Studien ist die einzige beabsichtigte Variable das veränderte Gen selbst, nebst anderen möglichen Begleitvariablen wie Hintergrundstamm oder konkurrierende Erkrankungen (Brayton et al. 2001; Zeiss 2002). Eine Studie zur Phänotypisierung eines Mausstammes sollte ganz allgemein sowohl klinische als auch pathologische Daten enthalten, die z.B. durch molekulare Analysen ergänzt werden können. Es sollten vier bis zehn Mäuse, mindestens jedoch zwei Mäuse, pro Geschlecht, GT und Alter untersucht werden (Brayton et al. 2001; Zeiss et al. 2012). Die Rückkreuzung auf den eigentlichen Hintergrundstamm sollte vollständig abgeschlossen sein (mind. zehn Generationen), das bedeutet, es sollten „kongene“ Mäuse verwendet werden, um die Variabilität in der Ausprägung des PT so gering wie möglich zu halten (Rivera and Tessarollo 2008). Es sollten alle, den PT betreffenden Variablen, wie z.B. das Alter, das Gewicht, der Hintergrundstamm sowie die Haltungsbedingungen einschließlich des Gesundheitsstatus, hinlänglich bekannt sein (Brayton et al. 2001; Zeiss et al. 2012). Es müssen immer WT-Kontrolltiere desselben Hintergrundstammes, im besten Falle Wurfgeschwister, mitgeführt werden. Diese sollten auch in exakt der gleichen Anzahl wie die genetisch veränderten Tiere untersucht werden, um Variationen der „normalen“ Hintergrundpathologien nicht falsch zu interpretieren (Elmore and Peddada 2009; Zeiss et al. 2012). Auf ausschließlich historische Kontrollen aus bereits publizierten Studien sollte aufgrund der hohen Variabilität an Faktoren (Hintergrundstamm, Laborbedingungen etc.) verzichtet werden (Elmore and Peddada 2009). Alle Untersuchungen sollten für den Untersucher „verblindet“ erfolgen, um keinen Bias entstehen zu lassen

## LITERATURÜBERSICHT

(Kilkenny et al. 2009). Die pathologische Untersuchung und auch die Interpretation der klinischen Ergebnisse sollte immer durch einen speziell dafür ausgebildeten, experimentellen Maus-Pathologen erfolgen, der in der Lage ist, die Zusammenhänge zwischen Hintergrundpathologien und patho-physiologischen Prozesse von noch unbekanntem Eigenschaften einer neuen Mauslinie zu erkennen und in den Gesamtkontext einzuordnen (Bolon et al. 2008; Zeiss et al. 2012). Die Phänotypisierung genetisch veränderter Mauslinien zu rein wissenschaftlichen Zwecken geht immer mit der tierschutzrechtlichen Einschätzung der Belastung durch den neu entstandenen PT einher. In Deutschland ist eine genetisch-bedingte Belastung mit einer Genehmigungspflicht für die Generierung und Zucht dieser Mauslinie verbunden.

### **2.4.1 Die Belastungsbeurteilung von genetisch veränderten Mauslinien**

Genetische Veränderungen des Erbgutes sind in der biomedizinischen Forschung ein wichtiges Werkzeug, um Genfunktionen und deren Auswirkungen im Organismus sowie in Krankheitsmodellen zu untersuchen. Die phänotypische Ausprägung kann sehr vielfältig sein und je nach Art der genetischen Manipulation zu einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere führen. Mit der europäischen Richtlinie 2010/63/EU (EU 2010) ist die Erhebung und Beurteilung von genetisch bedingten Belastungen in den Fokus gerückt. Weiterhin ist seit Inkrafttreten des neuen Tierschutzgesetzes am 12. Juli 2013 die Zucht genetisch veränderter Tiere dann genehmigungspflichtig, wenn die Nachkommen aufgrund ihrer genetischen Manipulation unter Umständen Schmerzen, Leiden oder Schäden aufweisen können (EU 2010; TierSchG 2013). Daher sollten im Sinne der 3R-Prinzipien (Replace, Reduce, Refine) die Belastungen charakterisiert und auf ein Minimum reduziert werden. Als genetisch veränderte Linien werden unter anderem alle mittels Endonuklease erzeugte Linien, Linien mit stabiler Integration eines Transgens durch homologe Rekombination oder zufällige Integration, Linien, die durch physikochemische Behandlung erzeugt wurden sowie Linien, die durch Identifizierung und Selektion einer spontanen Mutation entstanden sind, bezeichnet (AKBT 2017). Dafür müssen die Tiere einer Linie von der Geburt bis zum Ausscheiden aus der Zucht bzw. bis zur experimentellen Verwendung untersucht werden. Dies betrifft sowohl Linien, die schon seit mehreren Jahren vorhanden sind, als auch neu generierte Linien sowie Importlinien mit unzureichender Charakterisierung. Bei Bestandslinien kann bei der Einteilung in den jeweiligen Belastungsgrad auf vorhandene Erfahrungswerte zurückgegriffen werden. Für alle neuen oder unzureichend charakterisierten Linien muss jedoch zukünftig eine vorgeschriebene Belastungsbeurteilung im Rahmen des Genehmigungsverfahrens für die Zucht von genetisch veränderten Mäusen vorgenommen werden. Es werden für jede Linie mindestens 14 Tiere beiderlei Geschlechts, (mind. sieben weibliche und mind. sieben männliche Tiere) beobachtet und bewertet (BfR 2014; EC 2013). Hierzu wird eine Beurteilung des neugeborenen Wurfs, des Wurfs beim Absetzen, der

Einzeltiere im Alter von zwei Monaten und anschließend alle drei Monate vorgenommen. Ausgenommen hiervon sind WT, Kreuzungszuchten ohne zu erwartende Belastung für die Nachkommen sowie Linien, die einen PT erst nach Induktion oder nach Absetzen eines Suppressors zeigen. Genauso ausgenommen sind Linien mit Reportergenen im Genom sowie Linien, bei denen keine Belastung zu erwarten ist (Cre-Stämme etc.). Einen Sonderfall stellen die immundefizienten Tiere dar. Die Zucht und Generierung dieser Linien sind in Berlin grundsätzlich genehmigungspflichtig auch wenn diese Tiere durch entsprechendes Refinement, wie z.B. der SPF-Haltung, keinen belastenden PT aufweisen (BfR 2014; BfR 2016; Zintzsch et al. 2017).

Für den jeweiligen Untersuchungszeitpunkt werden folgende Parameter beurteilt: Für die Beurteilung eines neugeborenen Wurfes wird die Farbe, die Aktivität, die Größe und das Gewicht, das Vorhandensein eines Milkspots (Muttermilch-gefüllter Magen) sowie die Pflege durch das Muttertier herangezogen. Bei den Absetzern wird auf haarlose Stellen, Kümern, das Vorhandensein von Bisswunden, Mikrophthalmie, sog. Elefantenzähne oder einen Hydrozephalus geachtet. Bei der Einzeltier- und Abschlussbeurteilung wird auf den Ernährungszustand, die Körperhaltung, das Verhalten und die Motorik, das Fell, die Körperöffnungen, die Reaktion auf Handling sowie auf die Ausbildung sichtbarer, pathologischer Veränderungen (z.B. Tumore, Verletzungen) geachtet (BfR 2014; BfR 2016). Für die praktische Umsetzung der Belastungsbeurteilung dienen als Orientierungshilfe die vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Verfügung gestellten Formulare (BfR 2014; BfR 2016; Grune et al. 2014) sowie umfangreiche Kriterienkataloge des Arbeitskreises für Berliner Tierschutzbeauftragte (AKBT 2017) und des Nationalen Ausschusses (EC 2013; Zintzsch et al. 2017).

Anschließend werden die genetisch veränderten Linien einem Belastungsgrad zugeordnet. PT ohne Belastung sind alle die Tiere, die nach Tierschutzgesetz maximal die Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhaften Schäden aufweisen, die dem eines Kanüleneinstichs gleichkommen (EU 2010). Die Zucht dieser Tiere ist genehmigungsfrei. „Gering“-belastet sind alle die Tiere, die nur kurzzeitig geringen Schmerzen, Leiden oder Ängste durch ihre genetische Veränderung ausgesetzt sind (EU 2010). Als „mittel“-belastet werden genetisch veränderte Tier eingestuft, die kurzzeitig mittelstarken Schmerzen, Leiden oder Ängste oder langanhaltend geringen Schmerzen ausgesetzt sind, die das Wohlergehen mittelschwer beeinträchtigen (EU 2010). Als „schwer“-belastete Tiere gelten jene, die aufgrund ihrer genetischen Veränderung starken Schmerzen, schweren Leiden oder Ängsten ausgesetzt sind oder langanhaltende, mittelstarke Schmerzen oder mittelschwere Leiden und Ängste aufweisen, die das Wohlbefinden stark beeinträchtigen (EU 2010). Die Zucht von Tieren, die einen der drei letzteren Belastungsgrade aufweisen, sind immer genehmigungspflichtig (TierSchG 2013).

### **2.4.2 Die Belastungsbeurteilung der *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Maus**

Da die *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits seit 2006, lange vor Implementierung der EU-Richtlinie in deutsches Recht, in der experimentellen Zuchteinrichtung der Charité gezüchtet wurden, lagen über die Jahre ausreichend Erfahrungswerte vor, um die Mäuse in ihrer Abschlussbeurteilung als „PT ohne Belastung“ und damit als genehmigungsfreie Zucht einzustufen (EU 2010; TierSchG 2013). Hierbei wurden die Tiere bis zu ihrem Ausscheiden aus der Zucht mit ca. sechs bis neun Monaten bewertet. Die am häufigsten in Versuchen eingesetzten Tiere dieser Linie waren 6-16 Wochen alt und wiesen im naiven Zustand auch nach spezifischerer Charakterisierung, wie z.B. Untersuchung der Epithelzellen in Lunge und Darm, Untersuchung des Mukus im Darm etc., keinen PT auf (Erickson et al. 2015; Nystrom et al. 2019; Nystrom et al. 2018; Patel et al. 2006).

### **2.5 Die Phänotypisierung der alternden Maus**

Alternde Mäuse entwickeln eine Reihe von pathophysiologischen Veränderungen als Teil einer verminderten Organfunktion im natürlichen Alterungsprozess. Altern ist die Kumulation von Lebenszeitereignissen innerhalb einer Zelle, eines Gewebes, eines Organs oder eines ganzen Organismus. Bereits ab dem Zeitpunkt der Zeugung wird die Lebenszeit eines Individuums durch genetische, umweltbedingte oder zufällige Einflüsse bestimmt (Pettan-Brewer and Treuting 2011; Ward et al. 2016). Das Altern umfasst molekulare, zelluläre und organspezifische Erscheinungen, die sich stetig durch die Ereignisse des Lebens im Wechsel befinden. Im Laufe des Alterungsprozesses degenerieren und atrophieren Zellen und Gewebe, es treten zelluläre Seneszenz und Fehlregulationen auf, es kommt zur Entstehung von Neoplasien oder chronischen Entzündungen sowie zur Reparatur von untergegangenen Gewebe. Alle diese altersassoziierten Veränderungen können sich im Laufe der Zeit in Erkrankungen manifestieren (Kaeberlein 2016; Ward et al. 2016). Hierbei unterscheiden die meisten Studien in der Literatur zwischen neoplastischen Veränderungen und denen nicht-neoplastischen Ursprungs (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Ladiges et al. 2013; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Szymanska et al. 2014). Andere Studien unterscheiden hingegen in degenerative und nicht-degenerative Erkrankungen (Ladiges et al. 2013; Snyder et al. 2016; Ward et al. 2016). Die Entstehung von pathologischen Veränderungen und Erkrankungen im Alterungsprozess ist durch viele verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst, wie z.B. Haltungsbedingungen, Zusammensetzung des Futters und Wassers oder Hintergrundinfektionen (Brayton et al. 2012), die einen Vergleich verschiedener Studien untereinander nur unter standardisierten Bedingungen überhaupt ermöglichen (Ward et al. 2016). Derzeit gibt es zwei verschiedene Modelle für die Durchführung von Altersstudien in der Maus, Querschnittsstudien (*engl.: cross-sectional stu-*

dies) zur Ermittlung des Gesundheitszustandes zu einem bestimmten Zeitpunkt oder longitudinale Studien (*engl.: longitudinal studies*) zur Ermittlung der maximalen Lebensdauer. Beide Studien haben Vor- und Nachteile und sind in ihrer Anwendung streng an die ihnen vorausgehende Fragestellung gebunden (Ackert-Bicknell et al. 2015; Treuting et al. 2016).

### **2.5.1 Querschnitts-Studien (*engl. cross-sectional studies*)**

In Querschnittsanalysen werden die Tiere zu vorher bestimmten, definierten Zeitpunkten einer terminalen Analyse, z.B. einer Sektion, zugeführt, um die Entwicklung von altersassoziierten Veränderungen in Bezug auf die Genexpression sowie die biochemischen oder histopathologischen Veränderungen hin zu untersuchen. Hierbei wird dem Untersuchenden zu unterschiedlichen Lebenszeiten ein Einblick durch den Querschnitt der zu untersuchenden Population gewährt, um phänotypische Daten zum Gesundheitszustand verschiedener Tiere unterschiedlichen Alters zur selben Zeit zu erheben. Um Umweltfaktoren, die wiederum Einflüsse auf den Verlauf der Altersstudie nehmen könnten, auszuschließen, sollten stets Tiere unterschiedlichen Alters miteinander untersucht werden. Dies erfordert eine genaue Planung des Studienablaufs im Vorfeld. Querschnitts-Altersstudien werden immer dann eingesetzt, wenn der Untersuchungsschwerpunkt auf einer terminalen Methode beruht, wie z.B. der histopathologischen Untersuchung (Ackert-Bicknell et al. 2015). Typische Untersuchungszeitpunkte sind abhängig von der Fragestellung und befinden sich meist zwischen dem 3. bis 6. Lebensmonat (LM), dem 10. bis 14. LM oder dem 18. bis 24. LM. Diese Untersuchungszeiträume entsprechen den unterschiedlichen Lebensphasen des Menschen, wie erwachsen, mittelalt und alt (Fox 2007), und sind daher die am häufigsten untersuchten Zeitpunkte in der Literatur (JAX-Mice 2007a; Miller et al. 2007; Sundberg et al. 2011) sowie in den großen Datenbanken, wie z.B. der „Mouse Phenome Database (MPD)“ (Maddatu et al. 2012), der „Mouse Genome Informatics“-Database (MGI 2019) des Jackson Laboratory oder der „International Mouse Strain Resources Database“ (IMSR 2019). Weiterhin ist für Querschnitts-Studien die Zahl der zu untersuchenden Tiere deutlich geringer als bei longitudinalen Studien. So werden aufgrund der Standardisier- und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsbedingungen in der Literatur zwischen fünf bis zehn Tieren pro Geschlecht und GT eingesetzt (Ackert-Bicknell et al. 2015; Szymanska et al. 2014). Wichtig ist bei Querschnitts-Studien mit Untersuchungszeitpunkten im hohen Alter (18.- 24. LM) zu beachten, dass die Gruppengrößen so kalkuliert werden (+ 30 % Reserve), dass auch nach einem frühzeitigen Versterben oder nach frühzeitiger Euthanasie noch genügend Tiere zum Untersuchungszeitpunkt verfügbar sind, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (Ackert-Bicknell et al. 2015).

### 2.5.2 Longitudinale Studien (engl. *longitudinal studies*)

Longitudinale Studien sind immer dann unabdingbar, wenn die Untersuchung der maximalen Gesamtlebensdauer das Ziel der Studie darstellt. Hierbei werden die Tiere so lange gehalten, bis sie entweder spontan versterben oder aber in Folge der aufgestellten Abbruchkriterien (humanen Endpunkte) euthanasiert werden müssen. Da der natürliche Tod als Endpunkt von deutschen Tierschutzbehörden nicht genehmigt wird, müssen für jede Studie eigene Abbruchkriterien erstellt werden. Diese unterscheiden sich von Behörde zu Behörde der Bundesländer sowie von Land zu Land und sogar zwischen den Empfehlungen des „National Institute of Health“ (NIH 2019) und der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA 2012) teilweise dramatisch, was eine Vergleich- und Reproduzierbarkeit dieser Studien auf nationaler und internationaler Ebene deutlich erschwert. Auch erfordert die Durchführung einer longitudinalen Studie hohe Expertise und Erfahrung vom tierbetreuenden und tieruntersuchenden Personal im Umgang und in der täglichen Kontrolle von alternden Mäusen. Wenn dies nicht korrekt und standardisiert durchgeführt wird, sind die erhobenen Daten unter Umständen nicht belastbar (Ladiges et al. 2009). Um die reelle, maximale Lebenszeit zu untersuchen, sollten die Tiere so lange wie möglich leben, ohne sich zu quälen, und erst dann euthanasiert werden, wenn sie innerhalb von 24 Stunden versterben würden (Ackert-Bicknell et al. 2015). Aus diesem Grund wurden einheitliche Kriterien verfasst, die es ermöglichen sollen, die Tiere unter vergleichbaren Umständen zu euthanasieren. Dazu zählen: Fehlende Reaktion auf Berührung oder andere Stimuli, erschwerte Atmung, Untertemperatur, gekrümmte Körperhaltung mit gestäubtem Fell, plötzlicher Gewichtsverlust (Verlust von 20 % des Körpergewichts (KGW) innerhalb von sechs Tagen), Verweigerung der Aufnahme von Futter und Wasser, Kachexie, gekennzeichnet durch herausstehende Rippen, Wirbelkörper und eine eingesunkene Hüfte (Ackert-Bicknell et al. 2015; Brayton et al. 2012; JAX-mice 2017). Natürlich müssen alle angewandten Abbruchkriterien in Einklang mit den jeweiligen behördlichen Auflagen stehen und in jedem Fall so gewählt werden, dass nicht ein Großteil der Tiere spontan verendet und so Untersuchungen aufgrund der fortgeschrittenen Autolyse unmöglich werden (Ladiges et al. 2009). Die Haltung der Tiere in einer longitudinalen Studie ist daher sehr aufwendig, da die Tiere täglich gründlich beobachtet und auch gewogen werden müssen (Ackert-Bicknell et al. 2015). Auch die Untersuchungszahlen sind für diese Art der Altersstudie deutlich höher angesetzt, um in dieser heterogenen Gruppe vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. So werden hier laut Literatur zwischen 40 und 100 Tiere pro Geschlecht und GT eingesetzt (Ackert-Bicknell et al. 2015; Haines et al. 2001; Szymanska et al. 2014). Vorteil der longitudinalen Altersstudie ist die Bestimmung der maximalen Lebensdauer, die in der Querschnittstudie ausgeschlossen ist. Weiterhin können über die gesamte Lebenszeit Einzelparameter

(Blut, Urin etc.) von ein und demselben Tier gemessen und verfolgt werden (Ackert-Bicknell et al. 2015).

### **2.5.3 Die Bedeutung der pathologischen Untersuchung für Altersstudien**

Die Pathologie ist die Lehre von den Krankheiten, insbesondere von ihrer Entstehung und den durch sie hervorgerufenen organisch-anatomischen Veränderungen. Sie beschreibt die makroskopischen, histologischen und zellulären Zustände von Geweben und Organen, die als nicht „normal“ eingestuft werden. Diese Einschätzung kann sich entweder auf das Ende der Lebenszeit (longitudinale Studie) oder aber auf einen bestimmten Zeitpunkt im Alterungsprozess (Querschnitts-Studie) beziehen, genauso wie sie entweder umfassend alle Organsysteme betreffend oder aber auch nur selektiv auf einzelne Organe und Gewebe fokussiert werden kann (Ladiges 2011). Die pathologische Untersuchung kann hierbei detailliert die Art und den Grad einer Läsion beschreiben. Diese wiederum können eingestuft und bewertet (Scoring) und mit physiologischen Funktionen in Korrelation gebracht werden. Auch ermöglicht es die Pathologie, Läsionen und Krankheiten zu erkennen, die mit rein funktionellen Assays oder einer klinischen Untersuchung der Tiere so nicht feststellbar wären. So können die Ergebnisse einer umfassenden, histopathologischen Untersuchung von alternden Mäusen direkt mit deren Begleiterkrankungen oder deren Todesursache in Bezug auf eine bestimmte Kohorte oder die Physiologie eines bestimmten PT korreliert werden. Auch die Krankheitsbelastung des Einzeltieres, der Kohorte oder des PT, gemessen an der Anzahl von pathologisch relevanten Befunden pro Einzeltier, kann so bestimmt werden (Treuting et al. 2008). Ohne eine systematische, histopathologische Untersuchung und Auswertung durch einen erfahrenen, spezifisch ausgebildeten und zertifizierten Mauspathologen, als Goldstandard (Rosai 2007), können alle molekularen und auch biochemischen Daten, die in einer Altersstudie generiert werden, nicht in den Gesamtkontext für den Gesundheitszustand des Tieres gesetzt werden (Ladiges et al. 2013; Treuting et al. 2016). Daher ist es hinlänglich anerkannt, dass die Informationen, die die pathologische Untersuchung liefern kann, auch für Altersstudien essentiell sind (Bronson and Lipman 1993; Weindruch and Masoro 1991).

### **2.5.4 Pathologien der C57BL/6-Maus in bisherigen Altersstudien**

Der B6-Mausstamm ist einer der am meisten untersuchten und publizierten Stämme in der Literatur. Je nach Herkunftsort unterscheidet man die wichtigsten B6-Stämme in den B6J-Stamm aus dem Jackson Laboratory und den C57BL/6N (B6N)-Stamm vom NIH, ursprünglich hervorgegangen aus dem B6J-Stamm. Auch wurde die B6J-Maus als Grundlage für das erste „Mouse Genome“-Projekt gewählt (Waterston et al. 2002). Sowohl das Jackson Laboratory (JAX-Mice 2007a; JAX-mice 2017) als auch zahlreiche Publikationen (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Kilkenny et al. 2009; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016;

## LITERATURÜBERSICHT

Szymanska et al. 2014; Treuting et al. 2008) geben einen Überblick über die pathologischen Befunde der alternden B6-Maus. Eine Zusammenfassung der häufigsten neoplastischen Veränderungen aus den referenzierten Studien finden sich in Tabelle 4 sowie die Zusammenfassung der „nicht-neoplastischen“ Veränderungen in Tabelle 5.

*Tabelle 4: Neoplastische Veränderungen der C57BL/6-Maus aus bisherigen Altersstudien*

betreffendes Organ	Neoplasie
Endokrin	Phäochromozytom, Hypophysenadenom, Hypophysenadenokarzinom, Schilddrüsenadenom
Hämatopoetisch	Malignes Lymphom, histiozytäres Sarkom
Vaskulär	Hämangiom, Hämangiosarkom
Weichteilgewebe	Fibrosarkom
Muskulatur	Leiomyosarkom
Haut	Plattenepithelkarzinom, Papillom,
Auge	Adenom der Harder'schen Drüse
Schilddrüse	Adenom
Lunge	Adenom, Karzinom
Leber	Adenom, Karzinom
Pankreas	Inselzelladenom
Ovar	Granulosazelltumor, Zystadenom
Uterus	Endometriales Adenom
Darm	Dünndarmadenom
Knochen	Osteosarkom
Milchdrüse	Adenokarzinom

*Tabelle 5: „Nicht-neoplastische“ Veränderungen der C57BL/6-Maus aus bisherigen Altersstudien*

betreffendes Organ	„Nicht-neoplastische“ Veränderung
Auge	Katarakt, ulzerative Keratitis
Ohren	Otitis media
Nase	Amyloidose, Hyalinose
Speicheldrüsen	Hyperplasie
Zähne	Hypertrophie, Dysplasie

Fortsetzung Tabelle 5: „Nicht-neoplastische“ Veränderungen der C57BL/6-Maus aus bisherigen Altersstudien

betreffendes Organ	„Nicht-neoplastische“ Veränderung
Gehirn	Hydrozephalus, Mineralisierungen
Hypophyse	Zysten, Hyperplasie
Schilddrüse	Follikuläre Hyperplasie, Zysten, Entzündung
Trachea	Hyalinose
Lunge	Acidophilic Macrophage Pneumonia, Aspirationspneumonie
Herz	Kardiomyopathie, Arteriosklerose, Amyloidose, Klappenerkrankungen, Thrombose
Thymus	Lymphatische Depletion, lymphatische Hyperplasie
Lymphknoten	Lymphatische Hyperplasie
Leber	Gallengangshyperplasie, Leberzysten, Fettleber, Fibrose, Mikrogranulome, subakute Entzündung, extramedulläre Hämatopoese
Gallenblase	Hyalinose
Milz	Lymphatische Hyperplasie, lymphatische Atrophie, lymphatische Depletion, Amyloidose
Nieren	Amyloidose, chronischer Infarkt, Hydronephrose, Nephropathie, Glomerulonephritis, Obstruktion, Mineralisierungen
Nebennieren	Hyperplasie
Pankreas	Inselzellhyperplasie
Ösophagus	Dilatation
Magen	Zystische Erweiterung der Drüsen, Hyalinose, Schleimhauthyperplasie
Darm	Amyloidose, Rektumprolaps
Ovar	Atrophie, Ovarialzysten
Uterus	Glandulärzystische endometriale Hyperplasie, Hydrometra, Pyometra, Angiektasien
Klitorisdrüse	Zysten
Blutgefäße	Arteriitis
Haut	Ulzerative Dermatitis, Akanthose
Knochen	Kniegelenksarthrose, Bandscheibenvorfall, Wirbelgelenksarthrose

### 3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung

---

Arbeitshypothese: Das CLCA1-Protein ist essentiell an der Entstehung und Ausprägung von pathologischen Veränderungen im Alterungsprozess beteiligt. Somit hat ein Fehlen des CLCA1-Proteins einen Einfluss auf den altersassoziierten PT der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus.

Bisher konnte bei der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus im naiven Zustand bis zu einem Alter von sechs bis neun Monaten unter spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Haltungsbedingungen kein PT beschrieben werden. Somit wurde die KO-Maus nach deutschem Tierschutzrecht als genetisch veränderte Maus „ohne belastenden PT“ eingestuft. In den letzten Jahren kam die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus bereits in vielen Studien zur Erforschung der CLCA1-Proteinfunktion zum Einsatz (Tab. 3). Je nach Art des Stimulus (akut versus chronischer Entzündungsreiz) konnten bereits bei Mäusen im Alter von 6-16 Wochen Unterschiede zu den WT-Tieren festgestellt werden. Diese äußerten sich vor allem in einer veränderten Immunantwort. Weiterhin wird das Protein mit verschiedenen Faktoren der Tumorbilogie und -entstehung in Verbindung gebracht. Genau diese Kombination von neoplastischen und „nicht-neoplastischen“ (degenerativen oder entzündlichen) Veränderungen konnte im Prozess des Alterns bei dem Hintergrundstamm B6 bereits beobachtet werden (Tab. 4 und 5). Schlussfolgernd wurden in dieser Querschnittsaltersstudie sowohl klinische (KGW, Hämatologie, klinische Chemie) als auch umfassende, pathologische (Organgewichte (OGW), makroskopische und histopathologische) Untersuchungen durchgeführt, um die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus im Alterungsprozess zu definierten Zeitpunkten von 12, 18 und 24 Monaten zu phänotypisieren und deren Unterschiede zu den WT-Tieren zu erkennen und zu beschreiben. Den Ausgangs- und Vergleichspunkt für diese Untersuchungen bildeten zwei Monate alte *Clca1*<sup>-/-</sup>- und WT-Tiere, da in diesem Alter bisher keine altersassoziierten Veränderungen oder etwaige Unterschiede zwischen den GT beobachtet werden konnten.

Mit den Ergebnissen dieser Studie sollte der Phänotyp der alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus erstmals beschrieben und etwaige Belastungserhöhungen aus Tierschutzsicht im Vergleich zum WT festgestellt werden. Weiterhin sollten sie dazu dienen, mögliche Beteiligungen von CLCA1 bei altersassoziierten Prozessen aufzuzeigen und somit Rückschlüsse auf die zahlreichen, hypothetisierten, zellulären Funktionen früherer Arbeiten erlauben.

## 4 Material und Methoden

Die Untersuchungen der Mäuse nach dem Töten zu wissenschaftlichen Zwecken wurden im Rahmen des dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) angezeigten Tötungsvorhabens zu wissenschaftlichen Zwecken mit der Anzeigennummer T 0104/06 durchgeführt.

### 4.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie zur Phänotypisierung der alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus handelt es sich um eine Querschnittsaltersstudie (engl. *cross-sectional study*), bei der die umfassende Untersuchung der Tiere zu definierten Zeitpunkten in randomisiert ausgewählten Tiergruppen erfolgte (Tab. 6). Da die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus vollständig auf den B6J-Stamm zurückgezüchtet wurde, wurden als Kontrolltiere WT-Wurfgeschwister mit vollkommen identischem, genetischem Hintergrund verwendet.

Tabelle 6: Studiendesign

Genotyp	Zeitpunkt der Untersuchung in Lebensalter	Untersuchte Parameter	Anzahl der Tiere (n) je Genotyp		
WT	2 Monate	Körpergewicht Hämatologie Klinische Chemie Organgewichte Pathologische Untersuchung (Makroskopie, Histologie)	5		
<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>					
WT	12 Monate		Körpergewicht Hämatologie Klinische Chemie Organgewichte Pathologische Untersuchung (Makroskopie, Histologie)	5	
<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>					
WT	18 Monate			Körpergewicht Hämatologie Klinische Chemie Organgewichte Pathologische Untersuchung (Makroskopie, Histologie)	5
<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>					
WT	24 Monate	Körpergewicht Hämatologie Klinische Chemie Organgewichte Pathologische Untersuchung (Makroskopie, Histologie)			10
<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>					

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, n = Anzahl

### 4.2 Versuchstiere

#### 4.2.1 Genotypen

Zur Durchführung der Untersuchungen zur Phänotypisierung wurden ausschließlich weibliche sowohl B6J-Wildtyp-Mäuse als auch kongene, homozygote *Clca1*-defiziente Mäuse (C57BL/6-*Clca1*<sup>tm1Htzm</sup>, ehemals m*Clca3*<sup>neo E7-11</sup>) verwendet. Die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mutanten wurden durch den Ersatz der Exone 7-11 durch eine Neomycin Kasette von Karim Dabbagh (Roche, Plo Alto, CA, USA) generiert und Herrn Prof. Achim D. Gruber aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität (FU) Berlin im Jahr 2006 zur Verfügung gestellt. Seitdem erfolgte die weitere Zucht

## MATERIAL UND METHODEN

der Mäuse an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin Marienfelde). Die Zuchtpopulation wurde aufgrund der Anzahl von Zuchtpaaren regelmäßig alle fünf Generationen mit B6J-Wildtyptieren aufgefrischt, um die Bildung einer eigenen Subpopulation zu vermeiden und damit die genetische Drift zu verringern. Um die Vergleichbarkeit so exakt wie möglich zu gestalten, handelt es sich bei den untersuchten GT, WT und *Clca1*<sup>-/-</sup> um Wurfgeschwister, die nach erfolgter Genotypisierung mittels PCR den jeweiligen Versuchsgruppen (WT und *Clca1*<sup>-/-</sup>) zugeordnet wurden.

### 4.2.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Tiere wurden Schwanzspitzenbiopsien, die im Rahmen des Absetzens und Markierens der Mäuse im Alter von drei Wochen von den Mitarbeitern der FEM gewonnen wurden, verwendet. Die Isolierung der genomischen DNA wurde mittels NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Isolierung erfolgte eine photometrische Reinheitskontrolle sowie eine Konzentrationsmessung der genomischen DNA mittels NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnology, Erlangen). Für die Bestimmung der Reinheit wurde das Verhältnis der Messungen bei 260 nm (DNA) und bei 280 nm (Proteine) errechnet. Es wurde ausschließlich eine Reinheit mit einem Koeffizienten von > 1,8 akzeptiert.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierfür wurden zwei verschiedene Primersysteme eingesetzt, die jeweils verschiedene Exone abgriffen. Das „gob-5-PCR“-Primersystem (Exon 9) wurde von Karim Dabbagh (Roche, Palo Alto, CA, USA) zusammen mit den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen bereitgestellt. Das zweite „*Clca1*-PCR“-Primersystem (Exon 8) wurde von Frau Jana Enders aus dem Institut für Tierpathologie, FU Berlin, entwickelt (Tab. 7).

Tabelle 7: Primersequenzen und Schmelztemperaturen

PCR-Name	Primer-Name	Primersequenz 5'-3'	Schmelztemperatur
gob-5-PCR	Gob A2	TCCATCCAGGTCAGGGTTCTC	55,1 °C
	Gob B	CCCTTCCTCACGTTTCTCAGC	55,3 °C
	T-Neo 3	CGCGGATCCGAACAAACGACCCAACACCCG	77,6 °C
<i>Clca1</i> -PCR	<i>Clca1</i> E8s	TGGATCTGAAATTGTGCTGCT	52,0 °C
	<i>Clca1</i> E8as	AGGGCCACTGTATGGATGAT	51,0 °C
	Neo-Rs	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	51,5 °C
	Neo-Ras	AATATCACGGGTAGCCAACG	51,8 °C

Zur Bestimmung des GT wurden, analog zu den zwei Primersystemen, zwei verschiedene PCR-Protokolle sowie Zeit-Temperatur-Programme genutzt (Tab. 8 - 11).

*Tabelle 8: PCR-Ansatz „gob-5“*

Reagenzien	Eingesetztes Volumen
10-fach High Fidelity Puffer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)	2 µl
dNTP-Mix, 2 mM (Fisher Scientific)	3 µl
Primer Gob A2, 20 pmol/µl	2 µl
Primer Gob B, 20 pmol/µl 1	2 µl
Primer T-Neo 3, 20 pmol/µl	1 µl
High Fidelity DNA Polymerase (5 U/µl, Fisher Scientific)	0,3 µl
Nuklease-freies Wasser	8,7 µl
Template (genom. DNA, 10 pg- 1 µg)	1 µl
Ansatzvolumen pro Probe	20 µl

*Tabelle 9: Programmeinstellungen, PCR „gob-5“*

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	-
Zyklische Denaturierung	94 °C	10 sec	30
Anlagerung der Primer	64 °C	3 min	
Elongation	68 °C	7 min	
Finale Verlängerung	68 °C	15 min	-
Kühlung	12 °C	∞	∞

*Tabelle 10: PCR-Ansatz „Clca1“*

Reagenzien	Eingesetztes Volumen
10-fach Dream Taq Buffer Green (Fisher Scientific)	5 µl
dNTP-Mix, 2 mM (Fisher Scientific)	5 µl
Primer <i>Clca1</i> E8s, 20 pmol/µl 1 µl	1 µl
Primer <i>Clca1</i> E8as, 20 pmol/µl	1 µl
Primer Neomycin forward, 20 pmol/µl	1 µl
Primer Neomycin reverse, 20 pmol/µl	1 µl
Dream Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Fisher Scientific)	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	34,75 µl
Template (genom. DNA, 10 pg- 1 µg)	1 µl
Ansatzvolumen pro Probe	50 µl

## MATERIAL UND METHODEN

*Tabelle 11: Programmeinstellungen, PCR „Clca1“*

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	-
Zyklische Denaturierung	95 °C	50 sec	40
Anlagerung der Primer	52 °C	40 sec	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	-
Kühlung	4 °C	∞	∞

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurden 1 %-ige (gob-5-PCR) und 2 %-ige (*Clca1*-PCR) Agarosegele (Bioline, Luckenwalde) mittels 0,5-fachem Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Puffer (TBE, Tab. 12) durch Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (Pharmacia LKB, Freiburg, 1 %) unter strenger Einhaltung der Arbeitsschutzmaßnahmen hergestellt.

*Tabelle 12: Herstellungsprotokoll des 5-fachen TBE-Puffers*

Reagenzien	Menge
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, Hamburg)	108 g
Borsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	55 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0, AppliChem, Darmstadt)	40 ml
Aqua dest.	ad 2l

Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 1:5 mit 6-fach Orange Loading Dye (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt und in das ausgehärtete Gel geladen. Als Größenstandards wurden eine 50 bp-Leiter (*Clca1*-PCR, O'GeneRuler™50bp DNA ladder, Fisher Scientific GmbH) sowie eine 1 kb-Leiter (gob-5-PCR, O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder plus, Fisher Scientific GmbH) verwendet. Das Gel wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer in der Gelkammer (peqlab Biotechnology, Erlangen) für ca. 40 min. bei 35 mA an einen Spannungsgeber (Power-Pac™ Basic, Biorad, München) angeschlossen. Anschließend wurde die Auftrennung der Banden mittels UV-Licht-Betrachter (UV Transilluminator 2000, Biorad, München, Software: Quantity One 1-D Analysis Software) anhand der erwarteten Bandenhöhe der PCR-Produkte ausgewertet (Tab. 13).

Tabelle 13: Längen der erwarteten PCR-Produkte, Genotypisierung

PCR-Name	Erwartetes Produkt	Genotyp
gob-5-PCR	3 kb	Wildtyp
	1,3 kb	Knockout
Clca1-PCR	102 bp	Wildtyp
	400 bp	Knockout

#### 4.2.2 Haltungsbedingungen

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte innerhalb einer strikten SPF-Barriere konventionell in offenen Regalen. Die Makrolon®-Käfige (Zoonlab GmbH, Catsrop-Rauxel) waren mit Einstreu (Poplar Granulate, 2-3 mm, LASvendi, Soest), einem Haus (tecnoplast, Hohenpeißenberg), Nistmaterial (Zellstoff) und einem Gitterdeckel ausgestattet. Den Tieren wurde freier, unlimitierter Zugang zu Futter und Wasser (beides im Käfigdeckel) gewährt. Das Trinkwasser der Tierhaltungsbereiche wurde zur Keimreduktion auf einen pH-Wert von 4-5 mittels Salzsäure angesäuert. Die Tiere erhielten autoklavierbares, pelletiertes Maus-Zuchtfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, 1124-300, Soest), das vor der Verfütterung 20 min. bei 121 °C und 120 mbar autoklaviert wurde. Die Einstreu wurde ebenfalls mit allen weiteren Käfigbestandteilen (Käfigschale, Gitterdeckel, Haus und Nistmaterial) bei 121 °C und 120 mbar für 20 min. autoklaviert, um den hohen hygienischen Standard der Barriere und damit den Gesundheitsstatus der Tiere zu erhalten (Abb. 1).

Die tägliche Dauer der Beleuchtungsphase (Hell-Dunkel-Rhythmus) betrug 12 Stunden. Die



*Abb. 1: Standardkäfig im Tierhaltungs- und Zuchtbereich (offene Haltung). Käfigtyp II lang (530 cm<sup>2</sup> Grundfläche) mit autoklavierter Einstreu, Nistmaterial (Zellstoff), Häuschen als Versteckmöglichkeit sowie Gitterdeckel mit pelletiertem Zuchtfutter und Wasser. Foto: M. Schläfereit*

Raumtemperatur betrug 19 °C bis 22 °C bei einer relativen Luftfeuchte von 55 ± 10 % und einer Luftwechselrate von > 10-fach pro Stunde. Die Tiere wurden direkt nach dem Ergebnis der Genotypisierung randomisiert in Gruppen zu jeweils fünf Tieren in einen Käfig vom Typ II lang zusammengesetzt und in diesem Verbund belassen, um eine stabile

Gruppe über die maximale Untersuchungszeit zu gewährleisten. Ein Käfigwechsel erfolgte alle

## MATERIAL UND METHODEN

sieben Tage. Weiterhin wurden die Tiere einmal täglich von den Tierpflegern auf ihr äußeres Erscheinungsbild und ihr Verhalten (Gesundheitskontrolle) begutachtet. Zudem wurde der Zucht- und Halterraum (Wasser- und Abklatschproben) sowie die darin lebenden Tiere alle drei Monate auf mögliche Krankheitserreger nach den FELASA Empfehlungen (Mahler Convenor et al. 2014) getestet und ein Gesundheitszeugnis erstellt. Die Tiere wurden bis auf das Vorhandensein von murinem Norovirus (MNV) und *Helicobacter (H.) spp.* auf alle weiteren viralen, bakteriellen oder parasitären Erreger negativ getestet.

MNV ist das am häufigsten nachgewiesene Virus in Zucht- und Haltungseinrichtungen für Mäuse (Pritchett-Corning et al. 2009; Treuting et al. 2012). Betroffene, immunkompetente Mäuse sind zwar persistent infiziert, zeigen jedoch keine klinische Erkrankung oder das Auftreten von spezifischen Läsionen (Treuting et al. 2012; Ward et al. 2006).

*Helicobacter spp.* kommen weltweit sowohl in wissenschaftlichen als auch kommerziellen Zuchteinrichtungen vor (Donovan et al. 1993; Fox et al. 2011; Taylor et al. 2007). Abhängig vom Mausstamm sind bisher *H. hepaticus* und *H. bilis* die wichtigsten Vertreter für das Hervorrufen von *Helicobacter*-assoziierten Erkrankungen. Hierbei sind B6-Mäuse wesentlich weniger empfänglich als andere Mausstämme, wie z.B. 129. Die Leber, das Gallensystem sowie der Darmtrakt sind typische Infektionsziele (Treuting et al. 2012).

### **4.3 Präparation der Tiere und Probenentnahme**

#### **4.3.1 Tötung, Präparation und Blutentnahme**

Zum Zeitpunkt der Präparation wurden die Tiere hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens beurteilt und das KGW bestimmt. Hierzu wurden die Tiere einzeln in einem ausbruchssicheren, abgedunkelten Kästchen auf eine Waage (Acculab Vicon, Sartorius AG, Göttingen) gestellt, um etwaigen Stress möglichst zu vermeiden. Anschließend wurde dem jeweiligen Tier, je nach KGW, ein Gemisch aus Ketamin (3,2 mg, Ketamin 10 %, Selectavet, Weyarn-Holzolling) und Xylazin (1,5 mg, Xylarium 20 mg, ReboPharm, Bocholt) intraperitoneal verabreicht, um eine tiefe Narkose zu erreichen. Bis zum vollständigen Bewusstseinsverlust wurden die Tiere in ein abgedunkeltes, ausbruchssicheres Kästchen verbracht. Die ausreichende Narkosetiefe wurde anhand des Bauchhaut- und Zwischenzehenreflexes an Vorder- und Hintergliedmaße überprüft. Anschließend erfolgte die Positionierung und Fixierung des Tieres in Rückenlage auf dem Präparierplatz. Es folgte eine Laparotomie des Tieres entlang der medianen Bauchlinie mit Freilegung der *Vena (V.) cava caudalis* durch vorsichtiges Verlagern des Darmkonvolutes (Abb. 2a). Die Tiere wurden durch eine umgehende, maximale Blutentnahme (Tab. 14) aus der *V. cava caudalis* und dem damit einhergehenden, plötzlichen Herz-Kreislauf-Stillstand schnell und schmerzfrei getötet. Die Blutentnahme wurde mit einer 1 ml Spritze (Omnifix-F, B.

Braun AG, Melsungen) und einer Einmalkanüle (22 G x 1<sup>1/4</sup>, Gr. 12, Sterican®, B. Braun AG) durchgeführt. Um einen besseren, flacheren Einstichwinkel zu gewährleisten, wurde die Kanüle in der sterilen Hülle leicht nach oben gebogen. Die Blutentnahme erfolgte mit nur minimalem Unterdruck, um ein Kollabieren des Gefäßes sowie eine Zerstörung der Blutzellen zu verhindern (Abb. 2b). Die Punktion der *V. cava caudalis* hat sich im Gegensatz zu anderen Blutentnahmemethoden durch ein einfaches Erlernen der Technik, größere Entnahmeholumina und die größte Konsistenz der Blutparameter mit geringen Standardabweichungen bewährt (Schnell et al. 2002). Nach Abschluss der Blutentnahme wurde das Gefäß zusätzlich mit einem Scherenschlag eröffnet, um ein vollständiges Ausbluten des Tieres zu gewährleisten.

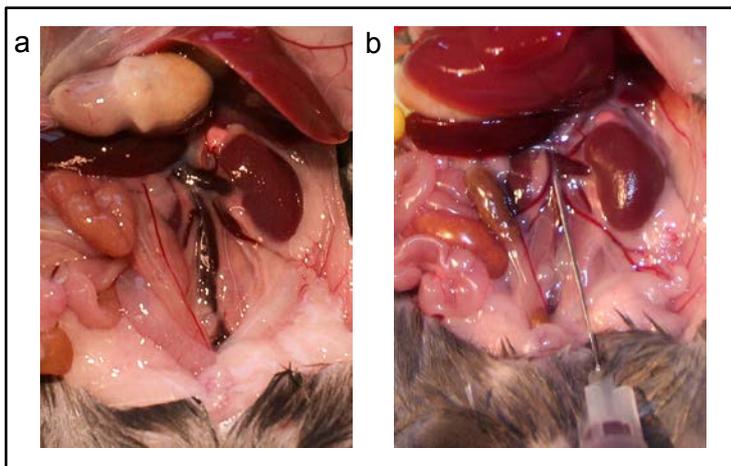


Abb. 2: a) Darstellung der Vena (*V.*) *cava caudalis* durch vorsichtiges Verlagern des Darmkonvolutes und der Milz

b) Punktion der *V. cava caudalis* ca. 0,5 cm unterhalb des Abgangs der *V. renalis* und vorsichtiges Vorschieben der Kanüle zur sicheren Lage innerhalb des Gefäßes

Tabelle 14: Blutentnahmeholumina

Alter in Lebensmonaten	Entnahmeholumen in ml (Mittelwert)	± SD	n =
2	668	75,54	10
12	764	60,41	10
18	899	165,49	10
24	831	162,43	16

#### 4.3.2 Hämatologie

Die hämatologische Untersuchung wurde in Kooperation mit der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vorgenommen. Dafür wurden 110 µl Vollblut direkt aus der Abnahmespritze vorsichtig in ein Kalium-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt, vorsichtig geschwenkt und bis zur Untersuchung (max. zwei Stunden nach Entnahme) bei 4 °C aufbewahrt. Die hämatologische Untersuchung wurde im Labor der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin am SYSMEX®XT-2000i (Sysmex GmbH, Norderstedt) und am pochH-100iV Diff (Sysmex

## MATERIAL UND METHODEN

Deutschland GmbH, Norderstedt) durchgeführt. Untersucht wurden die Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl, der Hämatokrit, die Hämoglobinkonzentration, das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV), der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC). Des Weiteren wurde eine Differentialblutbild mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie erstellt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der segmentkernigen, neutrophilen Granulozyten, der eosinophilen und basophilen Granulozyten, der Lymphozyten, der Monozyten und der Retikulozyten bestimmt. Als Referenzwerte wurden vorrangig die Werte der Kontrolltiere aber auch die angegebenen Werte aus der Literatur (Fox 2007; Fox et al. 2015; Hedrich 2012; Hrapkiewicz et al. 2013; Thrall 2012; Wolfensohn and Lloyd 2013), insbesondere die des Jackson Laboratorys (JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b), für die Hämatologie und klinische Chemie herangezogen.

### **4.3.3 Klinische Chemie**

Die klinisch-chemische Untersuchung wurde ebenfalls in Kooperation mit der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vorgenommen. Hierfür wurde die restliche Menge des Vollblutes (= Entnahmemenge -110 µl für die Hämatologie) in ein 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Nach ca. 30-minütiger Lagerung bei Raumtemperatur (20 °C) zur vollständigen Gerinnung wurden die Eppendorf-Tubes bei 840 xg für fünf Minuten zentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos®, Fisher Scientific), und anschließend wurde das überstehende Serum in ein 0,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf AG) überführt. Das Serum wurde zusammen mit dem EDTA-Blut bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C für maximal zwei Stunden gekühlt. Die klinisch-chemische Untersuchung erfolgte aus dem Serum ebenfalls im Labor der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin. Das Chemieprofil bestand aus elf Parametern. Untersucht wurden die Konzentrationen von Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Glukose, Phosphor, Total-Protein sowie die Aktivität der Enzyme alkalische Phosphatase (AP), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Creatinkinase (CK). Die Analyse erfolgte photometrisch mit dem Kone Lab 60i® (Fisher Scientific Inc., Vantaa Finnland).

### **4.3.4 Organentnahme**

In Anlehnung an die Empfehlungen der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data), NACAD (North American Control Animal Database) (Kittel et al. 2004; Morawietz et al. 2004; Ruehl-Fehlert et al. 2003; Treuting and Snyder 2015) und aus eigenen Erfahrungen wurden diverse Organe in folgender Reihenfolge vorsichtig entnommen und für weitere Untersuchungen (Gewichtsbestimmung, Histologie) bereit gestellt (Tab. 15).

Tabelle 15: Organentnahmeprotokoll (Sektion nach OECD-, RITA- und NACAD-Standard)

Organ/Gewebe	Organ/Gewebe
1. Milz	2. Leber mit Gallenblase
3. Darmkonvolut mit Magen	4. Pankreas
5. Mesenteriallymphknoten	6. Nebennieren
7. Nieren mit Ureter	8. Uterus mit Ovarien
9. Vagina und Klitorisdrüse	10. Harnblase
11. Schilddrüse und Nebenschilddrüsen	12. Sternum
13. Thymus	14. Herz
15. Aorta	16. Zunge mit Speicheldrüsen
17. Larynx	18. Trachea und Lunge
19. Ösophagus	20. Gehirn
21. Hypophyse	22. Schädel mit Nase, Augen, Ohren, Pharynx
23. Haut (Bauch, Nacken)	24. Milchdrüse
25. Wirbelsäule einschl. Rückenmark	26. Skelettmuskel (2 Lokalisationen)
27. Peripherer Nerv ( <i>N. ischiadicus</i> )	28. Linkes Hinterbein komplett

#### 4.3.5 Bestimmung der Organgewichte

Für eine aussagekräftige Bestimmung der OGW wurden die Tiere während der Präparation vollständig entblutet, um einen Einfluss der Blutfülle der einzelnen Organe auf deren Gewicht auszuschließen. Im direkten Anschluss an die jeweilige Organentnahme wurden die Gewichte von Milz, Leber, Nieren, Herz und Gehirn auf einer Feinwaage (CP64 Analytical Balance, Sartorius AG) ermittelt.

#### 4.4 Histopathologische Untersuchung

Für die histopathologische Untersuchung wurden die oben genannten Organe nach der Entnahme in bereits vorbereitete Einbettkassetten (Engelbrecht, Edermünde) verbracht (Tab. 16).

##### 4.4.1 Fixierung der Proben

Die Organe in den Einbettkassetten wurden in einem angemessenen Verhältnis von Probe zu Fixans (mind. 1:10) mit neutral gepuffertem Formalin (pH 7,0, Th.Geyer, Renningen) für 24 Stunden immersions-fixiert. Das Gehirn wurde separat in einem 15 ml Falcon (Sarstedt) mit enthaltenem Formalin fixiert, um Kompressionsartefakte durch die Einbettkassetten zu vermeiden. Für eine gleichmäßige Fixierung wurden die Formalingefäße auf einem Schüttelgerät

## MATERIAL UND METHODEN

(Polymax 2014 Heidolph Instruments GmbH, Schwabach) kontinuierlich mit 15 Runden pro Minute (rpm) bewegt.

### 4.4.2 Zuschnitt und Entkalkung der Proben

Für die weitere Prozessierung der Organe wurden diese nach dem Fixieren, anlehnend an die Schemata von RITA und NACAD, zurecht geschnitten (Kittel et al. 2004; Morawietz et al. 2004; Ruehl-Fehlert et al. 2003) und wie folgt in die Einbettkassetten verbracht (Tab. 16).

Tabelle 16: Zuschnitt des Organspektrums

Kassette	Inhalt
A	Larynx, Trachea mit Schilddrüse und Nebenschilddrüse, Lunge
B	Speicheldrüse, Thymus, Herz halbiert, Nieren mit Ureter halbiert (längs und quer)
C	Milz, Leber mit Gallenblase
D	Zunge halbiert, Magen halbiert, Mesenteriallymphknoten, Pankreas, Anteile des oralen Duodenum (0,4 cm, längs)
E	verschiedene Lokalisationen: Anschnitte von Duodenum, Jejunum, Ileum (ca. 0,3 cm quer)
F	Aorta (längs und quer), Nebennieren, <i>N. ischiadicus</i> (längs und quer), Harnblase halbiert
G	Uterus mit Ovarien und Vagina
H	in Anteilen: Nackenhaut, Bauchhaut, Milchdrüse, Skelettmuskulatur: <i>M. diaphragmaticus</i> , <i>M. longissimus dorsi</i>
I	Sternum halbiert, Wirbelsäule mit enthaltenem Rückenmark, quer lamelliert in ca. 0,4 cm dicke Scheiben, entkalkt
J	Linkes Hinterbein halbiert, entkalkt
K	Gehirn, lamelliert in ca. 0,3 cm dicke Scheiben
L	Schädel mit Nase, Augen und Ohren, lamelliert in ca. 0,3 cm dicke Scheiben, entkalkt
M	Dünndarm als „swiss roll“
N	Dickdarm als „swiss roll“
O	Sonstige pathologische Veränderungen (Tumore etc.)

Bis auf die Haut, die Milchdrüse, die Skelettmuskulatur und die Wirbelsäule einschl. Rückenmark wurden alle Organe und Gewebe vollständig, also *in toto*, eingebettet. Die Einbettung des Großteils des Dün- und Dickdarms erfolgte separat als „swiss roll“, dem „Goldstandard“ für die histologische Beurteilung von Mäusedärmen (Moolenbeek and Ruitenbergh 1981). Hierfür werden jeweils der Dünndarm und der Dickdarm mit dem innenliegenden oralen Ende spiralförmig aufgerollt. Somit erreicht man einen Anschnitt des kompletten Darmes auf einem histologischen Schnittpräparat. Die Einbettungen von Sternum, Wirbelsäule, Hinterbein und

Schädel konnten erst nach schonender Entkalkung aller knöchernen Strukturen erfolgen. Dafür wurden die Gewebe in ihren Einbettkassetten für ca. 2 bis 3 Wochen in 25 %-ige EDTA-Entkalkungslösung (Chemsolute®, TH. Geyer, Renningen) bei 37 °C verbracht. Die EDTA-Lösung wurde wöchentlich gewechselt und der Entkalkungsfortschritt regelmäßig kontrolliert.

#### 4.4.3 Entwässerung und Einbettung der Proben

Nach dem Zuschnitt wurden die Einbettkassetten mit den enthaltenen Organ- und Gewebeproben in den Einbettautomaten (Tissue-Tek® VIP, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim) überführt. Dieser übernimmt vollautomatisch die Entwässerung der Proben und die Überführung in flüssiges Paraffin innerhalb von 10,5 Stunden (Tab. 17).

*Tabelle 17: Programm zur Entwässerung und Paraffineinbettung*

Schritt	Reagenz	Zeit	Temperatur
1	Wasser	50 min	37°C
2	Ethanol 70 % (Berkel AHK GmbH, Ludwigshafen)	50 min	37°C
3	Ethanol 80 %	50 min	37°C
4	Ethanol 96 %	50 min	37°C
5	Ethanol 96 %	50 min	37°C
6	Isopropanol 100 % (Berkel AHK GmbH)	50 min	37°C
7	Isopropanol 100 %	50 min	37°C
8	Xylol (Th.Geyer)	50 min	37°C
9	Xylol	50 min	37°C
10	Paraffin (Engelbrecht)	50 min	60°C
11	Paraffin	50 min	60°C
12	Paraffin	60 min	60°C
13	Paraffin	60 min	60°C

Nach der Entnahme aus dem Einbettautomaten wurden die Kassetten mit den enthaltenen Organ- und Gewebeproben in der Ausgießstation (Cryoconsole, Type: EC350-1, Intertek, Echterdingen) im Vorratsbehälter bei 60 °C zwischengelagert, um anschließend auf der 60 °C warmen Heizplatte in Ausgießformen aus Metall eingegossen zu werden. Direkt folgend wurden die Ausgießformen für ca. fünf bis zehn Minuten auf eine -9 °C kalte Kühlplatte gestellt, um ein restloses Aushärten des Paraffins zu gewährleisten. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

#### 4.4.4 Anfertigung der Schnittpräparate

Von den in Paraffin gegossenen Organ- und Gewebeproben wurden jeweils 1 - 2 µm dünne Schnitte mit dem Mikrotom HM 325 (Microm GmbH, Neuss) unter Zuhilfenahme von Mikrotomklingen (Faust Lab Science GmbH, Klettgau) angefertigt, auf SuperFrost® Objektträger (Engelbrecht) aufgezogen und anschließend 20 min bei 60 °C getrocknet. Von den Blöcken der Kassetten A, F und G wurden drei Stufen angefertigt, um eine vollständige Anschnittsfläche der sehr kleinen Strukturen (Nerven, Eierstöcke etc.) zu garantieren.

#### 4.4.5 Färbung und Eindecken der Schnittpräparate

Das Färben der Schnitte mit Hämalaun-Eosin erfolgte vollautomatisch nach einer Entparaffinierung mittels Xylol sowie einer Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit nachfolgender Überführung in Leitungswasser (Tab. 18 und 19) im Leica CV 5030 Färbe- und Eindeckautomaten (Leica Biosystems, Nussloch).

*Tabelle 18: Entparaffinieren und Rehydrieren der histologischen Schnitte*

Schritt	Reagenz	Zeit	Wiederholungen
1	Xylol	3 min	3 x
2	Ethanol 100 %	2 min	2 x
3	Ethanol 96 %	1 min	1 x
4	Ethanol 80 %	1 min	1 x
5	Ethanol 70 %	1 min	1 x
6	H <sub>2</sub> O	1 min	1 x

*Tabelle 19: Färbeprotokoll Hämalaun-Eosin (HE)*

Schritt	Reagenz	Zeit	Wiederholungen
1	Hämalaun nach Mayer (Carl Roth GmbH)	8 min	1 x
2	H <sub>2</sub> O	5 min	1 x
3	1 %-iges, wässriges Eosin (Carl Roth GmbH)	30 sec	1 x
4	H <sub>2</sub> O	10 sec	1 x

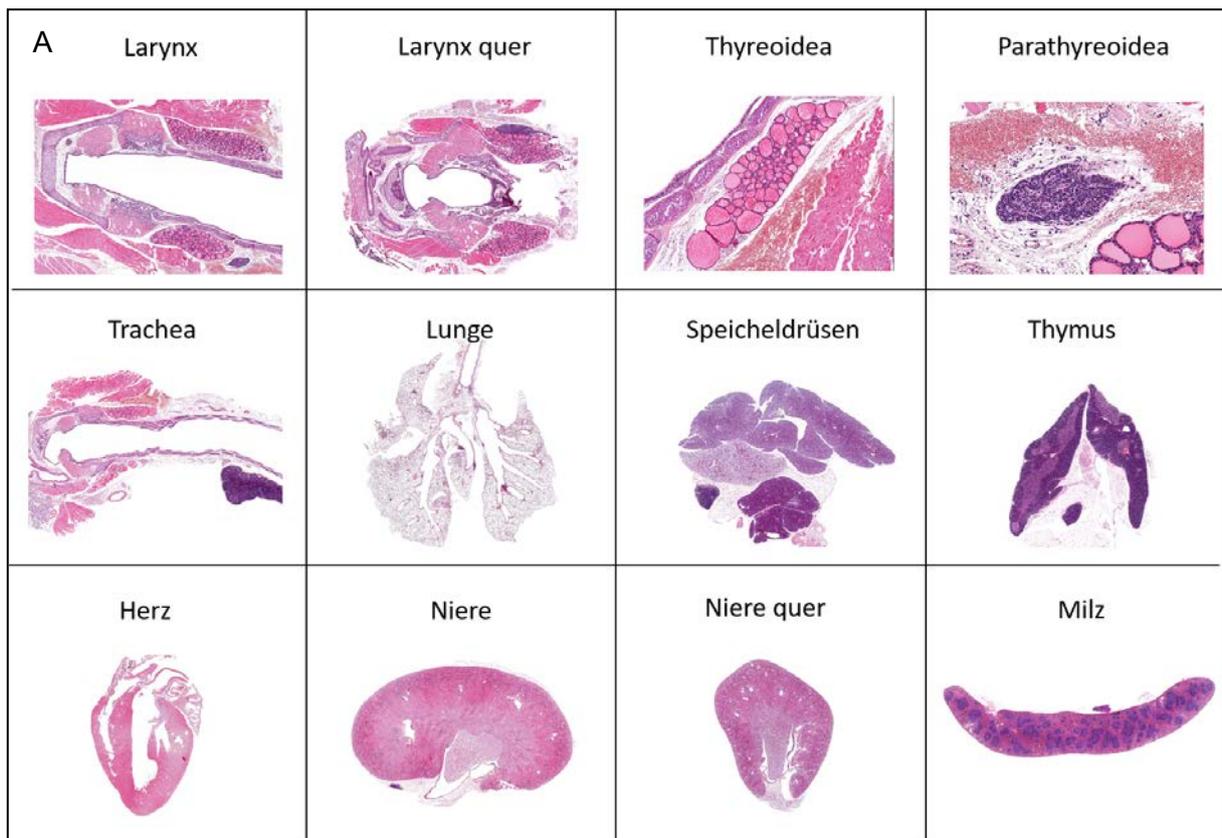
Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Tab. 20) und ebenfalls vollautomatisch mit dem Leica CV 5030 (Leica Biosystems) eingedeckt.

Tabelle 20: Dehydrieren der histologischen Schnitte

Schritt	Reagenz	Zeit	Wiederholungen
1	Ethanol 70 %	10 sec	1 x
2	Ethanol 80 %	1 min	1 x
3	Ethanol 96 %	1 min	1 x
4	Ethanol 100 %	1 min	2 x
5	Xylol	2 min	4 x

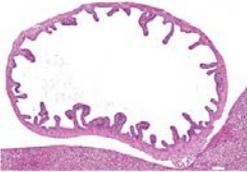
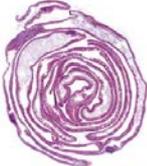
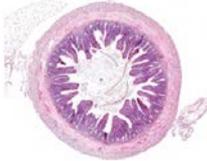
#### 4.4.6 Digitalisierung der Schnittpräparate

Alle Schnittpräparate wurden zur Übersichtsdarstellung mit dem Aperio CS2 Präparate-Scanner (Leica Biosystems) digitalisiert und die Einzelbilder mit der Software Aperio Image Scope (Version 12.3.2, Leica Biosystems) generiert (Abb. 3).

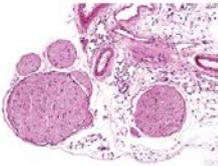
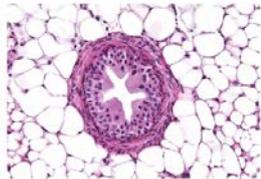
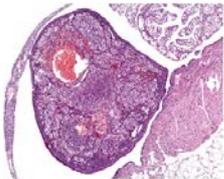
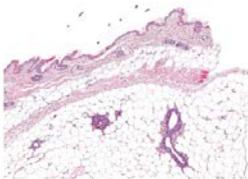


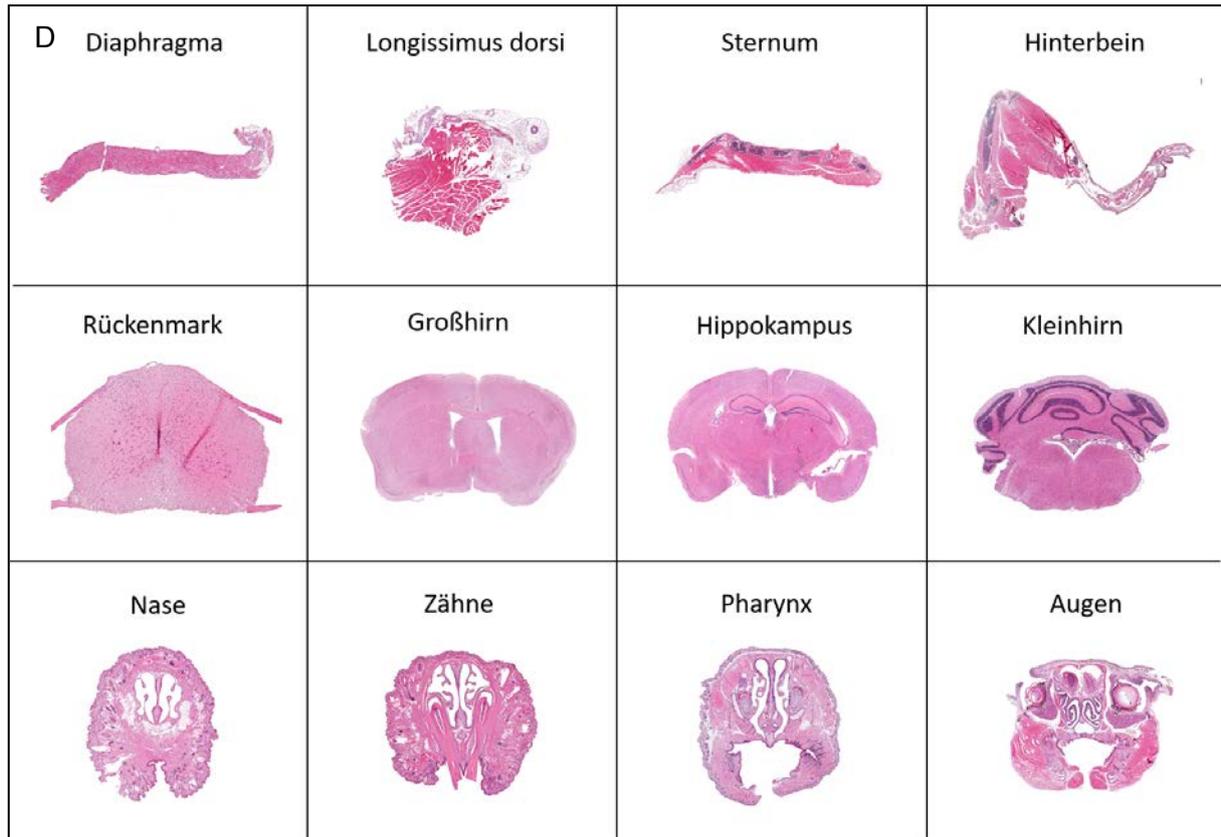
MATERIAL UND METHODEN

**B**

<p>Leber</p> 	<p>Gallenblase</p> 	<p>Zunge</p> 	<p>Ösophagus</p> 
<p>Magen</p> 	<p>Pankreas</p> 	<p>Lymphknoten</p> 	<p>Dünndarm</p> 
<p>Duodenum</p> 	<p>Jejunum</p> 	<p>Ileum</p> 	<p>Dickdarm</p> 

**C**

<p>Colon</p> 	<p>Rektum</p> 	<p>Aorta</p> 	<p>Nebenniere</p> 
<p>Nerv</p> 	<p>Nerv quer</p> 	<p>Harnblase</p> 	<p>Harnleiter</p> 
<p>Ovar</p> 	<p>Uterus</p> 	<p>Haut</p> 	<p>Mamma</p> 



*Abb. 3: A - D, Organ-/Gewebeschnitte für die histopathologische Untersuchung. Von jedem Tier wurden 44 Organe/Gewebe mit teils verschiedenen Schnittrichtungen (längs und/oder quer) auf pathologische Veränderungen untersucht. Beispielhafter Scan bei geeigneter Vergrößerung zur Ganzpräparat-Darstellung; HE-Färbung*

#### 4.4.7 Histopathologische Auswertung der Schnittpräparate

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen sowie die Generierung von digitalen Bilddateien wurden mit einem Olympus BX41 Mikroskop mit bis zu 600-facher Vergrößerung in Kombination mit der Software cellSens® (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Auswertung der histologischen Präparate systematisch nach Erstellung eines Auswertungsbogens (Tab. 21) und verblindet für die jeweilige Altersstufe und den jeweiligen GT. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden alle Organsysteme einzeln nacheinander untersucht, z.B. erst alle Lungen einer Altersstufe, dann alle Herzen und so weiter. Veränderungen, die gehäuft, über mehrere Altersstufen hinweg, auftraten, sowie alle neoplastischen Veränderungen wurden noch einmal gesondert betrachtet und hinsichtlich ihres Schweregrades und der Häufigkeit des Auftretens innerhalb einer Gruppe untersucht und grafisch dargestellt. Es wurden insgesamt 44 Organe/Gewebe der histopathologischen Untersuchung zugeführt.

Tabelle 21: Untersuchungsbogen zur histopathologischen Auswertung

Organ	Diagnose	Kommentar	Organ	Diagnose	Kommentar
Pharynx/ Larynx			Aorta		
Thyreoidea			Nebenniere		
Parathyreoidea			Nervus ischiadicus		
Trachea			Harnblase		
Lunge			Ovarien		
Speicheldrüse			Uterus		
Thymus			Vagina		
Herz			Haut		
Nieren			Milchdrüse		
Milz			Diaphragma		
Leber			Longissimus dorsi		
Gallenblase			Sternum		
Zunge			Rückenmark		
Magen			Hinterbein		
Pankreas			Gehirn		
Mesenteriallkn.			Hypophyse		
Duodenum			Nase		
Jejunum			Augen		
Ileum			Ohren		
Caecum			Dünndarm		
Colon			Dickdarm		
Rectum			Sonstiges		

#### 4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 8 (Version 8.0.1, GraphPad Software, San Diego, USA). Es erfolgte eine Untersuchung der Daten hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den beiden GT innerhalb der verschiedenen Altersstufen ausschließlich bei den „nicht-systemisch-erkrankten“ Mäusen. Dafür wurde der verteilungsfreie, nichtparametrische Rangfolgentest „Mann-Whitney-U-Test“ eingesetzt (Fay and Proschan 2010). Ein P-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistische Signifikanz eingestuft. Die Darstellung der Daten erfolgte als Scatter-Dot-Plot mit Angabe des Mittelwertes (horizontale Balken in der Mitte) und der Standardabweichung (vertikale Balken). Bei einem Teil der graphischen Auswertungen wurden die von der Statistik ausgeschlossenen Einzelwerte der „systemisch-erkrankten“ Tiere in „rot“ dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Tatsächliche Gruppengrößen

Abweichend vom geplanten Studiendesign mussten die Gruppengrößen über den Zeitraum von 24 Monaten dem Gesundheitszustand der Tiere angepasst werden. Daraus ergaben sich folgende Tierzahlen, die zur Auswertung herangezogen werden konnten (Tab. 22).

Tabelle 22: Tatsächlich ausgewertete Anzahl der Tiere pro Gruppe

Genotyp	Zeitpunkt der Untersuchung in Lebensalter	Untersuchte Parameter	Anzahl der Tiere (n) je Genotyp	Bemerkungen
WT	2 Monate	Körpergewicht, Hämatologie, Klinische Chemie, Organgewichte, Pathologische Untersuchung	5	-
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>				-
WT	12 Monate		5	-
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>				-
WT	18 Monate		5	-
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>			6	n = 1 vorzeitig verstorben, keine Autolyse, nur pathologische Untersuchung
WT			7	n = 3 vorzeitig verstorben, starke Autolyse, keine Untersuchung
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>			9	n = 1 vorzeitig verstorben, (siehe 18 Monate)
	24 Monate			

WT = Wildtyp, *Clca1<sup>-/-</sup>* = *Clca1*-Knockout, n = Anzahl

Um eine detaillierte Darstellung der Einzelwerte aller Tiere vorzunehmen, wurde bei allen graphischen Abbildungen die Scatter-Dot-Plot Darstellung gewählt. Hierbei wurden alle „systemisch“ erkrankten Tiere in der Farbe „rot“ dargestellt, um sie von den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren in „schwarz“ unterscheiden zu können.

### 5.2 „Systemisch“ erkrankte versus „nicht-systemisch“ erkrankte Tiere

Der Alterungsprozess korreliert streng mit dem Aufkommen nachteiliger gesundheitlicher Veränderungen, wie z.B. dem Auftreten maligner Neoplasien („Krebs“) oder entzündlicher Prozesse, z.B. in Leber und Nieren (Fox 2007; JAX-mice 2017; Pettan-Brewer and Treuting 2011).

## ERGEBNISSE

Diese Veränderungen können unter Umständen Auswirkungen auf eine Vielzahl von Parametern (z.B. KGW, OGW, Blutparameter) haben und somit systemische, den ganzen Körper betreffende Erkrankungen hervorrufen. Diese Tiere können somit nicht mit den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren mit altersgemäßen, „physiologischen“ Parametern direkt verglichen werden. Daher wurden alle statistischen Auswertungen ausschließlich auf die „nicht-systemisch“ erkrankten Individuen der jeweiligen Gruppe angewandt, um keine Verzerrung der Ergebnisse durch die Beeinflussung der systemischen Erkrankung zu erzielen. Als „systemisch“ erkrankte Tiere wurden diejenigen definiert, die eine Kombination aus Veränderungen im Körper- und/oder OGW mit Veränderungen in Blutbild oder klinischer Chemie sowie damit assoziierten, hochgradigen, pathologischen Veränderungen in einem oder mehreren Organsystemen aufwiesen. Ebenso wurden alle Tiere mit einer malignen Tumordiagnose als „systemisch“ erkrankt eingestuft (Tab. 23, Abb. 4). Dennoch erfolgte die graphische Darstellung der Mittelwerte in allen Gruppen unter Einbeziehung aller Tiere der jeweiligen Gruppe, unabhängig vom Erkrankungsstatus, um ein vollständiges Gesamtbild zu erzeugen.



*Abb. 4: „Systemisch“ erkranktes Tier (Nr. 1051) nach Eröffnung der Bauchhöhle. Diagnose: malignes, intestinales Lymphom (\*), Pneumonie und Hepatitis mit assoziierten Veränderungen im Körper- und Organgewicht, der alkalischen Phosphatase, der Creatinkinase, der Leukozyten, dem Hämatokrit und den Retikulozyten.*

# ERGEBNISSE

Tabelle 23: „Systemisch“ erkrankte Tiere

Genotyp	Zeitpunkt	Ursache	Hauptbefund	pro Gruppe	Tiernummer	Veränderte Parameter	
WT	2 Monate	-	-	-	-	-	
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>							
WT	12 Monate	Neoplasie	Malignes Lymphom	1	2830	KGW, OGW, Harnstoff, Glucose, Neutrophile, Lymphozyten	
		Entzündung	Hepatitis	1	3139	KGW, Glucose, AP	
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>		-	-	-	-	-	
WT	18 Monate	Neoplasie	Malignes Lymphom	1	3234	KGW, OGW, AST, GLDH	
			Histiozytäres Sarkom	1	3634	KGW, OGW, Albumin, TP, GLDH, Thrombozyten, RBC, Monozyten, Retikulozyten	
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>		Neoplasie	Malignes Lymphom	1	122	KGW, Hämatokrit, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten	
			Histiozytäres Sarkom /	1	193	KGW, OGW, Albumin, Glucose, AP, Kreatinin, Phosphor, TP, AST, ALT, CK, GLDH, WBC, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten, Retikulozyten	
	Entzündung	Panmetritis	1				
WT	24 Monate	Neoplasie	Malignes Lymphom	1	1056	KGW, OGW, Albumin, AP, CK, WBC	
			Bronchoalveoläres Adenom	1	1060	CK, GLDH, WBC	
		Entzündung	Pneumonie	1			
			Hepatitis	1	1058	OGW, AST, ALT, CK, GLDH, WBC	
<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>		Neoplasie	Malignes Lymphom		2	1046	OGW, AP, AST, GLDH, Neutrophile, Lymphozyten
						1051	KGW, OGW, AP, CK, WBC, Hämatokrit, Retikulozyten
	Hypophysenadenom		1	1047	CK, WBC		
	Entzündung		Pneumonie	1	1051	KGW, OGW, AP, CK, WBC, Hämatokrit, Retikulozyten	
			1051				
Hepatitis			4	1048	AST, CK, WBC		
				1054	OGW, WBC, Neutrophile, Lymphozyten, Retikulozyten		
	Endometritis	1	1053	KGW, OGW, Albumin, TP, WBC, RBC, Hämatokrit, Hämoglobin, Thrombozyten, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten			

## ERGEBNISSE

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, KGW = Körpergewicht, OGW = Organgewicht, TP = Total-Protein, AP = Alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, CK = Creatinkinase, WBC = Leukozyten, RBC = Erythrozyten

### 5.3 Einfluss des Genotyps auf das Körpergewicht

Um einen Einfluss des GT auf die Entwicklung des KGW beim Alterungsprozess zu untersuchen, wurde dieses bei allen Mäusen der vier untersuchten Altersgruppen (2 Monate, 12 Monate, 18 Monate und 24 Monate) bestimmt (Tab. 24 und 41).

Tabelle 24: Körpergewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

KGW	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
[g]	20,32	22,32**	27,20	28,46	31,13	26,77	28,50	28,70

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Mittelwerte je Gruppe, \*\**p* < 0,01 im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe

#### 5.3.1 Adulte Mäuse

Für die Gruppe der „adulten“ Tiere wurden zwei Monate alte Tiere gewählt, da diese am häufigsten als gerade erwachsene, ausgewachsene Versuchstiere in vielen Bereichen eingesetzt werden. Dieses Alter entspricht einem ca. 17 - 18 Jahre alten Menschen (Fox 2007). In diesem Gruppenvergleich wiesen die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit 22,32 g signifikant höhere KGW gegenüber den WT-Kontrolltieren mit 20,32 g auf.

#### 5.3.2 Mittelalte Mäuse

Für die Gruppe der „mittelalten“ Tiere wurden zwölf Monate alte Tiere ausgewählt, da hier erste altersassoziierte Erscheinungen detektiert werden können. Ebenso können mit dieser Altersgruppe progressiv fortschreitende, altersassoziierte Veränderungen, von denen, die erstmalig im hohen Alter entstehen, unterschieden werden. Dieses Alter entspricht in etwa einem 45-jährigen Menschen (Fox 2007). In diesem Gruppenvergleich konnten zwischen den „nicht-systemisch“ erkrankten GT keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich die Tendenz, dass die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit 28,46 g etwas schwerer waren als die WT-Tiere mit 27,20 g, blieb.

### 5.3.3 Alte Mäuse

Für die Gruppe der „alten“ Tiere wurden 18 Monate alte Tiere gewählt, da in diesem Alter für den B6J-Stamm bereits ausgeprägte, altersassoziierte Veränderungen zu erwarten sind (JAX-mice 2017). Dieses Alter entspricht in etwa dem eines 56-jährigen Menschen (Fox 2007). Auch in dieser Gruppe konnten bei den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden, allerdings waren hier die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit 26,77 g etwas leichter als die WT-Tiere mit 31,13 g.

### 5.3.4 Sehr alte Mäuse

Für die Gruppe der „sehr alten“ Tiere wurden 24 Monate alte Tiere gewählt, da dieses Alter das obere Limit für den Stamm B6J für geriatrische Untersuchungen darstellt (JAX-mice 2017). Dieses Alter entspricht ungefähr dem eines 70 Jahre alten Menschen (Fox 2007). In dieser Altersgruppe verhielten sich die KGW der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere beider GT nahezu identisch (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 28,7 g; WT: 28,5 g).

### 5.3.5 Entwicklung der Körpergewichte im zeitlichen Verlauf

Die „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere beider GT zeigten im Untersuchungsverlauf ein annähernd ähnliches Verhalten bezüglich der Entwicklung der KGW (Tab. 24, Abb. 5). So nahmen beide Gruppen vom 2. bis zum 12. LM gleichermaßen zu (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 6,14 g; WT: 6,88 g). Vom 12. zum 18. LM konnte bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren eine leichte Abnahme der KGW um 1,69 g beobachtet werden, die jedoch im letzten Untersuchungszeitraum vom 18. zum 24. LM wieder um 1,93 g zugenommen wurden. Die WT-Tiere nahmen vom 12. zum 18. LM nochmals um 3,93 g zu und verloren vom 18. zum 24. LM wieder 2,63 g an Gewicht, so dass beide GT am Ende des Untersuchungszeitraumes (mit 24 Monaten) ein nahezu identisches Gewicht aufwiesen (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 28,7 g; WT: 28,5 g).

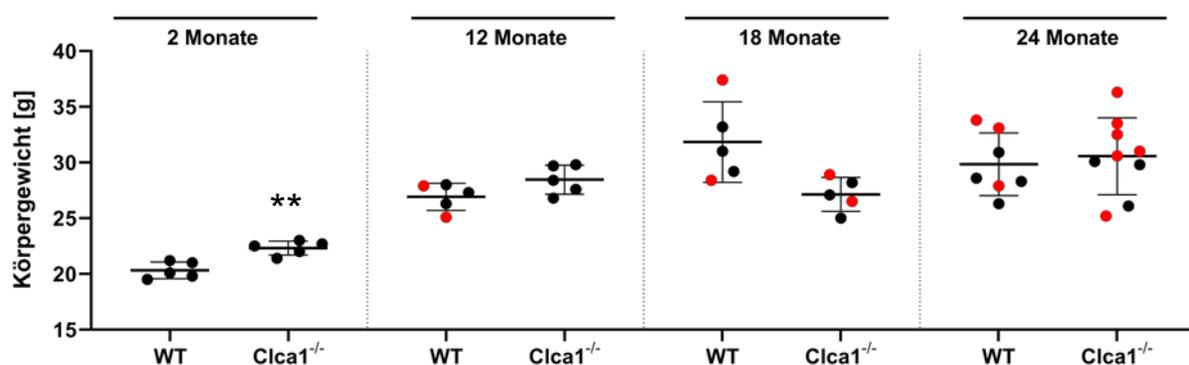


Abb. 5: Körpergewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

## ERGEBNISSE

Körpergewichte aller Altersstufen (adult = 2 Monate, mittelalt = 12 Monate, alt = 18 Monate, sehr alt = 24 Monate) in g als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter Dot Plot,  $n = 5 - 9$ , Werte in „schwarz“: „nicht-systemisch“ erkrankte Tiere; Werte in „rot“: „systemisch“ erkrankte Tiere. Statistische Signifikanzen ( $**p < 0,01$ ) wurden ausschließlich zwischen den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren bestimmt und dargestellt. WT = Wildtyp,  $Clca1^{-/-}$  =  $Clca1$ -Knockout

### 5.4 Einfluss des Genotyps auf das Organgewicht

Da das physiologische OGW immer in Abhängigkeit zu dem KGW zu betrachten ist, wurden neben dem absoluten OGW auch die relativen OGW, bezogen auf die KGW der Tiere, rechnerisch ermittelt (Tab. 25 bis 28, 41).

#### 5.4.1 Gehirngewichte, vergleichend

Das Gehirngewicht stellte sich unter allen untersuchten Organen als das mit dem konstantesten Gewichtsverlauf dar. So zeigte es bei beiden GT im zeitlichen Verlauf eine nur geringe Zunahme vom 2. bis zum 24. LM (Tab. 25, Abb. 6). Durch die Konstanz im absoluten Gewicht des Gehirns könnte man es auch zur Berechnung des relativen OGW anstatt des KGW heranziehen. Um jedoch eine Vergleichbarkeit der Daten, vor allem mit den Datenbanken der großen Zuchteinrichtungen, z.B. dem Jackson Laboratory, zu gewährleisten, wurden die relativen OGW dieser Studie dennoch auf die KGW bezogen.

Tabelle 25: Gehirngewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

Gewicht	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	$Clca1^{-/-}$	WT	$Clca1^{-/-}$	WT	$Clca1^{-/-}$	WT	$Clca1^{-/-}$
Absolut [mg]	453,02	465,62	477,57	477,78	488,47	468,63	501,50	480,50
Relativ [%]	2,23	2,09	1,76	1,68	1,57	1,75	1,76	1,68

WT = Wildtyp,  $Clca1^{-/-}$  =  $Clca1$ -Knockout, Mittelwerte je Gruppe

Auch bei den Gewichten der Gehirne fanden sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den GT.

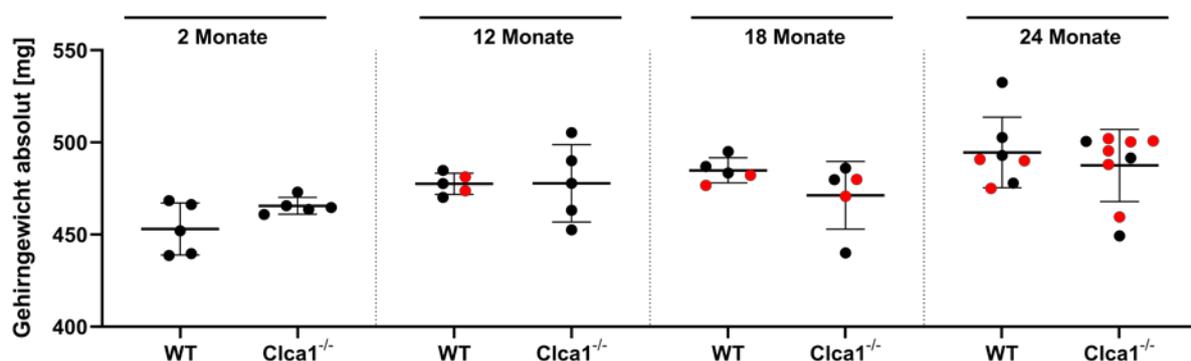


Abb. 6: Absolute Gehirngewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

Gehirngewichte aller Altersstufen in mg als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter-Dot-Plot, n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt, WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

### 5.4.2 Herzgewichte, vergleichend

Die absoluten Herzgewichte stiegen bei beiden GT gleichermaßen vom 2. bis zum 12. LM deutlich an (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 26,36 g; WT: 19,01 g), blieben bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren vom 12. bis zum 18. LM stabil, um sich vom 18. zum 24. LM erneut zu erhöhen. Die WT-Tiere hingegen wiesen ebenso vom 12. bis zum 18. LM eine Zunahme der absoluten Herzgewichte auf, welche wiederum bis zum 24. LM stabil blieben (Tab. 26, Abb. 7).

Tabelle 26: Herzgewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

Gewicht	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
Absolut [mg]	128,46	127,56	147,47	153,92	169,37	147,83	162,30	164,00
Relativ [%]	0,63	0,57	0,54	0,54	0,54	0,55	0,58	0,57

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Mittelwerte je Gruppe

Es konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den GT festgestellt werden.

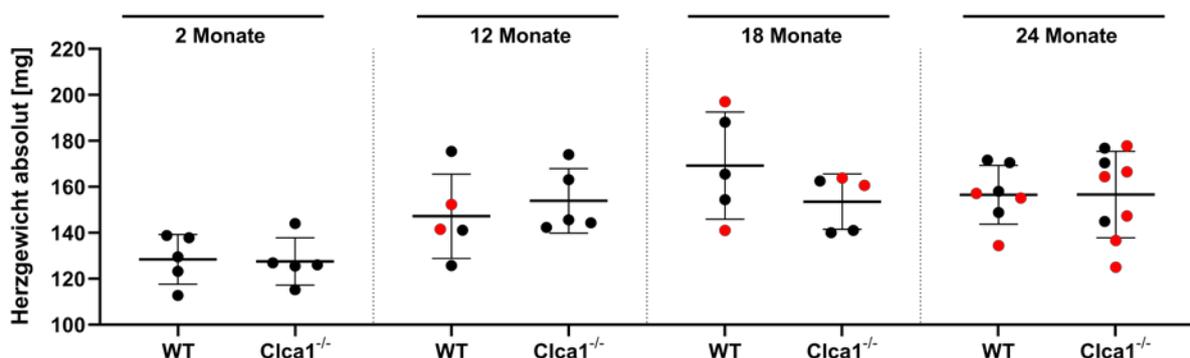


Abb. 7: Absolute Herzgewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

Herzgewicht aller Altersstufen in mg als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter-Dot-Plot, n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt, WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

## ERGEBNISSE

### 5.4.3 Lebergewichte, vergleichend

Die absoluten Gewichte der Leber stiegen über den zeitlichen Verlauf bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren vom 2. bis zum 24. LM kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu fielen sie bei den WT-Tieren, genau wie die KGW, nach einer anfänglichen Steigerung vom 2. bis zum 18. LM, vom 18. bis zum 24. LM wieder ab (Tab. 27, Abb. 8).

Tabelle 27: Lebergewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

Gewicht	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
Absolut [mg]	721,64	808,14*	973,87	881,86	996,80	911,30	933,60	972,7
Relativ [%]	3,55	3,62	3,58	3,08	3,22	3,39	3,27	3,38

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Mittelwerte je Gruppe, \**p* < 0,05 im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe

Auch wiesen die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse im 2. LM signifikant höhere, absolute Lebergewichte auf, welche jedoch im Verhältnis zu den KGW wieder relativiert wurden. Aus diesem Grund ist es essentiell, sowohl das absolute als auch das relative OGW zu bestimmen.

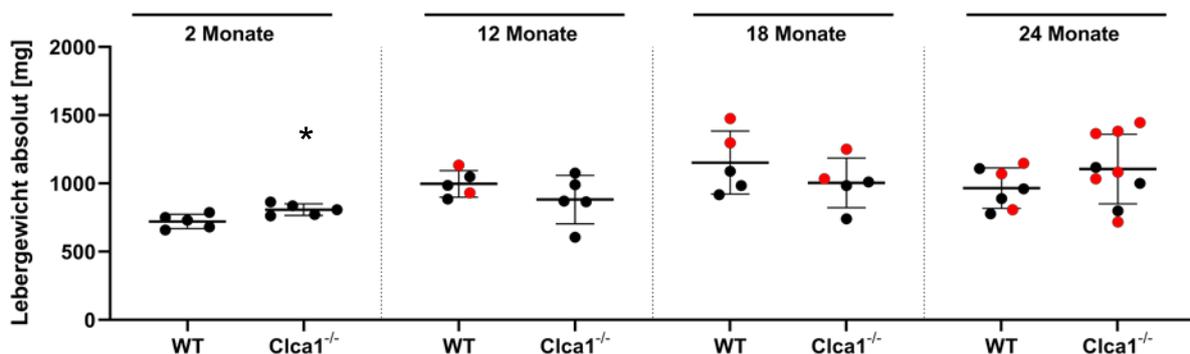


Abb. 8: Absolute Lebergewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

Lebergewichte aller Altersstufen in mg als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter-Dot-Plot, *n* = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; Statistische Signifikanzen (\**p* < 0,05) wurden ausschließlich zwischen den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren bestimmt und dargestellt. WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

### 5.4.4 Nierengewichte, vergleichend

Die absoluten Nierengewichte wiesen bei beiden GT einen sehr ähnlichen Verlauf auf. Während sie bei den WT-Tieren vom 2. bis zum 24. LM kontinuierlich anstiegen, stagnierten sie bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren vom 12. bis zum 18. LM, um dann ebenfalls zum 24. LM wieder anzusteigen (Tab. 28, Abb. 9).

Tabelle 28: Nierengewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

Gewicht	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
Absolut [mg]	245	277,64**	309,57	352,56	395,20	349,70	405,60	406
Relativ [%]	1,21	1,24	1,14	1,24	1,27	1,31	1,43	1,14

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Mittelwerte je Gruppe, \*\*p < 0,01 im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe

Wie schon bei dem Gewicht der Leber beobachtet, wiesen die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse auch bei den Nieren im 2. LM signifikant höhere, absolute Nierengewichte auf, welche jedoch im Verhältnis zu den KGW wieder relativiert wurden.

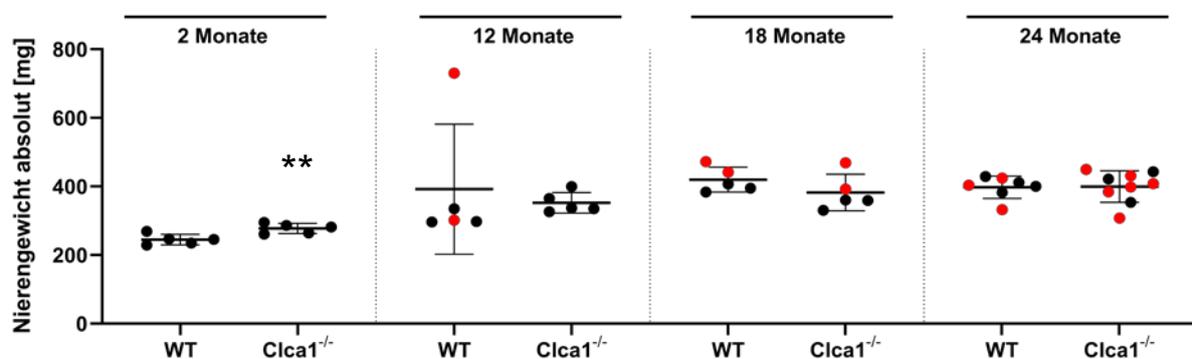


Abb. 9: Absolute Nierengewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

Nierengewichte aller Altersstufen in mg als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter-Dot-Plot, n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; Statistische Signifikanzen (\*\*p < 0,01) wurden ausschließlich zwischen den „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren bestimmt und dargestellt. WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

## ERGEBNISSE

### 5.4.5 Milzgewichte, vergleichend

Die absoluten Milzgewichte spiegelten zu den ersten drei Untersuchungszeitpunkten (2, 12, 18 Monate) den Verlauf der KGW direkt wieder. Bei beiden GT stiegen die Milzgewichte vom 2. bis zum 12. LM an, blieben bis zum 18. LM stabil, um zum 24. LM, im Gegensatz zu den KGW, erneut anzusteigen (Tab. 29, Abb. 10).

Tabelle 29: Milzgewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

Gewicht	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
Absolut [mg]	78,96	88,34	119,10	135,10	140,97	117,10	185	187,10
Relativ [%]	0,39	0,40	0,44	0,47	0,45	0,44	0,65	0,65

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Mittelwerte je Gruppe

Es konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Milzgewichten der beiden GT festgestellt werden.

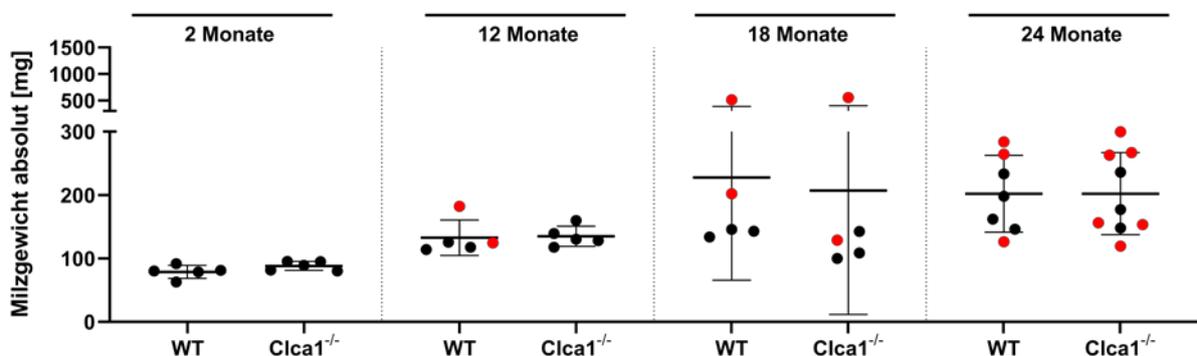


Abb. 10: Absolute Milzgewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen

Milzgewichte aller Altersstufen in mg als Mittelwerte mit Standardabweichung, Scatter-Dot-Plot, n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = systemisch erkrankt; WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

## 5.5 Einfluss des Genotyps auf die Hämatologie

Für die hämatologische Untersuchung wurden folgende Parameter für den Vergleich herangezogen und bestimmt: Anzahl der Erythrozyten x 10<sup>12</sup>/L, Hämoglobingehalt in g/dl, Hämatokrit in %, mittleres korpuskuläres Volumen (mean corpuscular volume –MCV) in fL, mittlerer

korpuskulärer Hämoglobingehalt (mean corpuscular haemoglobin –MCH) in pg, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (mean corpuscular haemoglobin concentration-MCHC) in g/dl, Anzahl der Thrombozyten x 10<sup>9</sup>/L sowie Anzahl der Leukozyten x 10<sup>9</sup>/L. Weiterhin wurde ein Differentialblutbild erstellt und die relative Anzahl an neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie den Retikulozyten bestimmt.

Für einen allgemeinen Vergleich wurden die Referenzbereiche der einzelnen Parameter aus der Literatur (Fox 2007; Fox et al. 2015; Hedrich 2012; Hrapkiewicz et al. 2013; JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b; Maddatu et al. 2012; O'Connell et al. 2015; Schnell et al. 2002; Thrall 2012; Wolfensohn and Lloyd 2013) herangezogen (Tab. 31 und 42) und mit den gemessenen Werten dieser Studie (Tab. 33, Abb. 39) verglichen. Hierbei ist jedoch unbedingt zu beachten, dass neben zahlreichen weiteren Faktoren (Tab. 30) sowohl der Ort der Blutentnahme, in diesem Fall aus der *V. cava caudalis*, als auch die verwandte Methode sowie das Gerät zur Bestimmung der Werte einen erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse haben können (Hedrich 2012; O'Connell et al. 2015; Tomlinson et al. 2013). Daher sollten immer die eigenen Kontrolltiere als direkte Vergleichsgrundlage dienen (O'Connell et al. 2015), um eine Falsch- oder Überinterpretation von veränderten Blutwerten zu vermeiden (Tomlinson et al. 2013). Grundsätzlich befanden sich fast alle der gemessenen Werte innerhalb der in der Literatur angegebenen Referenzbereiche. Lediglich die Zahl der Leukozyten war in dieser Studie, über alle Altersstufen hinweg und unabhängig vom GT, gegenüber den dafür angegebenen Referenzwerten leicht erniedrigt (2 Monate: WT: 1,99 x 10<sup>9</sup>/L; *C1ca1*<sup>-/-</sup>: 1,73 x 10<sup>9</sup>/L; 12 Monate: WT: 2,26 x 10<sup>9</sup>/L; *C1ca1*<sup>-/-</sup>: 1,92 x 10<sup>9</sup>/L; 18 Monate: WT: 1,13 x 10<sup>9</sup>/L; *C1ca1*<sup>-/-</sup>: 1,57 x 10<sup>9</sup>/L; 24 Monate: WT: 2,13 x 10<sup>9</sup>/L; *C1ca1*<sup>-/-</sup>: 2,16 x 10<sup>9</sup>/L).

Tabelle 30: Einflussfaktoren auf die Blutuntersuchung

Tierphysiologie	Blutabnahme	Analyse
Alter/Geschlecht	Studiendesign	Probenqualität
Stamm	Bewegung des Käfigs	Probenlagerung
Transport/Enrichment	Handling vor der Narkose	Probenbearbeitung
Zeitpunkt	Reihenfolge der Abnahme	Messmethode
Fütterungsstatus	Ort der Blutentnahme	Messinstrument
Begleiterkrankungen	Art der Anti-Koagulanzen	Reihenfolge der Analyse
Experimentelle Eingriffe	Verhältnis Anti-Koagulanz/Blutmenge	Verklumpung der Plättchen

Tabelle 31: Referenzwerte Hämatologie

Parameter	Einheit	Referenzbereich Literatur <sup>#</sup>	Parameter	Einheit	Referenzbereich Literatur <sup>#</sup>
Erythrozyten	10 <sup>12</sup> /L	7,0 - 12,5	Leukozyten	10 <sup>9</sup> /L	2 - 10
Hämoglobin	g/dl	10,1 - 16,2	Neutrophile	%	6,7 - 37,2
Hämatokrit	%	32,8 - 52	Lymphozyten	%	55 - 95
MCV	fL	40 - 55	Monozyten	%	0 - 10
MCH	pg	13 - 18	Eosinophile	%	0 - 7
MCHC	g/dl	29,5 - 35,1	Basophile	%	0 - 1,5
Thrombozyten	10 <sup>9</sup> /L	900 - 2000	Retikulozyten	%	0 - 11,3

<sup>#</sup>Fox 2007; Fox et al. 2015; Hedrich 2012; O'Connell et al. 2015; Schnell et al. 2002; Thrall 2012; MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration

Signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Werten der WT- und *Clca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse konnten lediglich bei den zwei Monate alten Tieren beim mittleren zellulären Hämoglobingehalt (MCH, WT: 15,16 pg; *Clca1<sup>-/-</sup>*: 15,58 pg) sowie bei der mittleren zellulären Hämoglobinkonzentration (MCHC, WT: 33,78 g/dl; *Clca1<sup>-/-</sup>*: 34,76 g/dl) festgestellt werden. Jedoch lagen diese weiterhin im physiologischen Bereich, waren ebenfalls mit den Werten des Jackson Laboratory (Tab. 42) vergleichbar und sind daher biologisch als von untergeordneter Relevanz zu interpretieren.

## 5.6 Einfluss des Genotyps auf die klinische Chemie

Für die klinisch-chemische Untersuchung des Blutserums wurden folgende Parameter für den Vergleich herangezogen und bestimmt: Albumin in g/l, Kreatinin, Harnstoff, Glucose und Phosphor in mmol/l. Das Totalprotein in g/l sowie die Enzyme Alkalische Phosphatase (AP), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Creatinkinase (CK) sowie die Glutamatdehydrogenase (GLDH) in U/l. Auch hier wurden die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte (Tab. 34, Abb. 40) mit Referenzdaten aus der Literatur (Tab. 32 und 43) verglichen (Fox 2007; Fox et al. 2015; Hrapkiewicz et al. 2013; JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b; Maddatu et al. 2012; Schnell et al. 2002; Thrall 2012; Wolfensohn and Lloyd 2013). Ebenso sollten für die klinische Chemie die Einflussfaktoren (Tab. 30) nicht außer Acht gelas-

sen werden (Hedrich 2012; O'Connell et al. 2015; Tomlinson et al. 2013). Vor allem Enzymwerte, wie die CK oder auch der Glukosewert, sind schnell von vielen Faktoren beeinflussbar und daher vorsichtig zu interpretieren. Wie schon bei der Hämatologie war auch hier der überwiegende Teil der Parameter in den angegebenen Referenzbereichen zu finden. Lediglich das Protein Albumin war über alle Altersstufen hinweg zu niedrig (2 Monate: WT: 15,66 g/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 17,96 g/l; 12 Monate: WT: 16,13 g/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 16,42 g/l; 18 Monate: WT: 17,60 g/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 16,40 g/l; 24 Monate: WT: 15,78 g/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 16,37 g/l). Dies könnte, aufgrund fehlender organischer Korrelate (ausgedehnte Leber- oder Nierenschäden), messbedingt oder aber auch fütterungsbedingt zu erklären sein. Weiterhin waren bei den zwei Monate alten *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Glukosewerte geringfügig erhöht (17,94 mmol/l). Hier könnte sowohl vermehrter Stress als auch eine zurückliegende Futteraufnahme (Mäuse waren nicht nüchtern) ursächlich gewesen sein. Da die *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu diesem Zeitpunkt deutlich schwerer waren als die WT-Tiere, könnte dies mit einer höheren Futteraufnahme korrelieren. Des Weiteren waren die Enzymwerte der CK bei den 12 Monate alten WT-Mäusen knapp oberhalb des Referenzbereiches (758,33 U/l). Auch hier kommen wieder mehrere Einflussfaktoren (Transport, Handling vor der Narkose etc.) als Entstehungsursache in Frage.

Tabelle 32: Referenzwerte klinische Chemie

Parameter	Einheit	Referenzbereich Literatur <sup>#</sup>
Albumin	g/l	25 - 48
Kreatinin	µmol/l	16 - 171
Harnstoff	mmol/l	3,5 - 10,7
Glucose	mmol/l	3,4 - 15,4
Totalprotein	g/l	35 - 103

Parameter	Einheit	Referenzbereich Literatur <sup>#</sup>
AP	U/l	< 222
AST	U/l	< 269
ALT	U/l	< 77
CK	U/l	< 720

<sup>#</sup>Fox 2007; Fox et al. 2015; Hrapkiewicz et al. 2013; Schnell et al. 2002; Thrall 2012; Wolfensohn and Lloyd 2013; AP = Alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, CK = Creatinkinase

Beim direkten Vergleich der WT-Tiere mit den *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Tieren konnten lediglich beim Harnstoff im 2. und 12. LM signifikante Unterschiede festgestellt werden (2 Monate: WT: 10,58 mmol/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 6,80 mmol/l; 12 Monate: WT: 8,5 mmol/l; *Ctca1*<sup>-/-</sup>: 6,26 mmol/l), auch wenn diese wiederum im Referenzbereich lagen. Möglicherweise steht dies mit dem zu beiden Zeitpunkten erhöhten Körper- und Nierengewicht der *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse in Zusammenhang. Im 18. und 24. LM verhielten sich die Harnstoffwerte beider GT wieder nahezu identisch.

## ERGEBNISSE

Tabelle 33: Hämatologische Untersuchung der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

		2 Monate				12 Monate				18 Monate				24 Monate			
		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>	
Parameter/ Einheit		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Erythrozyten	10 <sup>12</sup> /L	8,23	0,39	8,49	0,48	7,92	0,98	7,56	0,48	7,64	0,76	7,76	0,39	6,85	0,79	7,19	0,13
Hämoglobin	g/dl	12,48	0,65	13,22	0,53	10,97	1,17	10,88	0,43	11,17	1,32	11,13	0,61	10,20	1,10	10,27	0,28
Hämatokrit	%	36,92	1,64	38,06	2,06	33,10	3,68	32,88	1,64	34,73	3,00	34,63	1,53	33,10	3,75	32,63	1,70
MCV	fL	44,86	0,37	44,82	0,53	41,87	1,17	43,54	1,49	45,47	0,50	44,60	0,72	48,65	1,59	45,37	1,56
MCH	pg	15,16	0,17	15,58*	0,31	13,83	0,35	14,44	0,58	14,60	0,27	14,33	0,12	14,98	0,32	14,27	0,14
MCHC	g/dl	33,78	0,29	34,76**	0,67	33,13	0,21	33,10	0,41	32,10	0,99	32,13	0,64	30,78	0,36	31,47	0,71
Thrombozyten	10 <sup>9</sup> /L	1180,00	82,64	1079,40	63,43	1579,00	539,82	1435,20	320,99	1500,00	226,02	1627,33	167,11	1511,75	49,14	1766,67	135,77
Leukozyten	10 <sup>9</sup> /L	1,99	0,29	1,73	0,42	2,26	1,83	1,92	0,69	1,13	0,26	1,57	0,31	2,13	0,13	2,16	0,45
Neutrophile	%	8,02	1,63	8,98	4,68	16,10	8,77	10,18	5,66	26,93	4,07	28,57	1,85	31,90	9,36	15,20	0,99
Lymphozyten	%	85,10	5,17	88,00	5,36	75,60	8,11	79,44	4,40	60,37	8,47	57,43	1,04	57,78	12,23	60,00	3,39
Monozyten	%	5,92	4,69	2,30	1,36	11,67	7,26	7,16	3,08	12,70	9,37	13,37	2,82	13,40	2,29	17,30	3,61
Eosinophile	%	0,66	0,31	0,52	0,33	0,67	0,99	0,56	0,40	0,00	0,00	0,63	0,15	0,43	0,29	0,87	0,21
Basophile	%	0,30	0,27	0,20	0,27	0,40	0,99	2,66	2,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,99
Retikulozyten	%	5,00	0,67	4,39	0,47	5,06	0,41	5,48	1,14	6,04	0,30	5,16	0,71	9,97	2,51	5,33	0,16

MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (Mann Whitney-U-Test), Vergleich der Genotypen innerhalb eines Untersuchungszeitraumes

## ERGEBNISSE

Tabelle 34: Klinisch-chemische Untersuchung der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen

		2 Monate				12 Monate				18 Monate				24 Monate			
		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>		WT		Clca1 <sup>-/-</sup>	
Parameter/ Einheit		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Albumin	g/l	15,66	0,56	17,96	5,87	16,13	1,21	16,42	2,84	17,60	0,52	16,40	0,92	15,78	2,54	16,37	1,55
Kreatinin	µmol/l	29,60	0,89	31,00	2,35	30,00	3,00	28,20	1,92	31,00	5,20	28,67	2,08	26,25	2,50	27,33	1,53
Harnstoff	mmol/l	10,58	2,19	6,80**	1,11	8,50	0,52	6,26*	0,92	6,43	0,75	6,83	1,85	8,78	2,21	10,27	2,11
Glucose	mmol/l	15,18	1,48	17,94	3,07	14,98	1,28	11,85	3,22	14,61	2,44	13,58	1,81	12,37	1,51	12,96	5,47
Phosphor	mmol/l	3,84	0,29	4,48	0,56	3,16	0,59	3,16	0,43	2,80	0,38	2,76	0,57	2,58	0,25	2,54	0,37
Totalprotein	g/l	34,90	1,16	37,00	4,53	39,47	3,01	38,26	2,27	41,10	0,44	40,00	2,62	37,40	5,68	42,97	2,37
AP	U/l	124,20	11,88	138,20	23,36	77,33	8,02	75,00	19,29	137,33	49,40	104,67	22,37	105,75	41,61	49,00	14,73
AST	U/l	36,20	4,38	43,20	11,03	54,33	9,07	55,40	9,34	47,00	10,82	42,33	5,51	43,50	3,11	46,33	11,24
ALT	U/l	23,40	8,91	23,20	11,80	37,67	10,26	32,80	5,22	40,33	14,57	31,67	1,53	27,50	7,19	27,67	9,61
CK	U/l	114,50	14,55	155,60	71,32	758,33	1186,26	520,00	536,94	45,67	19,40	45,67	10,41	226,75	314,96	102,67	57,83
GLDH	U/l	5,20	1,64	4,67	0,58	5,33	0,58	5,20	2,78	12,00	8,54	5,33	0,58	5,75	1,00	6,67	2,12

AP = Alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, CK = Creatinkinase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (Mann Whitney-U-Test), Vergleich der Genotypen innerhalb eines Untersuchungszeitraumes

### 5.7 Einfluss des Genotyps auf pathologische Veränderungen

Bei den makroskopischen und histopathologischen Untersuchungen aller Mäuse der unterschiedlichen GT und Altersstufen (n = 47) wurden die verschiedenen pathologischen Veränderungen in „nicht-altersassoziierte“ Veränderungen und „altersassoziierte“ Veränderungen eingeteilt. Weiterhin fand eine Unterteilung dieser zwei Gruppen in Veränderungen mit i. hoher Prävalenz (dem Auftreten in der untersuchten Gesamtpopulation von > 50 %), ii. mittlerer Prävalenz (dem Auftreten in der untersuchten Gesamtpopulation von >10 % bis < 50 %) und iii. niedriger Prävalenz (dem Auftreten in der untersuchten Gesamtpopulation von < 10 %) statt. Vergleich man die Gruppen unabhängig von der Art der pathologischen Veränderungen miteinander, so konnte man feststellen, dass sich die Anzahl der pathologischen Veränderungen je Einzeltier zwischen den GT im mittel sehr ähnlich verhielt und in beiden GT mit zunehmendem Alter wie erwartet anstieg (2 Monate: WT: 1,2; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 2,2; 12 Monate: WT: 4,4; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 4,6; 18 Monate: WT: 5,2; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 6,7; 24 Monate: WT: 7,7; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 6,4).

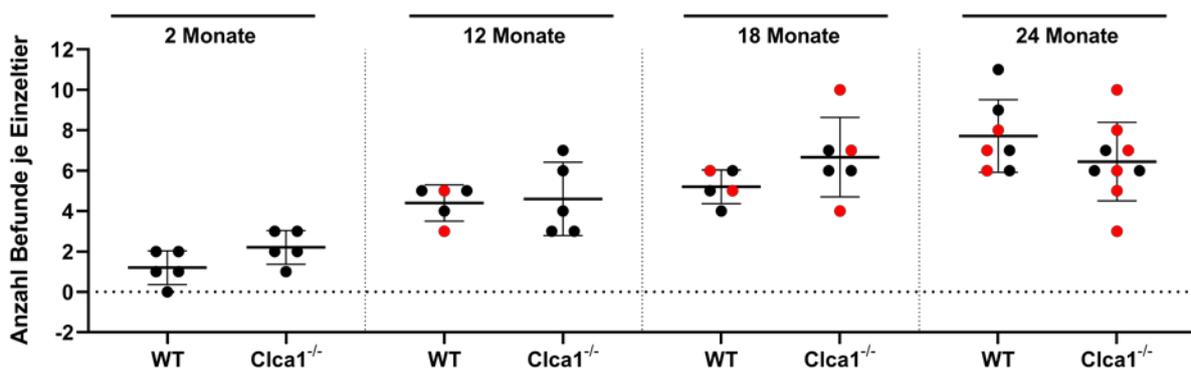


Abb. 11: Anzahl der pathologischen Veränderungen je Einzeltier über alle Altersstufen

Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte ± SD), n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

Ebenso konnte man eine Zunahme der „systemisch“ erkrankten Tiere (Abb. 11 in „rot“ und Tab. 35) über den zeitlichen Verlauf erkennen. Wenn auch nicht statistisch signifikant, so war diese bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren im Alter von 24 Monaten mit 66,6 % „systemisch“ erkrankter Tieren versus 42,8 % bei den WT-Tieren leicht erhöht. Die Zunahme der systemischen Erkrankungen korrelierte meist jedoch nicht mit einem Anstieg der pathologischen Befunde je Einzeltier bei den „systemisch“ erkrankten Mäusen im Vergleich zu den „nicht-systemisch“ erkrankten Mäusen derselben Altersstufe. Weiterhin verstarben trotz intensiver Beobachtungen insgesamt vier Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum (Tab. 35). Hier waren, wenn

auch nicht statistisch signifikant, mit 30 % betroffener Tiere die WT (3/10) deutlich häufiger betroffen als die *Clca1<sup>-/-</sup>*-Tiere (1/10) mit nur 10 %.

Tabelle 35: Anzahl der „systemisch“ erkrankten und verstorbenen Tiere über alle Altersstufen

	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
	WT	<i>Clca 1<sup>-/-</sup></i>	WT	<i>Clca 1<sup>-/-</sup></i>	WT	<i>Clca 1<sup>-/-</sup></i>	WT	<i>Clca 1<sup>-/-</sup></i>
n pro Gruppe	5		5		5	6	7	9
Syst. erkrankt	0	0	2	0	2	2	3	6
Verstorben	0	0	0	0	0	0	3	1

WT = Wildtyp, *Clca1<sup>-/-</sup>* = *Clca1*-Knockout, n = Anzahl

### 5.7.1 „Nicht-altersassoziierte“ Pathologien

Die „nicht-altersassoziierten“ Veränderungen traten ohne klare Zuordnung über alle Altersstufen hinweg auf. Insbesondere waren diese auch bei den „jüngeren“ (zwei Monate alten) Mäusen zu finden (Tab. 36, 44 und 45).

Tabelle 36: „Nicht-altersassoziierte“, pathologische Veränderungen

Prävalenz	Organsystem	Diagnose
Hoch (> 50%)	Leber	Hepatitis
Mittel (> 10 - < 50 %)	Haut	Dermatitis
Niedrig (< 10 %)	Lunge	Pleuritis
	Haut	Folikulitis, Adenitis, Steatitis, Myositis, epidermale Einschlusszyste
	Peritoneum	Peritonitis
	Niere	Glomerulonephritis, Hydronephrose, Nierenzyste
	Nebenniere	Noduläre Hyperplasie
	Harnblase	Urozystitis
	Ovarien	Ovariitis
	Uterus	Endometritis/Pyometra, Hydrometra/Mukometra
	Vagina	Adenitis
	Muskulatur	Myositis
	Rückenmark	Myelitis
Zähne	Myositis, Neuritis, Ostitis	

## ERGEBNISSE

Die mit Abstand höchste Prävalenz (96 %) innerhalb der untersuchten Gesamtpopulation wies bei den „nicht-altersassoziierten“ Pathologien die Entzündung der Leber auf (Abb. 12). Hierbei handelte es sich um eine sowohl eitrig-nekrotisierende als auch granulomatöse und lymphozytäre Hepatitis, die weitestgehend dem Bild einer durch *Helicobacter spp.*-verursachten Hepatitis entsprach und somit zu den klassischen Hintergrundpathologien bei Mäusen aus *Helicobacter spp.*-positiven Beständen zählt. Von dieser pathologischen Veränderung waren 80 - 100 % aller Mäuse einer Gruppe betroffen, und es kam durch die Persistenz des Erregers zu einer Zunahme der Ausprägung der Entzündung über die Zeit.

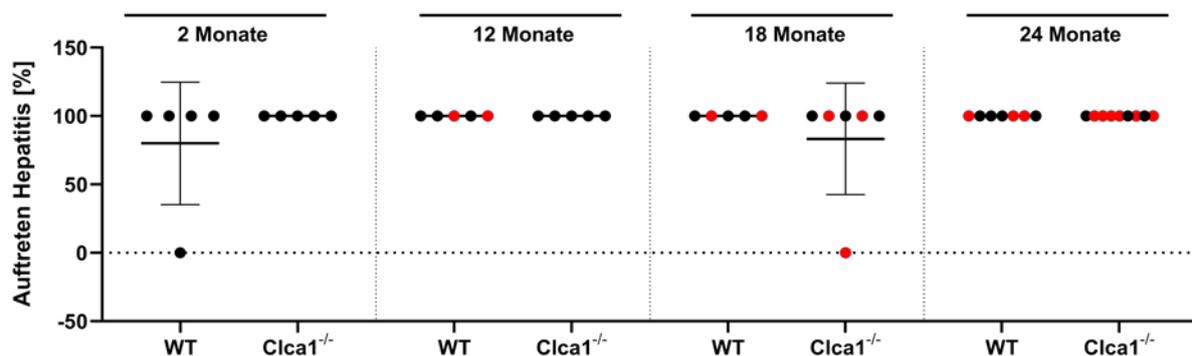


Abb. 12: Häufigkeit des Auftretens der Hepatitis über alle Altersstufen

Die Hepatitis war mit einer Prävalenz von 96 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen die häufigste pathologische Veränderung; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ ; schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

Während die zwei Monate alten Tiere unabhängig vom GT im Durchschnitt nur eine minimale bis geringgradige Hepatitis aufwiesen, war diese bei den 24 Monate alten Tieren mittelgradig ausgeprägt (Abb. 14). Signifikante Unterschiede zwischen den GT konnten zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden (Abb. 13).

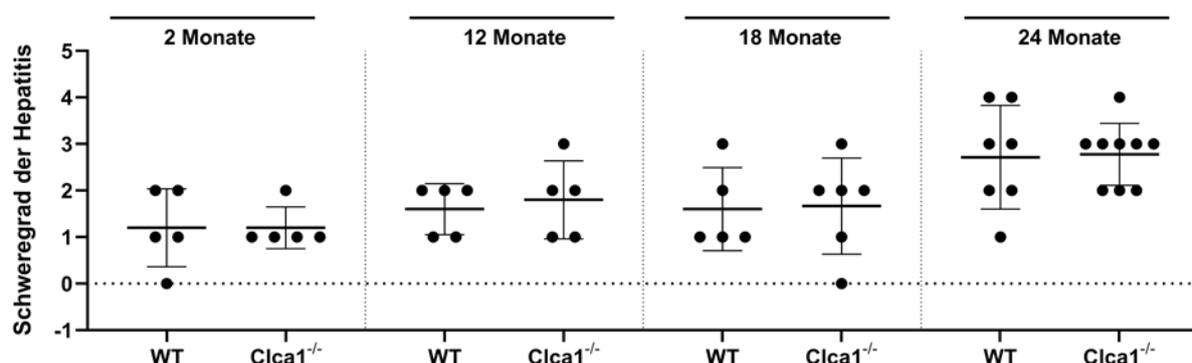


Abb. 13: Schweregrad der Hepatitis über alle Altersstufen

Ausprägung des Schweregrads der Hepatitis von 1 bis 4: 1 = minimal, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ , WT = Wildtyp,  $Clca1^{-/-}$  =  $Clca1$ -Knockout

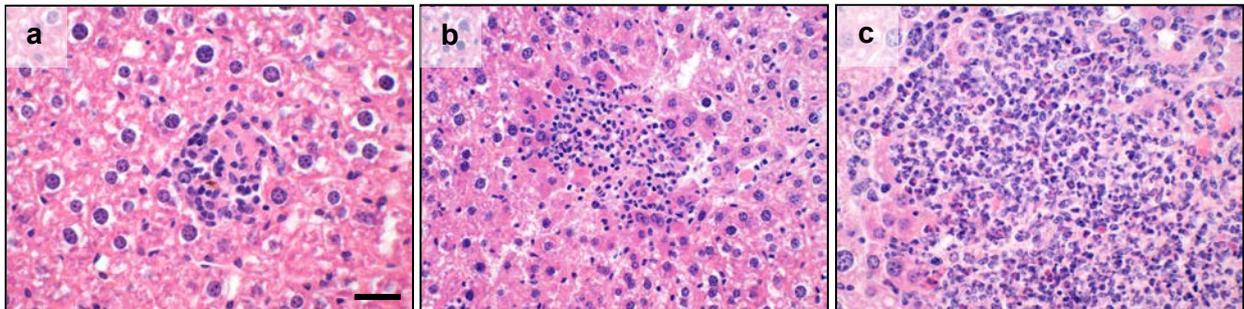


Abb. 14: Einteilung der Schweregrade der Hepatitis anhand der Größe und Anzahl der Läsionen in der Leber; a) geringgradig, b) mittelgradig, c) hochgradig; HE-Färbung, Balken a - c: 50  $\mu$ m

Weiterhin konnte bei ca. 13 % aller untersuchten Tiere eine Dermatitis festgestellt werden (Abb. 15). Bei dieser handelte es sich größtenteils um eine ulzerative Dermatitis, die aufgrund der typischen Lokalisation und des gehäuften Auftretens bei dem hier verwendeten Stamm B6 auch „B6-Dermatitis“ genannt wird. Auch hier fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens zwischen den GT der jeweiligen Altersstufe, wenn auch im Alter von 24 Monaten 1/3 (33 %) der  $Clca1^{-/-}$ -Mäuse im Gegensatz zu 1/7 (14 %) der WT-Mäuse eine Dermatitis entwickelten.



Abb. 15: links: C57BL/6-Dermatitis in typischer Lokalisation im Nackenbereich mit deutlicher Ulzeration der Hautoberfläche und Krustenbildung; rechts: histologischer Längsschnitt durch die Nackenhaut mit hochgradiger, ulzerativer Dermatitis; HE-Färbung, Balken: 200  $\mu$ m

## ERGEBNISSE

Auch die eitrige Endometritis/Pyometra, eine der pathologischen Veränderungen mit niedriger Prävalenz in der Gesamtpopulation, trat unabhängig von den Altersstufen bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen, (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 12 %; WT: 0 %) gehäuft auf (Abb. 16).

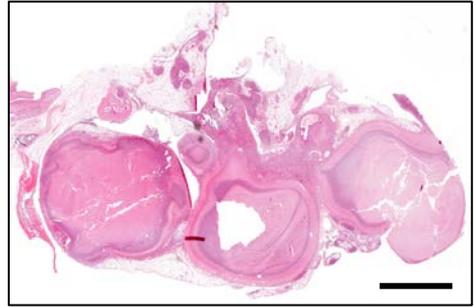


Abb. 16: Histologisches Bild von mit Eiter angefüllten Uterushörnern: hochgradige, eitrige Pyometritis (Pyometra); HE-Färbung, Balken: 500  $\mu$ m

Weiterhin zählten zu den „nicht-altersassoziierten“ Pathologien mit niedriger Prävalenz unter allen untersuchten Tieren unter anderem auch die Hydrometra/Mukometra des Uterus (9 %), die noduläre Hyperplasie der Nebennierenrinde (4 %) sowie die membranöse Glomerulonephritis der Nieren (2 %, Abb. 17). Sowohl diese als auch alle weiteren „nicht-altersassoziierten“ Pathologien (Tab. 36) traten unabhängig von GT oder Altersstufe auf.

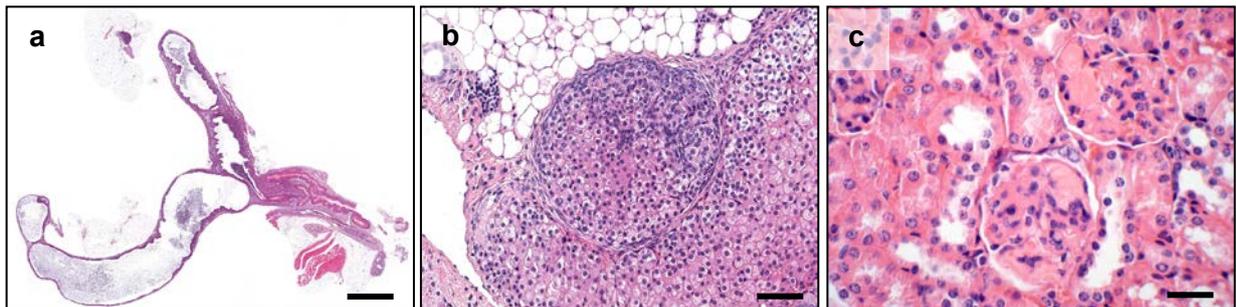


Abb. 17: Ausgewählte, „nicht-altersassoziierten“ Pathologien mit niedriger Prävalenz < 10 % im histologischen Bild; a) Uterus mit hochgradiger Mukometra, b) Nebenniere mit nodulärer Hyperplasie der Rinde, c) membranöse Glomerulonephritis; HE-Färbung, Balken: a = 500  $\mu$ m, b = 100  $\mu$ m und c = 50  $\mu$ m

### 5.7.2 „Altersassoziierte“ Pathologien

Die „altersassoziierten“ Veränderungen (Tab. 37, 44 und 45) traten ausschließlich bei über zwölf Monate alten Tieren mit steigender Prävalenz mit zunehmendem Alter auf.

Tabelle 37: „Altersassoziierte“, pathologische Veränderungen

Prävalenz	Organsystem	Diagnose
Hoch (> 50%)	Trachea	Hyalinose
	Uterus	glandulärzystische, endometriale Hyperplasie
	Zähne	Alveolitis
Mittel (< 10% - > 50 %)	Schilddrüse	Kolloidzysten
	Nieren	interstitielle Nephritis
	Ovarien	Rete ovarii Zysten, Follikelzysten, ovarielle Atrophie
Niedrig (< 10 %)	Lunge	Pneumonie
	Thymus	lymphatische Hyperplasie, Thymuszyste
	Lymphknoten	Lymphadenitis
	Herz	Myokarditis/Endokarditis
	Milz	lymphatische Atrophie
	Pankreas	Pankreatitis/Steatitis
	Milchdrüse	Laktildilatationen, Mastitis
	Wirbelsäule	Bandscheibendegeneration
	Gelenke	Arthritis, Arthrose
	Augen	retinale Atrophie

Hier gehörte die Hyalinose, beschrieben durch eine degenerative, eosinophile Veränderung des Zytoplasmas verschiedener Zellen, mit einer Prävalenz von 60 % zu den häufigsten, altersassoziierten Veränderungen. Diese fand sich hauptsächlich in der Trachea (Abb. 20) bzw. den oberen Atemwegen (nasales Epithel, olfaktorisches Epithel) der Mäuse, war aber auch sporadisch im duktalem Pankreasepithel zu finden. Die Hyalinose gehört zu einer der häufigsten bekannten Veränderungen bei alternden B6-Mäusen (Haines et al. 2001; Rosli et al. 1999; Ward et al. 2001).

Ab dem Untersuchungszeitpunkt von zwölf Monaten betraf die Hyalinose, unabhängig vom GT, zwischen 51 % und 100 % der untersuchten Mäuse der jeweiligen Altersstufe (Abb. 18). Laut Literatur kann ein vermehrtes Auftreten bereits mit vier Monaten festgestellt werden (Ward et al. 2001).

## ERGEBNISSE

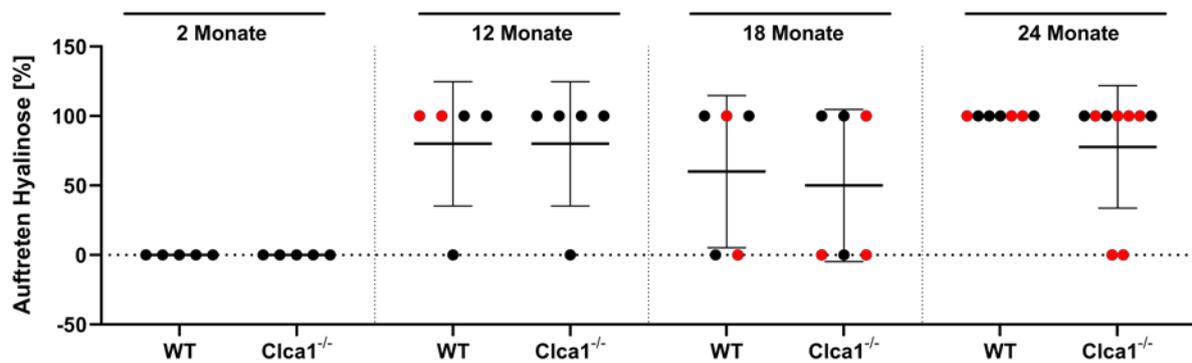


Abb. 18: Häufigkeit des Auftretens der Hyalinose über alle Altersstufen

Die Hyalinose war mit einer Prävalenz von 60 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen die häufigste, altersassoziierte, pathologische Veränderung ab dem 12. Lebensmonat; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ ; schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

Der Schweregrad variierte zum Teil erheblich zwischen den Tieren einer Gruppe, zeigte jedoch im Mittelwert keinen Unterschied zwischen den GT einer Altersstufe (Abb. 19). Diese Variation von Tier zu Tier wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Ward et al. 2001).

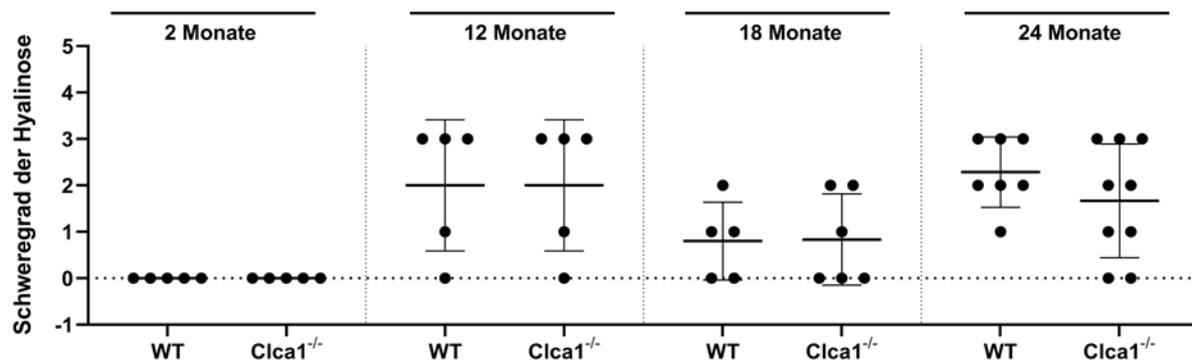


Abb. 19: Schweregrad der Hyalinose über alle Altersstufen

Ausprägung des Schweregrads der Hyalinose von 1 bis 4: 1 = minimal, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ , WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout



## ERGEBNISSE

Auch bei der GEH war der Grad der Ausprägung, unabhängig vom jeweiligen GT, sehr heterogen zwischen den Tieren einer Altersstufe. Der Schweregrad nahm mit zunehmendem Alter in beiden GT deutlich zu (Abb. 22).

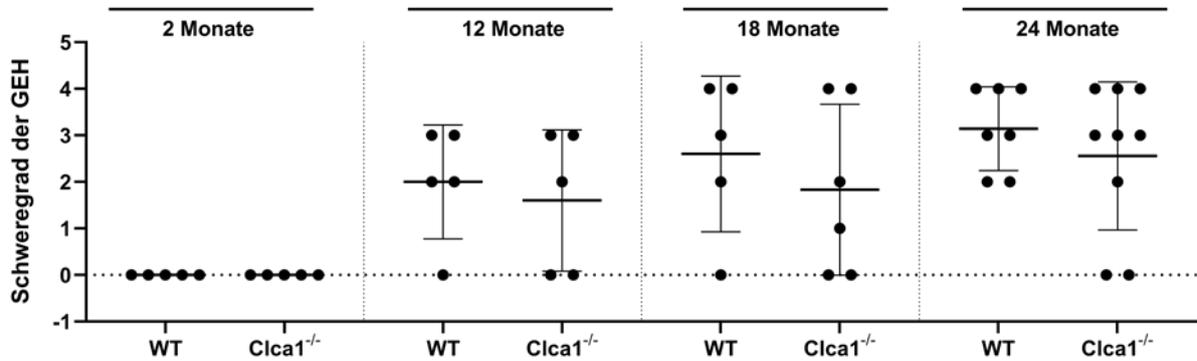


Abb. 22: Schweregrad der glandulärzystischen, endometrialen Hyperplasie (GEH) über alle Altersstufen; Ausprägung des Schweregrads der GEH von 1 bis 4: 1 = minimal, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ , WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

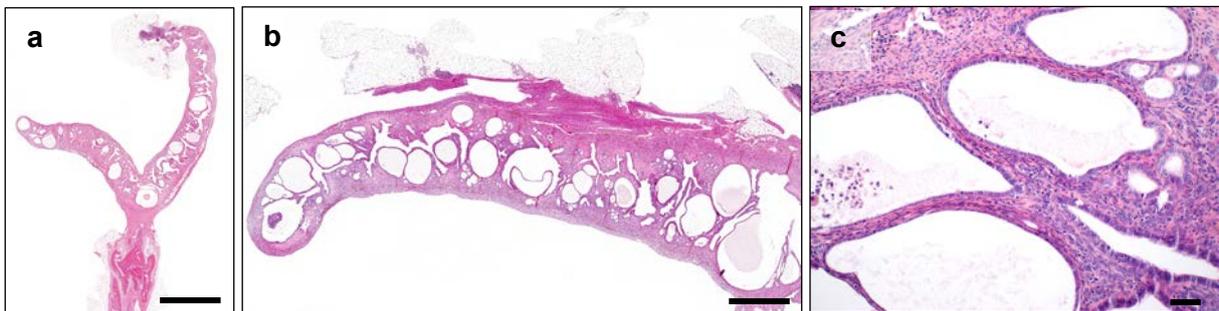


Abb. 23: Histologisches Bild der glandulärzystischen, endometrialen Hyperplasie (GEH); a) vollständiger Uterus bicornis in der Übersicht, b) hochgradige GEH des Uterushorns, c) Zunahme in der Anzahl sowie zystische Erweiterung der endometrialen Drüsen; HE-Färbung, Balken: a) 1 cm, b) 200  $\mu$ m, c) 100  $\mu$ m

Die dritte, altersassoziierte Veränderung mit ebenfalls hoher Prävalenz (57 %) war die Entzündung der Zahnalveolen (Alveolitis) der Molaren im Ober- und Unterkiefer. Diese chronisch-aktive, eitrig-granulomatöse Entzündung mit teils hochgradiger Granulationsgewebsbildung war sowohl einseitig als auch beidseitig vorzufinden und ging bei zunehmendem Alter mit einem Verlust der Zahnschmelz einher. Bei vereinzelt Tieren konnte zusätzlich ein Fort-

schreiten der Erkrankung in Form einer Osteomyelitis, Myositis und Neuritis festgestellt werden. Diese waren jedoch unabhängig von Alter und GT. Die Alveolitis war, wenn auch nicht statistisch signifikant, im 12. LM bei den WT-Tieren deutlich häufiger (WT: 80 %, *Clca1*<sup>-/-</sup>: 40 % der Tiere betroffen) als bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 24). Die Schweregrade bei den betroffenen Tieren unterschieden sich jedoch nicht voneinander (Abb. 25). Bei einem Großteil der betroffenen Tiere, unabhängig von Alter oder GT, war diese Veränderung hochgradig ausgeprägt (Abb. 26).

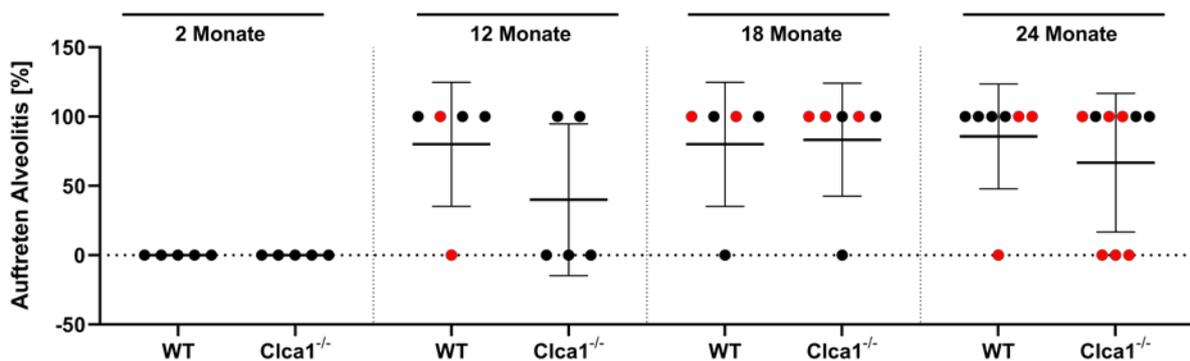


Abb. 24: Häufigkeit des Auftretens der Alveolitis über alle Altersstufen

Die Alveolitis war mit einer Prävalenz von 57 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen die dritthäufigste, altersassoziierte, pathologische Veränderung ab dem 12. Lebensmonat; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte ± SD), n = 5 - 9; schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

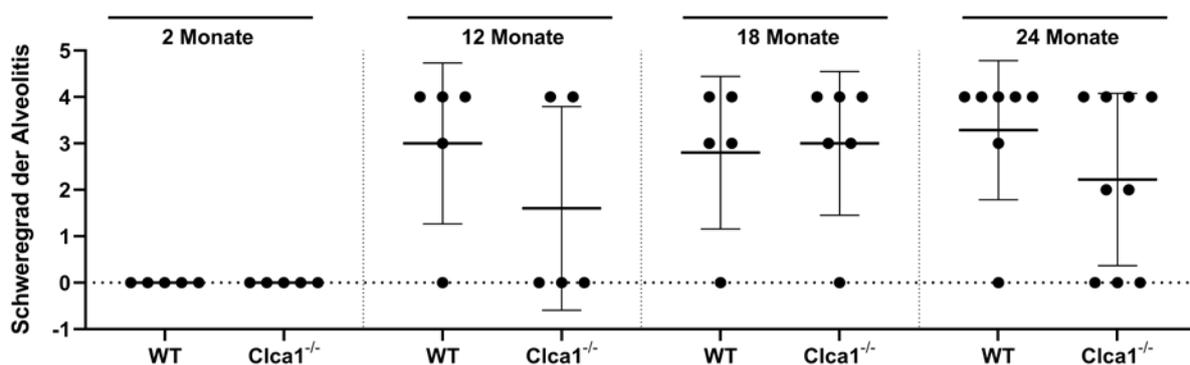


Abb. 25: Schweregrad der Alveolitis über alle Altersstufen

Ausprägung des Schweregrads der Alveolitis von 1 bis 4: 1 = minimal, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte ± SD), n = 5 - 9, WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

## ERGEBNISSE

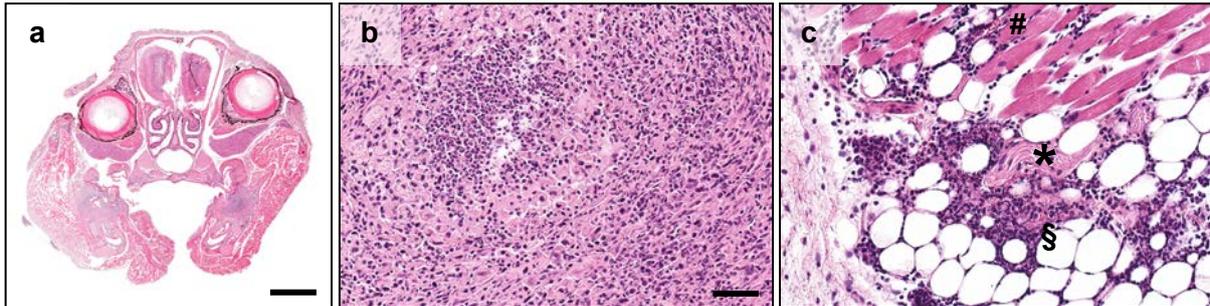


Abb. 26: Histologisches Bild der Alveolitis der Molaren im Unterkiefer; a) Übersichtsbild eines Querschnitts durch den Schädel auf Höhe von M1, b) hochgradige, chronisch-aktive, pyogranulomatöse Alveolitis, c) Ausdehnung der Entzündung auf Muskulatur, Nerven- und Fettgewebe (Myositis (#)/Neuritis (\*)/Steatitis (§)); HE-Färbung, Balken: a) 200  $\mu\text{m}$ , b) und c) 100  $\mu\text{m}$

Zu den altersassoziierten Pathologien mit mittlerer Prävalenz unter allen untersuchten Tieren zählten unter anderem die interstitielle Nephritis der Nieren (23 %), das Vorkommen von Kolloidzysten in der Schilddrüse (15 %) sowie das Auftreten von ovariellen Follikelzysten (15 %, Tab. 37, Abb. 27). Die interstitielle Nephritis trat vorrangig bei den 24 Monate alten Tieren, unabhängig vom GT, auf (WT: 43 %; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 44 %), konnte allerdings im 12. LM ausschließlich bei den WT-Tieren festgestellt werden (WT: 40 %; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 0 %). Die Kolloidzysten der Schilddrüse konnten zum 18. LM ausschließlich bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden (WT: 0 %; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 50 %). Zum 24. Monats-Zeitpunkt waren jedoch die Wildtyptiere häufiger betroffen (WT: 43 %; *Clca1*<sup>-/-</sup>: 11 %). Die Follikelzysten des Eierstocks kamen bei beiden GT ab dem 12. LM gleichermaßen häufig vor.

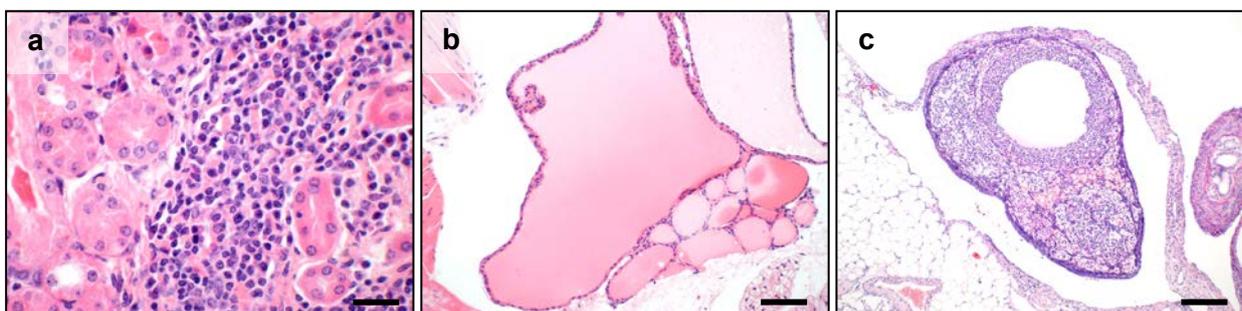


Abb. 27: Ausgewählte, altersassoziierte Pathologien mit mittlerer Prävalenz > 10 % - < 50 % im histologischen Bild; a) chronische, lymphoplasmazelluläre interstitielle Nephritis, b) Follikelzysten der Schilddrüse, c) ovarielle Follikelzyste; HE-Färbung, Balken: a = 50  $\mu\text{m}$ , b = 100  $\mu\text{m}$  und c = 200  $\mu\text{m}$

Zu den altersassoziierten Veränderungen mit niedriger Prävalenz zählten unter anderem die chronische Pankreatitis (6 %), die eitrige Pneumonie (6 %) sowie die Myokarditis mit begleitender Endokarditis (4 %, Tab. 37, Abb. 28). Die chronische Pankreatitis trat, unabhängig vom GT, ausschließlich bei 18 Monate alten Tieren auf. Die chronische Myokarditis mit assoziierter Endokarditis konnte ebenso wie die Kniegelenksarthrose als Einzeltierkrankung, unabhängig vom GT, nur bei 24 Monate alten Tieren festgestellt werden.

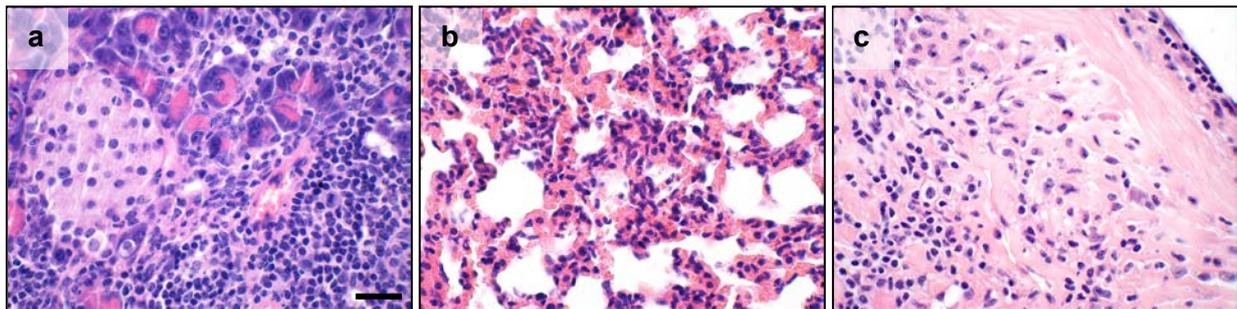


Abb. 28: Ausgewählte, altersassoziierte Pathologien mit niedriger Prävalenz < 10 % im histologischen Bild; a) chronische, lymphoplasmazelluläre Pankreatitis, b) eitrige, interstitielle Pneumonie, c) chronische, lymphoplasmazelluläre Myokarditis/Endokarditis; HE-Färbung, Balken: a - c = 50  $\mu$ m

### 5.7.3 Tumorerkrankungen

Das Auftreten von Tumorerkrankungen (Neoplasien) korrelierte bei der Gesamtheit aller untersuchten Mäuse sehr stark mit der Zunahme des Alters (Abb. 29, Tab. 38 und 44). War nach zwei Monaten Lebenszeit kein einziges Tier beider Gruppen betroffen, so konnte man bereits nach zwölf Monaten, unabhängig vom GT, das erste Auftreten von Neoplasien bei jeweils einem Tier pro GT (20 %) feststellen. Nach 18 Monaten waren bei den WT-Tieren bereits 60 % und bei den *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Tieren 68 % von einer Tumorerkrankung betroffen. Zum 24. LM hin nahm diese Zahl bei den WT-Tieren noch einmal zu (70 %), während sie bei den *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Tieren (44 %) leicht zurück ging. Grundsätzlich zählte das Auftreten von Neoplasien mit einer Prävalenz von 38 % in der Gesamtheit aller untersuchten Tiere zu den pathologischen Veränderungen mit mittlerer Prävalenz.

## ERGEBNISSE

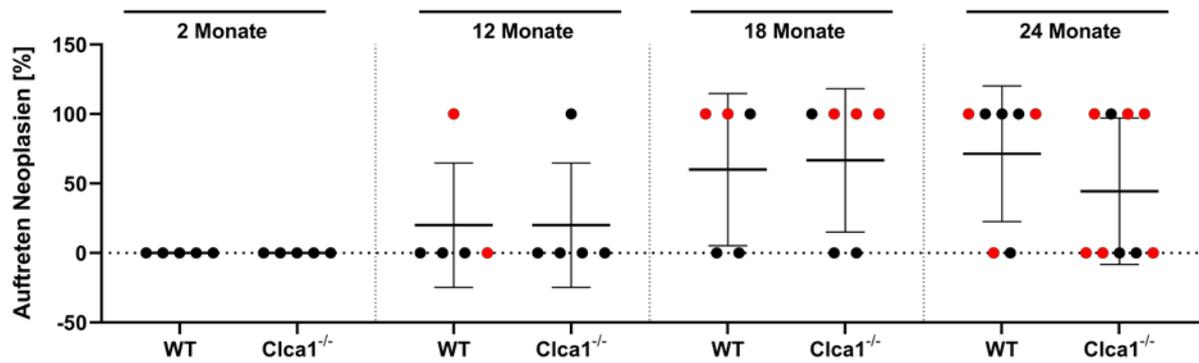


Abb. 29: Häufigkeit des Auftretens von Tumorerkrankungen über alle Altersstufen

Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD),  $n = 5 - 9$ , schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt; WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

Unter den Tumorerkrankungen war das maligne Lymphom mit einer Prävalenz von 13 % unter allen untersuchten Tieren eine der häufigsten neoplastischen Veränderungen. Ein Vorkommen mit derselben Prävalenz (13 %) zeigten auch die Adenome, dicht gefolgt von den histiozytären Sarkomen mit einer Prävalenz von 9 %. Alle weiteren Neoplasien, die jeweils nur bei einem Tier auftraten, wurden unter sonstige Neoplasien zusammengefasst und wiesen in der Gesamtheit eine Prävalenz von ebenfalls 9 % auf (Tab. 38).

Tabelle 38: Zusammenfassung der Neoplasien über alle Altersstufen

Tumorart	Organsystem	Genotyp	Zeitpunkt	n pro Gruppe
Lymphom	Intestinal	WT	12 Monate	1/5
		WT	18 Monate	1/5
		WT	24 Monate	1/7
		Clca1 <sup>-/-</sup>	24 Monate	1/9
	Multizentrisch	Clca1 <sup>-/-</sup>	18 Monate	1/6
		Clca1 <sup>-/-</sup>	24 Monate	1/9
Adenom	Parathyreoidea	Clca1 <sup>-/-</sup>	18 Monate	1/6
		WT	18 Monate	1/5
	Speicheldrüse	WT	24 Monate	1/7
	Hypophyse	Clca1 <sup>-/-</sup>	24 Monate	1/9
	Lunge (bronchoalveolär)	WT	24 Monate	1/7
	Duodenum	WT	24 Monate	1/7

Fortsetzung Tabelle 38: Zusammenfassung der Neoplasien über alle Altersstufen

Tumorart	Organsystem	Genotyp	Zeitpunkt	n pro Gruppe
Histiozytäres Sarkom	Milz/metastasierend	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	18 Monate	2/6
		<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	18 Monate	
	Knochenmark	WT <sup>#</sup>	18 Monate	1/5
Sonstige Neoplasien:				
Papillom	Salpinx	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	12 Monate	1/5
Granulosazelltumor	Ovar	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>	24 Monate	1/9
Osteom	Mandibula	WT	24 Monate	1/7

n = Anzahl, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, WT = Wildtyp

Bei den Lymphomen (Abb. 30) konnte zwischen der intestinalen (n = 4, Abb. 31) und multizentrischen Form (n = 2, Abb. 32) unterschieden werden. Lymphome traten als Einzeltierkrankungen bereits ab dem 12. LM, unabhängig vom GT, mit einer Prävalenz innerhalb einer Gruppe von mind. 14 % (WT: 24 Monate) bis max. 22 % (*Clca1*<sup>-/-</sup>: 24 Monate) auf. Auffallend war, dass ausschließlich die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse multizentrische Lymphome unabhängig vom Alter entwickelten, während das intestinale Lymphom bei beiden GT vorzufinden war.

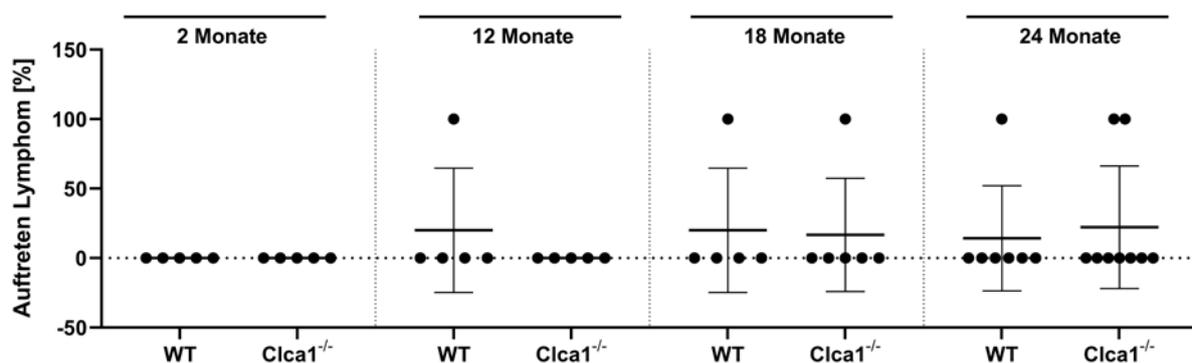
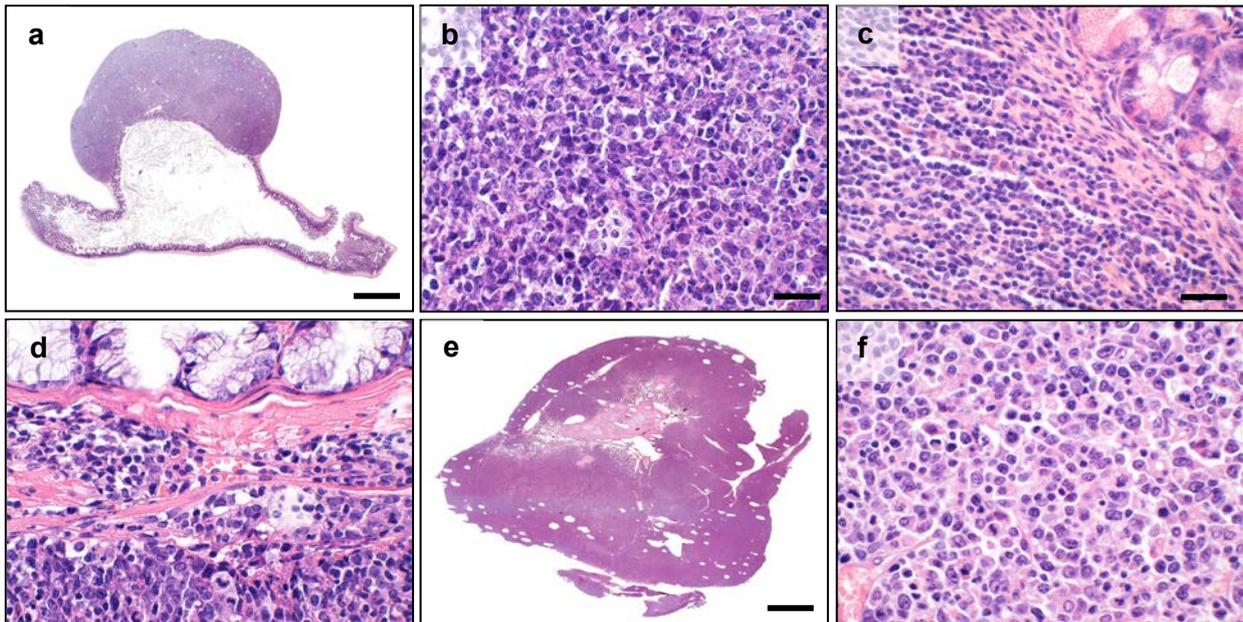


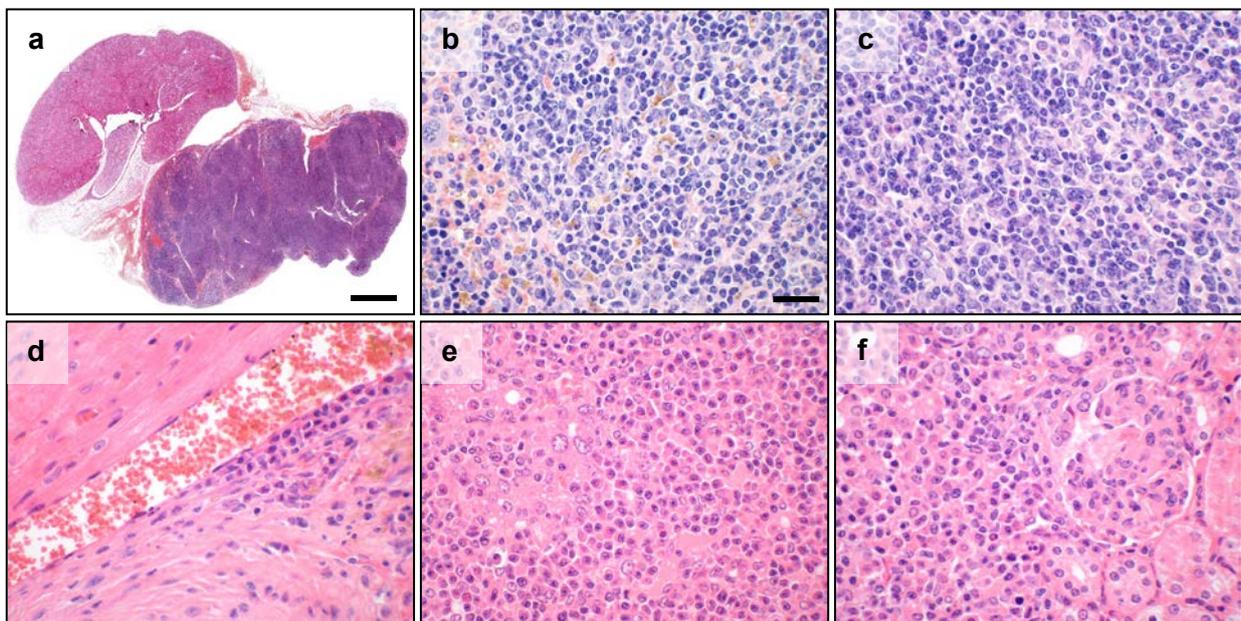
Abb. 30: Häufigkeit des Auftretens von Lymphomen über alle Altersstufen

Das maligne Lymphom war mit einer Prävalenz von 13 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen ab dem 12. Lebensmonat zu finden; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte ± SD), n = 5 - 9; WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout

## ERGEBNISSE



*Abb. 31: Histologisches Bild eines typischen intestinalen Lymphoms mit Ausbreitung in den Peyer'schen Platten des Dünndarms (a, b), der Submukosa von Dünn- und Dickdarm (c, d) sowie mit vollständiger Vereinnahmung des mediastinalen Lymphknotens (e, f); HE-Färbung, Balken: a = 250  $\mu$ m, b, d, f = 50  $\mu$ m, c = 100  $\mu$ m und e = 500  $\mu$ m*



*Abb. 32: Histologisches Bild eines typischen multizentrischen Lymphoms mit Ausbreitung in verschiedene Körperhöhlen und Organsysteme, u.a. in diverse lymphatische Einrichtungen wie die renalen Lymphknoten (a), die Milz (b), den Thymus (c) aber auch in den Herzmuskel (d), die Leber (e) und die Nieren (f); HE-Färbung, Balken: a = 150  $\mu$ m, b - f = 50  $\mu$ m*

Die Adenome (Abb. 33) fanden sich in der Nebenschilddrüse (n = 2), der Speicheldrüse (n = 1), der Hypophyse (n = 1), der Lunge (n = 1) und im Dünndarm (n = 1, Abb. 34). Diese Tumorart konnte erst ab dem 18. LM festgestellt werden und häufte sich bei den WT-Tieren mit einer Prävalenz von 43 % im 24. LM.

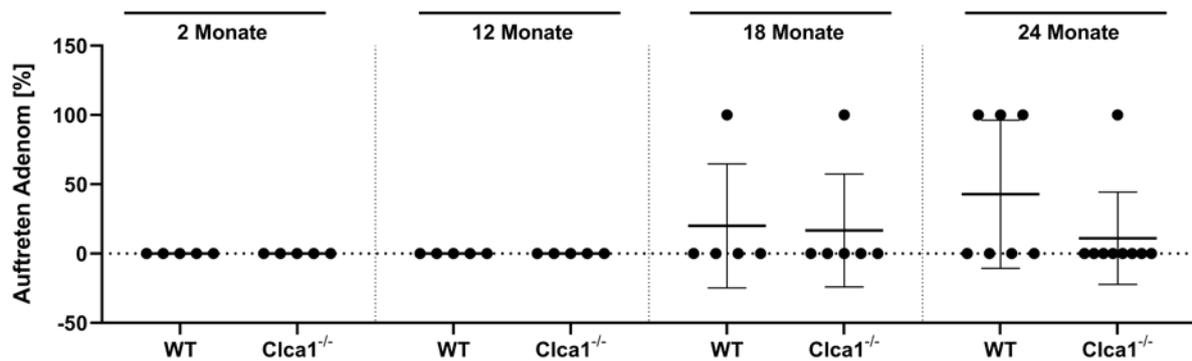


Abb. 33: Häufigkeit des Auftretens von Adenomen über alle Altersstufen

Die Adenome verschiedener Herkunft waren mit einer Prävalenz von 13 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen ab dem 18. Lebensmonat zu finden; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD), n = 5 - 9; WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

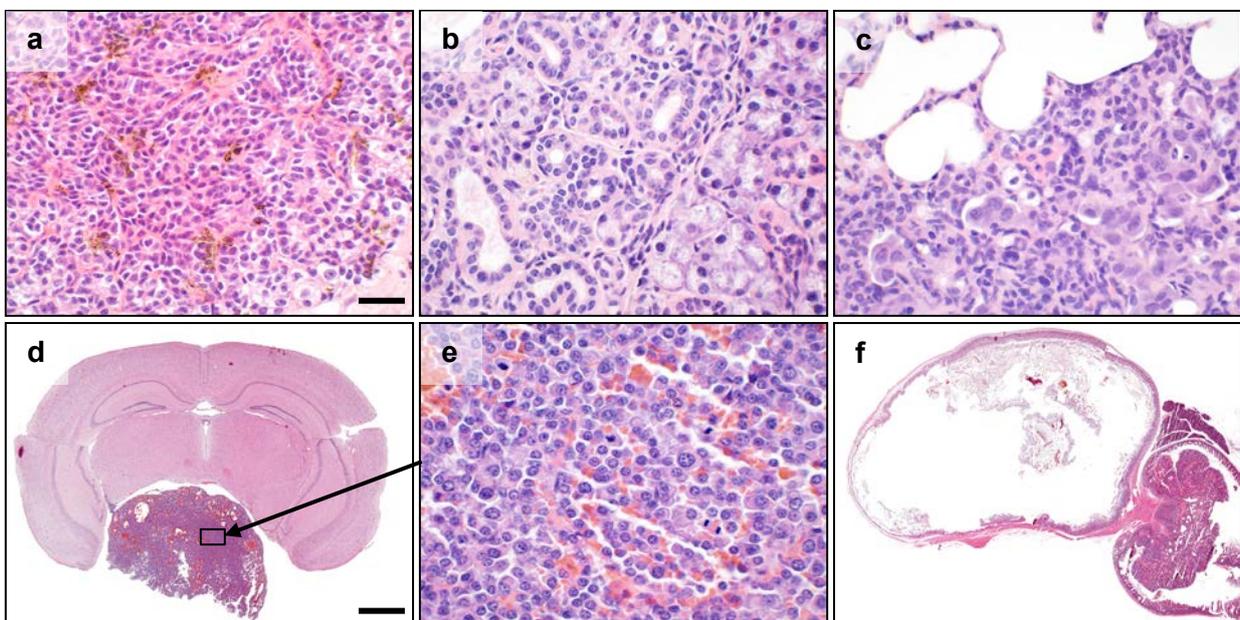


Abb. 34: Histologische Bilder der Adenome unterschiedlicher Herkunft in der Nebenschilddrüse (a), der Speicheldrüse (b), der Lunge (c), der Hypophyse (d, e) und im Dünndarm (f); HE-Färbung, Balken: a - c, e = 50  $\mu$ m, d, f = 150  $\mu$ m



Thymus (c), die Leber (d), die Lunge (e) und ins Knochenmark (f); Bei einem Tier fand sich das histiozytäre Sarkom ausschließlich im Knochenmark; HE-Färbung, Balken: a = 500  $\mu\text{m}$ , b - f = 50  $\mu\text{m}$

Zu den sonstigen Neoplasien (n = 3, Abb. 37) zählten ein Salpinxpapillom, ein Granulosazelltumor des Eierstocks sowie ein Osteom im Unterkiefer (Abb. 38). Diese traten insgesamt mit einer Prävalenz von 9 % auf und kamen als Einzeltierkrankung im 12. und 24. LM unabhängig vom GT vor.

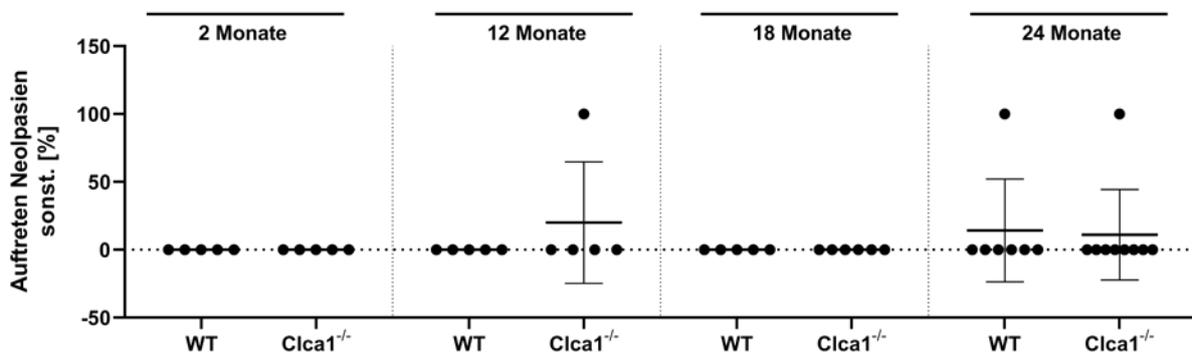


Abb. 37: Häufigkeit des Auftretens von sonstigen Neoplasien über alle Altersstufen

Die sonstigen Neoplasien, vertreten durch ein Papillom, eine Granulosazelltumor sowie ein Osteom, waren mit einer Prävalenz von 9 % unter allen untersuchten Tieren aller Altersstufen ab dem 12. Lebensmonat zu finden; Scatter-Dot-Plot (Mittelwerte  $\pm$  SD), n = 5 - 9; WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

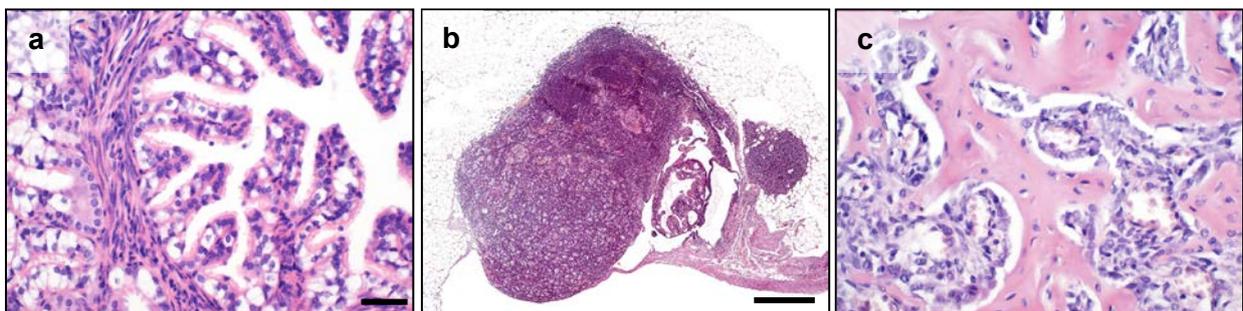


Abb. 38: Histologische Bilder der sonstigen Neoplasien unterschiedlicher Herkunft, einem Papillom der Salpinx (a), einem Granulosazelltumor des Ovar (b) sowie eines Osteoms in der Mandibula (c); HE-Färbung, Balken: a, c = 50  $\mu\text{m}$ , b = 200  $\mu\text{m}$

## 6 Diskussion

---

Das CLCA1-Protein ist aufgrund seiner großen, postulierten Funktionsdiversität langjähriger Bestandteil weltweiter Forschungsprojekte. So wurden für CLCA1 bisher sowohl modulatorische Funktionen, z.B. des respiratorischen und intestinalen Mukus sowie der Mukuszellhyperplasie in der Lunge, als Modulator einer Calcium-abhängigen Chloridleitfähigkeit, der Zytokinexpression aber auch als Zink-abhängige Metalloprotease, als Signalmolekül oder als Tumorsuppressor und prognostischer Tumormarker hypothetisiert (Alevy et al. 2012; Bothe et al. 2011; Dietert et al. 2014; Erickson et al. 2016; Gibson et al. 2005; Gruber et al. 1998b; Hu et al. 2018; Leverkus et al. 2002; Li et al. 2017; Nystrom et al. 2019; Nystrom et al. 2018; Patel et al. 2009; Patel et al. 2006; Zhou et al. 2001). Zum besseren Verständnis von Proteinfunktionen werden seit geraumer Zeit genetisch veränderte Mauslinien eingesetzt, und so wurden auch für das *Ctca1*-Gen verschiedene Knockout-Modelle generiert (Haines et al. 2001; Long et al. 2006; Patel et al. 2006; Robichaud et al. 2005).

Bisher wurde für die naive *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Maus im adulten Alter (6 Wochen bis 9 Monate) kein PT festgestellt (Erickson et al. 2015; Mundhenk et al. 2012; Nystrom et al. 2018). Nur in definierten Infektions- und Entzündungsmodellen mit z.B. *S. aureus* in der Lunge (Dietert et al. 2014) oder einer DSS-Colitis im Darm (Erickson et al. 2016) konnte ein, wenn auch gegensätzlicher, immunmodulatorischer PT hinsichtlich einer Zytokinmodulation von CXCL1 und IL-17 beschrieben werden. Mäuse entwickeln jedoch im natürlichen Alterungsprozess eine Reihe von „natürlichen“, pathophysiologischen Veränderungen, wie das Auftreten von Tumoren, Entzündungen oder degenerativen Erkrankungen (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016), die ebenso auf zahlreiche immunmodulatorische Prozesse zurückzuführen sind.

Ziel dieser Studie war es daher, mögliche Konsequenzen des Fehlens des CLCA1-Proteins und damit indirekt die Rolle von CLCA1 bei Alterungsprozessen von Mäusen zu charakterisieren. Ferner sollte festgestellt werden, ob ein Fehlen des CLCA1-Proteins Auswirkungen auf die Ausbildung von alterstypischen Veränderungen hat und ob somit ein Fehlen des Proteins einen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Mäuse im Alter nimmt. Um dies zu erreichen, wurde die alternde *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Maus umfassend phänotypisiert. Dafür wurden sowohl klinische Parameter erhoben (KGW, Hämatologie, klinische Chemie) als auch eine vollständige pathologische Untersuchung (OGW, Makroskopie, Histopathologie) durchgeführt. Es wurde das Modell einer Querschnittsalterstudie gewählt, um zu definierten Zeitpunkten eine identische Anzahl von alternden *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren WT-Geschwistertieren als Kontrolle hinsichtlich

ihrer pathophysiologischen Veränderungen untersuchen zu können. Ein Vorteil einer Querschnittsstudie im Gegensatz zur longitudinalen Studie ist der Einsatz von relativ geringen Tierzahlen (5-10 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt) und damit einhergehender personeller und finanzieller Ressourcenminimierung, die bei einem Langzeit-Studiendesign von 24 Monaten nicht zu vernachlässigen sind. Trotzdem gilt diese Art der Altersstudie als sehr gut standardisierbar, mit hoher Aussagekraft und Reproduzierbarkeit (Ackert-Bicknell et al. 2015). Einziger Nachteil, im Gegensatz zu longitudinalen Studien, ist die fehlende Möglichkeit zur Bestimmung der maximalen Lebenszeit.

Im Gegensatz zu den bisher publizierten Altersstudien wurde in dieser Studie eine Unterteilung der Gesamtpopulation der untersuchten Tiere in „systemisch“ erkrankte und „nicht-systemisch“ erkrankte Tiere für die Auswertung der Parameter KGW, OGW, Hämatologie und klinische Chemie vorgenommen. Das Auftreten von altersassoziierten, pathologischen Veränderungen, wie z.B. maligne Neoplasien oder entzündliche und degenerative Prozesse, kann einen großen Einfluss auf diese Parameter nehmen und „systemische“, den ganzen Körper betreffende Erkrankungen hervorrufen. Daher sind ein direkter Vergleich bzw. eine statistische Auswertung zu „nicht systemisch“ erkrankten Tieren mit altersgemäßen, „physiologischen“ Parametern kaum möglich, ohne die Ergebnisse auf die Gesamtpopulation bezogen falsch zu interpretieren. So können „systemisch“ erkrankte Tiere die Statistik durch die starke Veränderung der Parameter je nach Grunderkrankung derart beeinflussen, so dass sie für die Gesamtpopulation nicht mehr aussagekräftig wäre. Zum Beispiel hat eine Maus mit einem multizentrischen Lymphom und zusätzlicher Metastasierung in verschiedene Organe unter Umständen ein dramatisch verändertes Blutbild (WBC, Anteil der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten) sowie sehr hohe organspezifische Abweichungen, z.B. in den Leber- und Nierenwerten. Für den Ausschluss aus der Statistik und somit aus der altersgemäßen „Normalpopulation“ als „systemisch“ erkranktes Tier mussten für diese genannten Untersuchungsparameter folgende Kriterien erfüllt sein: Abweichungen (bezogen auf die Gesamtpopulation) im KGW/OGW und/oder Abweichungen im Blutbild/klinischen Chemie mit assoziierten, hochgradigen, pathologischen Veränderungen. Ebenso wurden alle Tiere mit einer malignen Tumordiagnose als „systemisch“ erkrankt eingestuft.

Das Fehlen des CLCA1-Proteins scheint keinen essentiellen Einfluss auf den Alterungsprozess der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus zu haben, da in dieser Studie kein ausgeprägter, einheitlicher und somit offensichtlicher Phänotyp festgestellt werden konnte. Dennoch wurden einige Auffälligkeiten und Unterschiede zu den WT-Tieren beobachtet, die im Folgenden näher beleuchtet werden. Ob es sich bei diesen Feststellungen um tatsächliche direkte Auswirkungen des Fehlens von CLCA1 oder um rein zufällige Variationen handelte, konnte mit dieser Studie jedoch noch nicht abschließend beurteilt werden.

### 6.1 Klinische Untersuchung

Für die klinische Untersuchung wurden das KGW bestimmt und das Blut hämatologisch und klinisch-chemisch untersucht. Beim KGW konnte über den gesamten Studienverlauf nur bei den zwei Monate alten Tieren signifikante Unterschiede festgestellt werden, da hier die *C/cla1<sup>-/-</sup>*-Mäuse deutlich schwerer waren als die WT-Kontrolltiere. Über den zeitlichen Verlauf relativierte sich dieses höhere Anfangsgewicht jedoch wieder, so dass es bei beiden GT zu einer physiologischen Gewichtszunahme über die Zeit mit Stagnation im Alter (ab dem 18. LM) kam. Vergleich zur Literatur: Hier fiel besonders auf, dass die Mäuse dieser Studie zwar zu Beginn der Untersuchungen (2. LM) ein höheres Anfangsgewicht aufwiesen, jedoch ab dem 12. LM ca. 10 g leichter waren als die Referenzmäuse (JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b). Hier könnten die kalorische Zusammensetzung des Futters sowie die Besatzdichte im Käfig die Hauptursachen für diese deutlichen Unterschiede sein. So bekamen unsere Tiere über die gesamte Untersuchungszeit ein spezielles Mausefutter für die Zucht mit einem Rohproteingehalt von 22 % und einem Fettgehalt von 4,5 %. Das eingesetzte Futter der Referenzmäuse war leider unbekannt.

Bei der Untersuchung des Blutes konnten aufgrund einer minimalen Standardabweichung vereinzelt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den GT unserer Studie festgestellt werden (MCH, MCHC, Harnstoff). Hierbei wiesen die *C/cla1<sup>-/-</sup>*-Tiere höhere MCH- und MCHC-Werte im 2. LM sowie niedrigere Harnstoffwerte im 2. und 12. LM auf. Diese lagen jedoch immer in den angegebenen Referenzbereichen der Literatur (Tab. 31, Tab. 32) und sind daher wahrscheinlich als biologisch „nicht signifikant“ anzusehen. Vergleich zur Literatur: Über den gesamten Untersuchungszeitraum der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere waren die Leukozytenzahlen sowie die Albuminkonzentration niedriger, wohingegen die Glukose- und Creatinkinasekonzentrationen punktuell höher waren als in der Literatur beschrieben (Fox 2007; Fox et al. 2015; Hedrich 2012; Hrapkiewicz et al. 2013; JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b; Maddatu et al. 2012; O'Connell et al. 2015; Schnell et al. 2002; Thrall 2012; Wolfensohn and Lloyd 2013). Hier kommen viele verschiedene Einflussfaktoren (Tab. 30), wie z.B. die Fütterung und Haltung der Mäuse, Stress, Handling sowie messbedingte Unterschiede in der Methode oder dem Gerät, in Betracht (Hedrich 2012; O'Connell et al. 2015; Tomlinson et al. 2013). Dadurch wird noch einmal mehr unterstrichen, wie wichtig die Mitführung von Kontrolltieren und damit der Erstellung laboreigener Referenzwerte (O'Connell et al. 2015) für diese Untersuchungen ist, um eine Fehlinterpretation zu vermeiden (Tomlinson et al. 2013).

**Zusammenfassend** konnte in der klinischen Untersuchung der Mäuse festgestellt werden, dass die zwei Monate alten *C/cla1<sup>-/-</sup>*-Mäuse signifikant schwerer waren als die WT-Tiere.

Ebenso wiesen die *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Tiere in der Untersuchung des Blutes statistisch signifikant höhere MCH- und MCHC-Werte im 2. LM sowie niedrigere Harnstoffwerte im 2. und 12. LM auf.

## **6.2 Pathologische Untersuchung**

Für eine vollständige pathologische Untersuchung wurden während der Präparation der Tiere die OGW von Gehirn, Herz, Leber, Nieren und Milz bestimmt. Nach anschließender Fixierung und Aufarbeitung aller Organ- und Gewebeproben fand eine umfassende, makroskopische und histopathologische Untersuchung von insgesamt 44 Organen/Geweben sowie den aufgetretenen Einzeltier-spezifischen Veränderungen bei jeder Maus statt. Weiterhin wurde die Anzahl der pathologischen Befunde je Einzeltier sowie die Anzahl der „systemisch“ erkrankten Tiere je Zeitpunkt und Gruppe erhoben.

Für die Bestimmung der OGW war eine einheitliche Präparation sowie die Verwendung eines akkuraten Messinstruments von höchster Bedeutung, da aufgrund des niedrigen Gewichtes schon minimale Abweichungen der Präparation größte Bedeutung für die Interpretation der Gewichte haben können. Zwischen den beiden GT konnten bei den Gehirn-, Herz- und Milzgewichten über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Unterschiede festgestellt werden. Lediglich im 2. LM war die absoluten Gewichte der Nieren und der Leber bei den *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse leicht erhöht, jedoch die relativen OGW, bezogen auf die KGW, nahezu identisch zu den WT-Tieren. Da die *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse zum ersten Untersuchungspunkt nach zwei Monaten auch höhere KGW aufwiesen, sind auch hier höhere, absolute Gewichte der Stoffwechsellorgane Leber und Niere nicht verwunderlich, betonen aber die Relevanz der Bestimmung beider OGW (absolut und relativ), um auch hier eine umfassende Bewertung in Bezug auf die KGW der Tiere vornehmen zu können. Vergleich zur Literatur: Hier waren über den gesamten Untersuchungszeitraum die Lebergewichte sowie im 2. LM die Nierengewichte der Referenztiere deutlich erhöht im Vergleich zu den Tieren dieser Studie. Wie für das deutlich höhere KGW der Referenzmäuse (JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b) könnte auch hier als wahrscheinlichste Ursache eine unterschiedliche Zusammensetzung des Futters in Verbindung mit einer verminderten Bewegung der Mäuse in Frage kommen.

Für die histopathologische Untersuchung wurden die Organe und Gewebe nach OECD-, RITA- und NACAD-Richtlinien entnommen und prozessiert. Die Beurteilung erfolgte für den Untersuchenden verblindet sowie systematisch mit Hilfe eines eigens erstellten Auswertungsbogens (Tab. 21). Die durchführende Person und Verfasserin dieser Arbeit, Kristina Dietert, verfügt über jahrelange Expertise in der Auswertung experimenteller Mausstudien und ist

## DISKUSSION

Fachtierärztin für Pathologie und Versuchstierkunde. Zudem wurden alle pathologischen Veränderungen durch einen zweiten, ebenfalls sehr erfahrenen Mauspathologen mit Diplomate Status des European College of Veterinary Pathologists verifiziert.

Für eine bessere Unterteilung der beobachteten Läsionen wurden diese in „nicht-altersassoziierte“ und „altersassoziierte“, pathologische Veränderungen eingeteilt. Zu den „nicht-altersassoziierten“ Pathologien zählten jene Veränderungen, die ohne klare, zeitliche Zuordnung über alle Altersstufen hinweg auftraten und insbesondere auch bei den „jüngsten“, zwei Monate alten Tieren vorzufinden waren. Demnach zählten zu den „altersassoziierten“ Veränderungen jene, die ausschließlich ab dem 12. LM mit steigender Prävalenz im zunehmenden Alter auftraten. Innerhalb der „nicht-altersassoziierten“ und „altersassoziierten“ Veränderungen fand wiederum zur besseren Übersicht eine Unterteilung in solche mit hoher, mittlerer und niedriger Prävalenz, bezogen auf die untersuchte Gesamtpopulation, statt. Die Tumorerkrankungen wurden hiervon unabhängig noch einmal gesondert betrachtet. Weiterhin wurde die Anzahl der Befunde je Einzeltier sowie die Anzahl der „systemisch“ erkrankten und vorzeitig spontan verstorbenen Mäuse über alle Altersstufen hinweg erhoben.

Die Anzahl der pathologischen Veränderungen je Einzeltier nahm mit dem Alter wie erwartet zu und verhielt sich über den gesamten Untersuchungszeitraum zwischen beiden GT sehr ähnlich. Auch die Anzahl der „systemisch“ erkrankten Tiere erhöhte sich mit zunehmendem Alter, war jedoch bei den *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren im 24. LM, wenn auch nicht statistisch signifikant, mit 66,6 % versus 42,8 % leicht erhöht. Hier kam es vor allem zu einer Zunahme der entzündlichen Veränderungen mit systemischer Auswirkung bei den KO-Mäusen. Jedoch korrelierte die Zunahme an „systemischen“ Erkrankungen über die Zeit nicht mit einem Anstieg der pathologischen Befunde je Einzeltier. Hier konnte kein Unterschied zwischen den „systemisch“ und „nicht-systemisch“ erkrankten Tieren festgestellt werden. Weiterhin war die Zahl der trotz intensiver Beobachtung vorzeitig verstorbenen Tiere bei den WT-Tieren mit 30 % deutlich höher als bei den KO-Tieren mit 10 %. Die spontan verstorbene *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Maus konnte aufgrund ihres Erhaltungszustandes und ihres passenden Alters für die pathologische Untersuchung der 18 Monate alten *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Tiere zusätzlich verwendet werden, während die verstorbenen WT-Tiere aufgrund der zu stark fortgeschrittenen Autolyse leider nicht untersucht werden konnten. Vergleich zur Literatur: Da die Anzahl der Befunde je Einzeltier in der Literatur nicht angegeben wurden, konnte hier kein Vergleich zu vorherigen Studien durchgeführt werden. Auch fehlte in den Studien der Literatur eine Unterteilung der untersuchten Tiere in „systemisch“ und „nicht-systemisch“ erkrankte, so dass auch hier keine vergleichbaren Daten zur Verfügung standen. Für eine isolierte Betrachtung der pathologischen Befunde ist diese Unterteilung auch nicht nötig oder zielführend. Sie wurde in dieser Studie aus-

schließlich für die Bewertung der klinischen Befunde sowie die Bestimmung der OGW herangezogen. Die Überlebensraten in vorherigen Studien wurden für die B6-Maus, ähnlich wie bei unseren WT-Tieren, mit 60 % - 75 % bei einem Untersuchungszeitraum von 24 Monaten angegeben (Haines et al. 2001; JAX-mice 2017).

**Zusammenfassend** konnte festgestellt werden, dass die absoluten Nieren- und Lebergewichte bei den zwei Monate alten *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Tieren signifikant erhöht waren. Die Anzahl der „systemisch“ erkrankten Tiere war bei den 24 Monate alten *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen tendenziell höher als bei den WT-Tieren. Die Überlebensrate der 24. Monate alten Tiere zeigte sich jedoch mit 90 %, wenn auch nicht statistisch signifikant, höher als bei den WT-Tieren mit 70 %.

### 6.2.1 „Nicht-altersassoziierte“, pathologische Veränderungen

Zu der häufigsten, „nicht-altersassoziierten“ Veränderung zählte das Auftreten einer chronisch-aktiven, teils eitrig-nekrotisierenden, teils granulomatösen und lymphoplasmazellulären Hepatitis, die, unabhängig vom GT, mit einer hohen Prävalenz von 96 % und einer Zunahme des Schweregrads über die Zeit bei allen untersuchten Tieren auftrat. Das Bild der Hepatitis entsprach dabei weitestgehend dem Bild einer durch *Helicobacter spp.*-bedingten Hepatitis, wie sie in positiv getesteten Haltungen, wie der hiesigen, als typische „Hintergrundpathologie“ beobachtet werden kann (Fox et al. 2004; Ward et al. 1994; Whary and Fox 2004). Die am häufigsten beschriebenen Subspezies sind *H. hepaticus* und *H. bilis*, die neben der Leber auch das Gallensystem sowie den Darmtrakt als typische Infektionsziele betreffen können (Treuting et al. 2012). Assoziierte Veränderungen im Gallensystem oder chronische Entzündungen des Darms mit dem typischen, klinischen Bild eines Rektumprolaps konnten allerdings bei keiner Maus dieser Studie nachgewiesen werden. Laut Literatur scheint der B6-Hintergrundstamm deutlich resistenter gegenüber einer Infektion im Vergleich zu anderen Stämmen (Ward et al. 1994; Whary and Fox 2004) zu sein. Weitere Faktoren für eine klinische Manifestation der Infektion sind neben der Empfänglichkeit des Mausstammes, das Alter und das Geschlecht der Tiere. Daher könnte dies eine Erklärung für die isolierte Infektion der Leber der hier untersuchten Population sein. Vergleich zur Literatur: Obwohl schon seit den 90-ziger Jahren für wissenschaftliche und kommerzielle Zuchteinrichtungen beschrieben (Donovan et al. 1993; Fox et al. 2011; Fox et al. 2004; Taylor et al. 2007; Ward et al. 1994; Whary and Fox 2004), fand sich diese typische Veränderung erstaunlicherweise bisher in fast keiner der hier zum Vergleich herangezogenen Altersstudien (Brayton et al. 2012; JAX-Mice 2007a; JAX-mice 2017; Kilkeny et al. 2009; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014; Treuting et al. 2008) wieder (Tab. 39). Nur eine einzige Studie beschrieb das Auftreten einer subakuten Hepatitis mit Bildung von Mikrogranulomen mit einer Prävalenz von 74 %

## DISKUSSION

innerhalb der untersuchten Population (Haines et al. 2001). Hierbei handelte es sich allerdings um einen gemischten B6;129 Hintergrund. Eine weitere Erklärung für das in bisherigen Altersstudien fehlende Beschreiben der Hepatitis könnte die Verwechslung der Läsion mit einer extramedullären Hämatopoese in der Leber, wie sie bei sehr jungen oder aber erkrankten Mäusen häufig vorzufinden ist (Sonoda and Sasaki 2012; Wittig et al. 2010), sein. Erstaunlicherweise wurde gleich in mehreren Altersstudien das Auftreten eines klinischen Rektumprolapses jedoch ohne das Auftreten von Leberläsionen beschrieben (JAX-mice 2017; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016). Da in diesen Studien der Hygienestatus der Tiere zwar mit „SPF“ angegeben war aber nicht im Detail erläutert wurde, kann hier eine Infektion mit *Helicobacter spp.* oder *Citrobacter (C.) rodentium* als Ursache für den Rektumprolaps nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der deutlich höheren Hygienestandards in Deutschland seit der Implementierung der FELASA-Richtlinien (Mahler Convenor et al. 2014) zum Monitoring experimenteller Tierhaltungen kommt der Rektumprolaps aufgrund von Infektionen mit *C. rodentium* bei immunkompetenten Tieren oder Tieren in SPF-Haltungen durch eine konsequente Eradikation des Erregers kaum noch vor. Daher zeigte auch keine einzige der in dieser Studie untersuchten Mäuse einen klinischen Rektumprolaps (Tab. 39) als eines der häufigsten Anzeichen einer chronischen Darminfektion bei der Maus (Pettan-Brewer and Treuting 2011; Uchihashi et al. 2015).

Eine weitere „nicht-altersassoziierte“ Veränderung dieser Studie mit mittlerer Prävalenz (13 %) war eine chronisch-aktive, erosive-ulzerative Dermatitis, vorrangig im Nackenbereich der Mäuse. Unabhängig vom GT kam diese Veränderung als Einzeltierkrankung über alle Zeitpunkte hinweg vor, trat jedoch bei den 24 Monate alten *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen, wenn auch nicht signifikant, gehäuft auf. Hier waren 33 % der Tiere betroffen, während bei den WT-Tieren nur ein einziges Tier (14 %) eine Dermatitis entwickelte. Vergleich zur Literatur: Aufgrund der typischen Lokalisation und des gehäuft Auftretens bei dem auch hier verwendeten Hintergrundstamm B6 wird diese Erkrankung auch „B6-Dermatitis“ genannt. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher weitgehend unbekannt, jedoch werden verschiedene Faktoren mit dieser Entität in Verbindung gebracht, wie z.B. genetische Manipulationen, Traumata, Staphylokokkeninfektionen, allergische Reaktionen auf Parasiten, Diäten, Haltungsbedingungen und viele weitere (Hampton et al. 2012; Lawson et al. 2005; Michaud et al. 2016). Das Auftreten wurde in vorherigen Studien mit einer Prävalenz von 4 % - 20 % angegeben (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Hampton et al. 2012; Snyder et al. 2016). Da diese Läsionen weitgehend therapieresistent sind, ermöglicht ein in den meisten Haltungen angewandtes Scoringssystem (Hampton et al. 2012) als Abbruchkriterium die rechtzeitige Herausnahme der Tiere aus der Zucht oder aus experimentellen Studien. Dadurch treten die früher sehr häufig beschriebenen

konsekutiven Erkrankungen, wie reaktive Lymphadenopathien, vergrößerte Milz oder die systemische Amyloidose (Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016), nahezu kaum noch in deutschen Tierhaltungen auf. Auch in unserer Studie konnte keine der Begleiterkrankungen festgestellt werden (Tab. 39).

Zu den „nicht-altersassoziierten“, entzündlichen Veränderungen mit Unterschieden in der Verteilung zwischen den GT zählt auch die eitrige Endometritis (Pyometra). Diese Entzündung des Uterus trat ausschließlich, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei den *C1ca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und unabhängig vom Alter auf. So waren über den gesamten Untersuchungszeitraum je eine zwei Monate, eine 18 Monate und eine 24 Monate alte Maus dieses GT betroffen. Alle weiteren „nicht-altersabhängigen“ Veränderungen, wie z.B. die nicht entzündlichen Veränderungen des Uterus (Hydrometra, Mukometra) oder aber Veränderungen der Niere, wie die Glomerulonephritis, die Hydronephrose oder Nierenzysten, traten meist als Einzeltierkrankung und unabhängig von Alter oder GT auf. Vergleich zur Literatur: Auch in der Literatur werden ähnliche Veränderungen beschrieben, wenn auch mit ungleich höheren Prävalenzen. So kamen z.B. Nephropathien, einem Überbegriff für das Vorliegen von Glomerulopathien, Hydronephrose und Nierenzysten, mit einer Prävalenz von bis zu 100 % bei den untersuchten Populationen vor (Pettan-Brewer and Treuting 2011).

**Zusammenfassend** konnte festgestellt werden, dass die *C1ca1<sup>-/-</sup>*-Maus bei den „nicht-altersassoziierten“ Veränderungen scheinbar etwas häufiger unter entzündlichen Veränderungen der Haut (B6-Dermatitis) sowie des Uterus (Pyometra) zu leiden scheint als die WT-Kontrolltiere. Aufgrund der dennoch sehr niedrigen Prävalenz der beiden Veränderungen in der Gesamtpopulation bei gleichzeitig niedrigen Tierzahlen pro GT waren diese Befunde zwar nicht statistisch signifikant, jedoch auffallend.

### 6.2.2 „Altersassoziierte“, pathologische Veränderungen

Die häufigste, altersassoziierte Veränderung war das Auftreten einer Hyalinose in den Epithelien der oberen Atemwege (nasales und olfaktorisches Epithel), in der Trachea sowie im duktalem Pankreasepithel. Hierbei trat sie unabhängig vom GT ab dem 12. LM mit einer Prävalenz von 51 % - 100 % innerhalb der untersuchten Altersstufe auf. Der Schweregrad nahm mit dem Alter zu, variierte aber zum Teil erheblich zwischen den Tieren einer Gruppe, so dass im Mittel keine Unterschiede zwischen den GT einer Altersstufe festgestellt werden konnten. Vergleich zur Literatur: Die Hyalinose ist eine der am häufigsten beschriebenen Veränderungen der alternden B6-Maus (Haines et al. 2001; Rosli et al. 1999; Snyder et al. 2016; Ward et al. 2001). Sie wird als eosinophile, zytoplasmatische Degeneration des Epithels beschrieben und seit geraumer Zeit im Respirationstrakt mit einer Fehlfunktion im YM1-Proteinstoffwechsel in Verbindung gebracht (Guo et al. 2000; Murray and Luz 1990; Ward et al. 2001). Vereinzelt konnte

## DISKUSSION

diese Läsion sogar schon ab dem 4. LM in einer vorherigen Studie festgestellt werden (Ward et al. 2001). Die große Variation des Schweregrades von Tier zu Tier wurde bereits beschrieben (Ward et al. 2001). In manchen, größeren Studien fehlt sie jedoch vollständig (Brayton et al. 2012; Pettan-Brewer and Treuting 2011), was u.a. auch daran liegen könnte, dass man diese Veränderung sehr gezielt suchen muss und sie keinen offensichtlichen Befund darstellt. Eine weitere Erkrankung mit ähnlicher Ätiologie ist die Acidophilic Macrophage Pneumonia (AMP), bei der es durch die übermäßige Formation von YM1-positiven Kristallen zu regelrechten Fremdkörperreaktionen der Lunge mit konsekutiver, granulomatöser Pneumonie kommt (Guo et al. 2000; Murray and Luz 1990; Ward et al. 2001). Die Veränderung hat neben der vermuteten Reaktion auf inhalierte Pathogene (Guo et al. 2000) auch eine genetische Komponente und wurde bisher in allen hier referenzierten Studien mit einer Prävalenz von 10 % - 30 % beschrieben (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; JAX-mice 2017; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014). In dieser Studie kam die AMP jedoch bei keinem Tier vor (Tab. 39). Auch hier könnte ein sehr gutes Hygienemanagement sowie eine gute Zuchthygiene der Zuchteinrichtung der Charité zu Grunde liegen.

Die zweithäufigste, in dieser Studie beobachtete, altersassoziierte Veränderung war mit einer Prävalenz von 59 % die GEH des Uterus. Hierbei kommt es aufgrund hormoneller Dysregulationen zu einer Zunahme und zystischen Erweiterung der endometrialen Drüsen bei weiblichen, alternden Tieren (De Bosschere et al. 2001). Bereits ab dem 12. LM konnte diese Veränderung mit gleichbleibender Prävalenz bei fast allen Tieren unabhängig vom GT beobachtet werden. Sie nahm im Schweregrad trotz hoher Variabilität innerhalb beider Gruppen deutlich zu. Vergleich zur Literatur: Auch in vorherigen Altersstudien wurde diese altersassoziierte Läsion, wenn auch mit niedrigerer Prävalenz (10 % - 50 %), beschrieben (Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014).

Die dritte, altersassoziierte Veränderung mit hoher Prävalenz in dieser Studie (57 %) war eine chronisch-aktive, pyogranulomatöse Entzündung der Zahnalveolen (Alveolitis) der Molaren des Ober- und Unterkiefer mit teils hochgradiger Granulationsgewebsbildung und einem Verlust der Zähne mit zunehmendem Alter. Je nach Schweregrad kam es bei einzelnen Tieren auch zu einer Ausbreitung der Entzündungsreaktion auf die umgebende Muskulatur, den Kieferknochen sowie die angrenzenden Nerven. Im 12. LM waren die *C1ca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse, wenn auch nicht signifikant, deutlich weniger betroffen (40 %) als die WT-Kontrolltiere (80 %). Dieser Unterschied relativierte sich aber mit zunehmender Zeit, so dass bei allen weiteren Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen den GT mehr festzustellen waren. Auch war der Schweregrad der Läsion, meist hochgradig, über den gesamten Beobachtungszeitraum bei den *C1ca1<sup>-/-</sup>*- und WT-Tieren gleich. Vergleich zur Literatur: Dieser Befund ist für diese Altersstudie einzigartig, da er bisher in keiner weiteren der hier referenzierten Altersstudien beschrieben wurde (Tab.

39). Lediglich in einer experimentellen Studie zur Periodontitis/Alveolitis konnte beobachtet werden, dass die experimentelle Besiedlung mit *Porphyromonas gingivalis*, einem der Hauptverursacher dieser Erkrankung, bei 15 Monate alten Mäusen zu einem Anstieg dieser Bakterienspezies im dentalen Biofilm und damit zur Verdrängung nicht-pathogener Kommensalen mit gleichzeitiger Zunahme von pathogenen Keimen, wie Staphylokokken, kommt. Weiterhin nahm die Stärke des periodontalen Knochens ab, was eine erhöhte Empfänglichkeit periodontaler Erkrankungen im Alter begünstigt (Wu et al. 2016). Eine weitere Studie von Liang und Kollegen weist auf eine erhöhte, periodontale Entzündungsneigung mit gleichzeitigem Knochenschwund der Zahnalveolen bei alten Mäusen (18 Monate) hin (Liang et al. 2010). Mögliche Gründe für die hohe Prävalenz der Alveolitis in dieser Studie könnten zum einen die Art der Präparation des Schädels mit Schnittebene durch die Molaren und dadurch bedingter hervorragender Ansicht der Zahnalveolen sein, zum anderen könnte möglicherweise auch das über alle Altersstufen gleichbleibende Futter zu diesen Läsionen geführt haben. So könnte die Körnung bzw. Härte der Pellets bei den alternden Mäusen zu Mikrotraumata im Periodontium bzw. der Zahnalveole geführt und damit eine bakterielle Besiedlung mit konsekutiver Entzündung begünstigt haben. Aus Gründen des Tierwohls sollte diesem Aspekt dringend weiter nachgegangen werden und ggf. Futter-Vergleichsstudien angestrebt werden, um diese Läsion bei älteren Tieren durch die Wahl eines geeigneteren Futtermittels zu vermeiden. Bei dem hier angewandten Futter handelte es sich um standardisierte Pellets für die Maushaltung, wie sie in vielen Zuchteinrichtungen verwendet werden. Dennoch wurde in keiner weiteren Studie der Wechsel des Futtermittels während eines Untersuchungszeitraumes beschrieben, was die Einzigartigkeit dieses Befundes verwunderlich macht.

Weitere Auffälligkeiten bei den altersassoziierten Befunden, jedoch ohne statistische Signifikanz, konnten bei der chronischen interstitiellen Nephritis festgestellt werden. Ähnlich wie bei der Alveolitis trat diese Veränderung im 12. LM bei keinem der *C1ca1<sup>-/-</sup>*-Tiere jedoch bei 40 % der WT-Tiere auf. Ab dem 18. LM verhielten sich beide GT dann wieder gleich, mit einer Zunahme an betroffenen Tieren im 24. LM. Bei den Kolloidzysten der Schilddrüse verhielt es sich gegensätzlich. So waren hier im 18. LM ausschließlich die *C1ca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit 50 % betroffen, während im 24. LM diese Veränderungen bei den WT-Tieren mit 43 % gegenüber den KO-Tieren mit 11 % tendenziell häufiger vorkamen. Vergleich zur Literatur: Die chronische Nierenentzündung wurde bisher in keiner weiteren Altersstudie beschrieben, allerdings wurde der häufig in den Studien verwendete Begriff der Nephropathien sehr uneinheitlich verwendet und oft auch gar nicht definiert, so dass die chronische Nephritis unter Umständen auch diesem Komplex zuzuordnen ist (Brayton et al. 2012; Pettan-Brewer and Treuting 2011). Zysten der Schilddrüse wurden bisher mit einer Prävalenz von bis zu 19 % angegeben (Haines et al. 2001; Snyder et al. 2016), was in etwa der Prävalenz in dieser Studie (15 %) entspricht.

## DISKUSSION

Alle weiteren altersassoziierten Pathologien, wie z.B. das Auftreten degenerativer Erkrankungen wie Arthrosen, Bandscheibendegenerationen, retinale Atrophie, ovarielle Atrophie und ovarielle Zysten, sowie chronische Entzündungen des Pankreas, der Gelenke, der Lunge und des Herzens, kamen ohne Unterschiede zwischen den GT meist als Einzeltierkrankungen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten vor. Vergleich zur Literatur: Die meisten der hier beobachteten Veränderungen, allen voran die ovarielle Atrophie sowie die ovariellen Zysten, wurden ebenfalls mit einer ähnlich hohen Prävalenz beschrieben (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Szymanska et al. 2014). Jedoch waren eine Vielzahl an altersassoziierten Erkrankungen, die in den meisten Altersstudien beschrieben wurden, in dieser Studie nicht zu beobachten, darunter der Hydrocephalus, degenerative Läsionen des Herzens, der Katarakt und die ulzerative Keratitis des Auges (Tab. 39). Für Letztere könnten sicherlich auch die Haltungsbedingungen, wie Einstreu und Besatzdichte, ausschlaggebend sein, da die ulzerative Keratitis häufig auch durch Traumata entstehen kann. Vor allem ein vermehrtes Barbering der Mäuse bis hin zum Verlust der Vibrissen (Sarna et al. 2000) führen zu einem erhöhten Risiko für Traumata an den Augen. In der Zucht der hier verwendeten Mäuse wird dieses Verhalten so gut wie nie bei B6-Mäusen beobachtet, und auch keines der hier untersuchten Tiere wies die typischen Veränderungen des Fells und der Vibrissen auf.

**Zusammenfassend** konnte man bei den altersassoziierten Pathologien feststellen, dass sowohl die Alveolitis der Molaren als auch die interstitielle Nephritis bei den *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren zeitlich verzögert auftrat, während es sich bei dem Auftreten von Koloidzysten in der Schilddrüse genau gegensätzlich verhielt. Hier waren die *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Tiere zwar früher betroffen als die WT-Tiere, dafür jedoch im 24. LM seltener. Auch hier waren die auffälligen Befunde aufgrund der niedrigen Prävalenz in der Gesamtpopulation bei gleichzeitig niedrigen Tierzahlen pro GT nicht statistisch signifikant, sondern stellen vielmehr Tendenzen dar.

### 6.2.3 Tumorerkrankungen

Das Auftreten von Neoplasien korrelierte in dieser Studie, wie erwartet, sehr stark mit einem Zunehmen des Alters. So konnte bereits nach 12 Monaten das Auftreten der ersten Neoplasien bei jeweils einem Tier der beiden GT beobachtet werden. Nach 18 Monaten waren bereits mehr als die Hälfte der Tiere beider GT betroffen, während zum 24. LM die Zahl der Tumorerkrankung, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei den WT-Tieren mit 70 % betroffener Tieren höher ausfiel als bei den *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Tieren mit 44 %.

Das maligne Lymphom war mit einer Prävalenz von 13 % die häufigste, in dieser Studie festgestellte Tumorerkrankung. Hierbei konnte man zwischen den intestinalen und den multizentrischen Lymphomen unterscheiden. Während bei den WT-Tieren ausschließlich die intestinale

Form ab dem 12. bis zum 24. LM vorzufinden war, wiesen die *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse beide Formen auf, obwohl das multizentrische Lymphom bei den KO-Mäusen mit je einem betroffenen Tier im 18. und 24. LM häufiger vorkam als das intestinale. Bei der multizentrischen Form kam es in beiden Fällen, neben den zahlreich involvierten lymphatischen Organen wie Milz, Thymus und Lymphknoten, zu einer ausgeprägten Metastasierung in Lunge, Herz, Nieren, Leber, Pankreas, Harnblase, Ovarien, Uterus und Milchdrüse. Auch entwickelten die KO-Mäuse Lymphome erst ab dem 18. LM. Vergleich zur Literatur: Lymphome sind in allen Altersstudien die am häufigsten beschriebenen Neoplasie (Tab. 39), deren Prävalenz sehr variabel von 23 % bis 68 % bei der B6-Maus angegeben wird (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014). In dieser Studie wiesen die 24 Monate alten Tiere eine Prävalenz von 14 % (WT) bis 22 % (*Ctca1<sup>-/-</sup>*) auf. Eine Unterscheidung nach der Lokalisation wurde in diesen Studien nicht vorgenommen. Ursachen für die niedrigere Prävalenz von Lymphomen in dieser Studie, verglichen zur Literatur, könnten in der Zusammensetzung des Futters sowie im Futteraufnahmeverhalten der hier untersuchten Mäuse liegen. So ist hinlänglich bekannt, dass eine Restriktion der Futteraufnahme zu einer Reduzierung im Auftreten von Lymphomen um bis 60 % führen kann (Blackwell et al. 1995). Hier könnte man spekulieren, dass die hier verwendeten Mäuse aufgrund ihrer Zahnbefunde deutlich restriktiver Nahrung zu sich nahmen als in anderen Studien, was auch das verringerte KGW im Vergleich zu den Referenztieren (JAX-Mice 2007a; JAX-Mice 2007b) erklären würde.

Eine weitere hämatopoetische Neoplasie dieser Studie waren die histiozytären Sarkome. Diese Tumorart trat mit einer Prävalenz von 9 % ausschließlich im 18. LM auf und wurde als metastasierende Form, von der Milz ausgehend, sowie als isolierte, auf das Knochenmark beschränkte Form beschrieben. Auch hier trat die metastasierende Form, mit zwei betroffenen Tieren, ausschließlich bei den *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen auf, wohingegen die auf das Knochenmark beschränkte Form bei einem WT-Tier vorkam. Ähnlich wie bei den Lymphomen fanden sich bei den *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen, neben dem Primärherd in der Milz, Metastasen in der Lunge, im Thymus, in den peripheren Lymphknoten, in der Leber, in der Nebenniere, in den Ovarien, im Uterus, im Knochenmark und im Gehirn. Vergleich zur Literatur: Auch die histiozytären Sarkome gehören mit einer Prävalenz von 6 % - 13 % zu den häufigsten Neoplasien in Altersstudien (Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014).

Mit einer Prävalenz von 13 % gehörte die Gruppe der Adenome ebenfalls zu den häufigeren Neoplasien. Diese kamen im 18. LM, unabhängig vom GT, als Einzeltierkrankung vor und häuften sich im 24. LM bei den WT-Tieren mit einer Prävalenz von 43 % im Vergleich zu *Ctca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen mit 11 %. Bis auf die Adenome der Nebenschilddrüse (n = 2) waren alle anderen Lokalisationen, wie die Speicheldrüse, die Hypophyse, die Lunge und der Dünndarm, nur bei

## DISKUSSION

jeweils einem Tier betroffen. Auffallend war hierbei, dass die *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse ausschließlich Adenome in endokrinen Organen (Nebenschilddrüse, Hypophyse) entwickelten. Vergleich zur Literatur: Sowohl Lungenadenome als auch Adenome der Hypophyse und des Dünndarms sind mit niedrigen Prävalenzen hinlänglich in der Literatur beschrieben (Haines et al. 2001; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014). Adenome der Nebenschilddrüse fanden sich allerdings in keiner dieser Studien. Ursächlich hierfür könnte ein Fehlen des Organs für die histopathologische Untersuchung sein. Um die Nebenschilddrüse aufgrund ihrer Größe bei Mäusen darstellen zu können, müssen verschiedene Ebenen/Stufen des eingebetteten Gewebes zwingend angeschnitten werden.

Alle weiteren aufgetretenen Neoplasien wurden unter dem Begriff der „sonstigen Neoplasien“ zusammengefasst. Hierbei handelte es sich um Einzeltierkrankungen, die unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt oder GT vorkamen. Dabei handelte es sich um ein Papillom des Eileiters, einen Granulosazelltumor des Ovars sowie ein Osteom im Unterkiefer. Auffällig war hier, dass beide Tumoren des Genitaltraktes bei den *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen vorzufinden waren. Vergleich zur Literatur: Sowohl Granulosazelltumore (Pettan-Brewer and Treuting 2011) als auch die viel seltener vorkommenden Osteome (Brayton et al. 2012; Kavirayani et al. 2012) werden in der Literatur für B6-Mäuse beschrieben (Tab. 39). Ein Papillom der Salpinx wurde in diesen Altersstudien bisher nicht beschrieben. Auch hier könnten die Gründe in der fehlenden Darstellung des Eileiters liegen, der, wie auch die Parathyreoidea, aufgrund seiner Größe regelrecht „gesucht“ werden muss. Alle weiteren, in der Literatur beschriebenen Tumore, wie z.B. das Auftreten von Fibrosarkomen und Hämangiosarkomen, konnten in dieser Studie nicht beobachtet werden.

**Zusammenfassend** konnte man bei den Tumorerkrankungen feststellen, dass nur die *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse bei beiden hämatopoetischen Tumorarten, dem Lymphom und dem histiozytären Sarkom, metastasierende Formen auswiesen. Weiterhin waren bei den KO-Mäusen nur Adenome der endokrinen Organe zu finden, und Adenome kamen auch generell bei den 24 Monate alten KO-Tieren seltener vor als bei den WT-Tieren. Bei den sonstigen Tumorarten entwickelten die *Ctca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse ausschließlich Neoplasien des Genitaltraktes. Wie schon bei den „nicht-neoplastischen“ Veränderungen waren auch hier die auffälligen Befunde aufgrund der niedrigen Prävalenz in der Gesamtpopulation bei gleichzeitig niedrigen Tierzahlen pro GT nicht statistisch signifikant, sondern stellen vielmehr Tendenzen dar.

Tabelle 39: Zusammenfassung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der pathologischen Veränderungen des C57BL/6-Stammes dieser Studie im Vergleich zur Literatur<sup>#</sup>

Gemeinsamkeiten	Unterschiede
<b>„Nicht-neoplastische“ Veränderungen</b>	
Glandulärzytische, endometriale Hyperplasie	Keine Acidophilic Macrophage Pneumonia
B6-Dermatitis	Kein Hydrocephalus
Ovarielle Atrophie	Keine Amyloidose
Ovarielle Zysten	Kein Katarakt
	Keine degenerativen Herzläsionen
	Keine ulzerative Keratitis
	Kein Rektumprolaps
	Nephropathien nur vereinzelt
	Hepatitis ( <i>Helicobacter</i> -assoziiert) mit hoher Prävalenz
	Hyalinose mit hoher Prävalenz
	Alveolitis mit hoher Prävalenz
<b>Neoplasien</b>	
Hämatopoetische Neoplasien (Lymphom, histiozytäres Sarkom) mit höchster Prävalenz	Lymphome mit niedrigerer Prävalenz
Granulosazelltumor	Keine Fibrosarkome
Pulmonales Adenom	Keine Hämangiosarkome
Hypophysenadenom	

<sup>#</sup>Quelle: Brayton et al. 2012; Haines et al. 2001; JAX-mice 2017; Pettan-Brewer and Treuting 2011; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014

### 6.3 Hat das Fehlen des CLCA1-Proteins einen Einfluss auf altersassoziierte, pathologische Veränderungen?

Diese hier durchgeführte Altersstudie soll einen ersten Einblick in die möglichen Besonderheiten der pathophysiologischen Veränderungen der alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus geben und damit erste Hinweise auf eventuelle Funktionen des CLCA1-Proteins im Alterungsprozess aufzeigen. Innerhalb dieser Studie konnten einige initiale Beobachtungen getroffen werden, die in erster Linie die Entwicklung von pathologischen Veränderungen betrafen (Tab. 40) aber auf-

## DISKUSSION

grund der fehlenden statistischen Signifikanz nicht als signifikante Unterschiede, sondern vielmehr als Tendenzen oder Risikofaktoren anzusehen sind. Generell ist die Erhebung von statistischen Unterschieden für Altersstudien des Querschnittstyps aufgrund der geringen Tierzahlen nicht geeignet und wurde auch in den hier referenzierten Vergleichsstudien nicht angewandt (Brayton et al. 2012; Snyder et al. 2016; Szymanska et al. 2014). Vielmehr handelt es sich hier um eine Auflistung der Befunde, um erste Unterschiede erkennen zu lassen (Tab. 40).

*Tabelle 40: Zusammenfassung der abweichenden Befunde zwischen *Clca1*-Knockout- und Wildtyp-Tieren*

Untersuchungsparameter	Monate	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup>
Klinische Untersuchung	2	Körpergewicht ↑
	2	Absolutes Leber und Nierengewicht ↑
	2	MCH und MCHC ↑
	2, 12	Harnstoff ↓
Anzahl „systemisch“ erkrankter Tiere <sup>#</sup>	24	↑
Überlebensrate <sup>#</sup>	24	↑
„Nicht-altersassoziierte“ Pathologien <sup>#</sup>	2, 18, 24	B6-Dermatitis ↑
	2, 18, 24	Pyometra ↑
„Altersassoziierte“ Pathologien <sup>#</sup>	12	Alveolitis ↓
	12	Interstitielle Nephritis ↓
	18	Kolloidzysten ↑
	24	Kolloidzysten ↓
Tumorerkrankungen <sup>#</sup>	18, 24	Multizentrische Lymphome mit Metastasen
	18	Histiozytäre Sarkome mit Metastasen
	24	Adenome ↓
	18, 24	Adenome nur in endokrinen Organe
	18, 24	Sonstige Neoplasien nur im Genitaltrakt

<sup>#</sup>ohne statistische Signifikanz, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, MCH = Mittlerer, korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC = Mittlere, korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, B6 = C57BL/6

Die häufigsten der hier beschriebenen, pathologischen Veränderungen die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus betreffend waren vor allem entzündliche und neoplastische Prozesse.

### 6.3.1 Die mögliche Rolle des CLCA1-Proteins bei Entzündungen

Bisher konnten für das CLCA-Protein in verschiedenen, experimentellen Entzündungsmodellen bei der Maus immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben werden (Dietert et al. 2014; Ebbinghaus et al. 2014; Erickson et al. 2016). Je nach Art des Stimulus bzw. Pathogens waren diese Eigenschaften zum Teil vollkommen gegensätzlich reguliert. So konnte bei einem experimentellen Lungeninfektionsmodell mit *S. aureus* eine Reduzierung der Immunzellrekrutierung durch eine verminderte Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17 und CXCL-1 bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden (Dietert et al. 2014). In einem DSS-Colitis Modell kam es jedoch zur genau gegensätzlichen Beobachtung (Erickson et al. 2016). In einem weiteren Antigen-induzierten Arthritismodell kam es, ähnlich wie bei der *S. aureus*-Pneumonie, zu einer Reduzierung der Entzündungsantwort in den KO-Tieren. Auch in dieser hier vorliegenden Studie konnten für die hier dargestellten Entzündungen gegensätzliche Beobachtungen beschrieben werden. Während die B6-Dermatitis sowie die Pyometra in den KO-Tieren häufiger oder sogar ausschließlich auftrat, kam sowohl die Alveolitis als auch die interstitielle Nephritis deutlich seltener oder erst zu einem späteren Zeitpunkt vor. In bisherigen Studien konnte bis auf den Uterus in keinem der hier betroffenen Organe ein Proteinnachweis in naiven WT-Tieren erfolgen (Leverkoehne and Gruber 2002). Dennoch könnten hier ähnliche, immunmodulatorische Funktionen des CLCA1-Proteins vorliegen, wie die bereits beschriebenen (Dietert et al. 2014; Ebbinghaus et al. 2014; Erickson et al. 2016). Möglicherweise hängt sowohl die Expression des CLCA1-Proteins als auch die jeweilige immunmodulatorische Funktion stark von der Art des Auslösers und des dadurch beschriebenen Pathogenes ab. Bei der B6-Dermatitis, der Pyometra und der Alveolitis spielt die Infektion mit verschiedenen Bakterien eine große Rolle. So sind z.B. bei der Alveolitis auch pathogene Staphylokokken involviert, die eine ähnliche, immunmodulatorische Funktion des CLCA1-Proteins hervorrufen könnten wie zuvor in der Lunge (Dietert et al. 2014). Da es sich in dieser Studie aber um die rein deskriptive Beschreibung von pathologischen Veränderungen ohne den Nachweis von Erregern, Entzündungszellpopulationen, Zytokinen oder molekularen Untersuchungen handelt, konnte hier keine Zuordnung zu einem spezifischen, immunmodulatorischen PT, abhängig von der Art der Entzündung, erfolgen. Im Gegensatz zu den meist monofaktoriellen, experimentellen Studien handelt es sich bei allen hier festgestellten Entzündungen in diesem Stadium um multifaktorielle, chronisch-aktive Formen.

### 6.3.2 Die mögliche Rolle des CLCA1-Proteins bei Tumorerkrankungen

Bereits 2001 konnte von Bustin und Kollegen eine verminderte Expression von humanem CLCA1 in kolorektalen Karzinomen (KRK) beschrieben werden (Bustin et al. 2001). Seither ist das humane CLCA1 umfangreich für diese Tumorart untersucht worden (Bustin et al. 2001; Li et al. 2017; Yang et al. 2013; Yang et al. 2015). So konnte bereits mehrfach gezeigt werden,

## DISKUSSION

dass eine verminderte Expression von CLCA1 mit einem Anstieg des histologischen Grades und des damit verbundene Tumor-Staging sowie mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Li et al. 2017; Yang et al. 2015). Diese Beobachtungen konnten durch *in vitro*-Analysen weiter gefestigt werden. So verhinderte eine vermehrte Expression von CLCA1 die Zellproliferation und Metastasierung *in vitro*, während eine Inhibition des Proteins zu einem gegensätzlichen Ergebnis führte (Li et al. 2017). Somit wurde eine mögliche Funktion des Proteins als Tumorsuppressor (Bustin et al. 2001) durch die Inhibierung des Wnt/beta-catenin Signalweges und damit des Prozesses der epithelialen-mesenchymalen Transition hypothetisiert (Li et al. 2017; Yang et al. 2013). Auch durch einen siRNA-Knockdown von CLCA1 in einer Kolonkarzinomzelllinie (Caco2) konnte eine Hemmung der Zelldifferenzierung bei einer gleichzeitig vermehrten Zellproliferation festgestellt werden (Yang et al. 2013).

Für ovarielle Karzinome konnten CLCA1-Proteine bereits seit 2013 mit deren Proliferation, Adhäsion und Invasion in Verbindung gebracht werden (Frede et al. 2013). Um dies zu verifizieren, wurden von Musrap und Kollegen *in vitro*-Analysen mit einer adhären und nicht-adhären, Zellaggregate-formenden Ovarialkarzinom-Zelllinie durchgeführt (Musrap et al. 2015b). Hierbei wurde CLCA1 als das am höchsten regulierte Protein in den Aggregat-formenden Zellen nachgewiesen. Eine Inhibierung sowie der Knock-down von *Clca1* mittels siRNA führten zu einer verminderten Adhäsion der Zellen des Monolayers sowie zu einer verminderten Bildung von Zellaggregaten und damit einer verminderten Fähigkeit zur Metastasierung in der nicht-adhären Zelllinie (Musrap et al. 2015).

In jüngsten Beobachtungen konnten geringe CLCA1-Proteinlevel mit einer schlechten Verlaufsprognose für die Erkrankung an Pankreaskarzinomen beobachtet werden, und somit wurde auch hier eine Funktion des CLCA1-Proteins als prognostischer Biomarker für diese Tumorart hypothetisiert (Hu et al. 2018).

In dieser hier vorliegenden Studie war eine weitere, initiale Anfangsbeobachtung für die alternde *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus das Vorliegen von metastasierenden, hämatopoetischen Neoplasien. Im Vergleich zu den WT-Tieren kam es nur bei den KO-Tieren zu einer ausgedehnten Metastasierung der malignen Lymphome sowie der histiozytären Sarkome in verschiedene Organsysteme, wie z.B. der Lunge, der Leber oder dem Genitaltrakt. Bisher gibt es in der Literatur jedoch keine Beschreibungen von CLCA-Proteinen im Zusammenhang mit dem Auftreten und dem Verhalten von hämatopoetischen Tumoren. Allerdings konnte auch schon für epitheliale KRK eine erhöhte Metastasierungsrate bei einer verminderten oder gar nicht vorhandenen CLCA1-Expression nachgewiesen werden (Li et al. 2017). Weiterhin auffällig war die Häufung der „sonstigen Neoplasien“ bei den *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Genitaltrakt. So konnte ausschließlich

bei diesem GT ein Salpinxpapillom sowie ein ovarieller Granulosazelltumor festgestellt werden. Bisher wurden im physiologischen Zustand in keinem der beiden Organe das CLCA1-Protein nachgewiesen. Allerdings konnte bereits für den humanen Orthologen gezeigt werden, dass er in Ovarialzellkarzinom-Zelllinien exprimiert (Musrap et al. 2015) wird und hier möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen des CLCA1-Proteins in der KO-Maus und dem Auftreten der gutartigen Neoplasie in Eierstock und Eileiter bestehen könnte. Da bisher keine Studien verfügbar sind, die CLCA-Proteine mit endokrinen Neoplasien oder gutartigen Adenomen untersucht haben, bleibt dieser Befund für diese Studie vorerst unklar.

#### **6.4 Zeigt die alternde *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus einen Phänotyp?**

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse konnte für die alternde *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus in dieser Studie kein ausgeprägter, einheitlicher und somit offensichtlicher Phänotyp beschrieben werden, und daher scheint das Protein zumindest keine essentiellen Funktionen bei Alterungsprozessen einzunehmen. Dennoch konnten hier erste Auffälligkeiten und initiale Beobachtungen für einen möglichen Altersphänotyp der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus aufgezeigt werden (Tab. 40). So unterschieden sich die „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere mit altersgemäßer Physiologien in der klinischen Untersuchung nicht von den WT-Tieren. Dennoch konnten in der pathologischen Untersuchung, wenn auch nicht statistisch signifikant, erste Unterschiede in den Befunden zwischen beiden GT festgestellt werden. So konnte bei der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus im Alter zwar eine höhere Anzahl „systemisch“ erkrankter Tiere beobachtet werden, jedoch war auch die Überlebensrate der Tiere im Vergleich zur WT-Maus höher. Weiterhin schien die KO-Maus eine erhöhte Neigung zur Ausbildung der typischen B6-Dermatitis sowie von entzündliche Erkrankungen des Uterus aufzuweisen. Weitere chronische Entzündungen, wie z.B. der Niere und der Zahnalveolen, traten bei diesen Mäusen erst zu späteren Zeitpunkten im selben Umfang wie bei den WT-Mäusen auf. Weiterhin konnte ein erhöhtes Metastasierungsrisiko für hämatopoetische Neoplasien sowie eine erhöhte Neigung für die Ausbildung endokriner Adenome und gutartiger Tumore des Genitaltraktes im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Somit konnten die hier erhobenen Daten die initial aufgestellte Arbeitshypothese, nach der das Fehlen des CLCA1-Proteins einen essentiellen Einfluss auf den altersassoziierten PT der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus haben könnte, vorerst nicht stützen. Ob es sich bei diesen initialen Beobachtungen um tatsächliche direkte Auswirkungen des Fehlens des CLCA1-Proteins oder um reine Zufallsereignisse handelt, konnte mit dieser Studie aufgrund der niedrigen Prävalenz der Befunde sowie der geringen Gruppengrößen nicht abschließend beurteilt werden.

### **6.5 Methodenkritik**

Die Aussagekraft dieser Arbeit muss vor allem in Hinblick auf die Anzahl der eingesetzten Tiere kritisch betrachtet werden. So war es aufgrund der geringen Gruppengrößen bei gleichzeitigem Vorliegen von seltenen Veränderungen nur in Ausnahmefällen möglich, statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Daher wird in den meisten Altersstudien auf eine statistische Auswertung verzichtet, was jedoch eine Aussage über die Relevanz der Ergebnisse deutlich erschwert. Somit ist eine Unterscheidung zwischen klarer Auswirkung durch den Knockout des Proteins und zufälliger Variation der Spontanbefunde in dieser Arbeit nicht zu treffen. Zudem wurde in dieser Studie aufgrund der ausschließlichen Verfügbarkeit von weiblichen Tieren ein geschlechtsspezifisches Bias geschaffen. Die Verwendung von männlichen Tieren für solche initialen Beobachtungsstudien ist durch die erschwerten Haltungsbedingungen (meist Einzelhaltung) über einen so langen Zeitraum sowohl tierschutzrechtlich als auch aufgrund der sowieso schon sehr hohen Kosten von Altersstudien als problematisch anzusehen. Dennoch müssten für eine vollständige Beschreibung der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mauslinie weitere Untersuchungen an männlichen Tieren erfolgen. Ein weiterer Kritikpunkt ist die eingeschränkte Aussagekraft der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter durch das Fehlen einer Doppelbestimmung aufgrund des niedrigen Probenvolumens. So konnten während der Einmalmessung nicht für jedes Tier die vollständigen Daten erhoben werden, was eine Minimierung der Gruppenanzahl für den jeweiligen Parameter zur Folge hatte. Weiterhin fand in dieser Studie eine Unterteilung der Tiere in „systemisch“ erkrankte und „nicht-systemisch“ erkrankte Tiere statt, um eine Verzerrung der altersgemäßen, physiologischen Ergebnisse für die klinische Untersuchung zu verhindern. Dadurch wurden die Gruppengrößen für die klinischen Untersuchungen teilweise deutlich reduziert. Es wurde aber für jede dieser Untersuchungen eine statistisch auswertbare Gruppengröße nicht unterschritten.

### **6.6 Ausblick auf mögliche weiterführende Arbeiten**

Diese Altersstudie sollte einen ersten Überblick über einen möglichen PT der alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus geben. Bislang wurden für diese Linie ausschließlich bis zu neun Monate alte Tieren aufgrund der tierschutzrechtlich vorgeschriebenen Belastungseinschätzung für genetisch veränderte Mauslinien phänotypisiert. Weiterhin waren alle bisher in experimentellen Studien eingesetzten *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zwischen 6-16 Wochen alt. Somit fehlte eine umfassende Phänotypisierung der alternden KO-Maus, um das Gesamtbild dieser Linie zu vervollständigen. Obwohl die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen ausgeprägten, einheitlichen Altersphänotyp aufwiesen, konnten in dieser Studie erste initiale Beobachtungen getroffen werden, die nun in weiteren Studien verfolgt werden sollten. So ist die immunmodulierende Funktion des CLCA1-Proteins weiter in

den Fokus gerückt. Hier sollte in Folgeuntersuchungen eruiert werden, warum manche Stimuli/Pathogene zu einer vermehrten und manche zu einer reduzierten Entzündungsantwort in der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus führen könnten, wie es auch schon in vorherigen Studien beschrieben wurde (Dietert et al. 2014; Ebbinghaus et al. 2014; Erickson et al. 2016). Hierfür sollten entweder geeignete Infektionsmodelle mit unterschiedlichen Pathogenen gefunden oder aber die in dieser Studie beschriebenen Veränderungen mit einer etwaigen Erhöhung der Tierzahl molekularbiologisch, immunmodulatorisch und immunhistochemisch weiter untersucht werden. Vor allem stellt sich hier die Frage, ob das Protein im Alter oder bei spezifischen Pathologien sein zuvor beschriebenes Expressionsmuster (Leverkoehne and Gruber 2002) verändert oder erweitert. Weiterhin erhärtete sich in dieser Studie die Hypothese zur Rolle von CLCA1 bei Tumorerkrankungen. Auch für diese initialen Beobachtungen sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Metastasierung und spezifischen Ausbildung von Neoplasien erfolgen. Dies kann vor allem an geeigneten Tumorzelllinien der Maus, wie sie z.B. bei der ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) erhältlich sind, in ähnlichen Untersuchungen wie für das humane CLCA1-Protein (Li et al. 2017; Musrap et al. 2015; Yang et al. 2013) durchgeführt werden.

## 7 Zusammenfassung

---

### Phänotypisierung der alternden *Clca1*-Knockout-Maus

Kristina Dietert

Die CLCA-Proteinfamilie (engl. *chloride channel regulators, calcium-activated*) ist seit mehreren Jahrzehnten Forschungsschwerpunkt verschiedener Arbeitsgruppen weltweit. Sie umfasst komplexe, hochkonservierte Proteine mit einem weiten, Spezies-spezifischen Expressionsmuster. Vor allem das CLCA1-Protein, welches von Mukus-produzierenden Zellen insbesondere des Respirations- und Intestinaltraktes synthetisiert und vollständig sezerniert wird, scheint beim Menschen und bei der Maus pleiotrope, wenn auch bislang nicht vollständig erforschte Funktionen aufzuweisen und konnte mit relevanten, Mukus-assoziierten, humanmedizinischen Erkrankungen wie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose), dem Asthma oder der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung in Verbindung gebracht werden. In jüngst publizierten Studien wurden für das CLCA1-Protein vor allem Funktionen als Mukusprozessor, Immunmodulator und Tumorsuppressor hypothetisiert.

In zunehmendem Maße stellen genetisch-veränderte Mauslinien exzellente Modelle für humanmedizinische Erkrankungen, stets unter Beachtung der komplexen Speziesunterschiede, dar. So wurden auch für das *Clca1*-Gen Knockout-Modelle generiert und bisher für vorrangig inflammatorische Fragestellungen eingesetzt. In naiven, spezifiziert pathogenfreien *Clca1*-Knockout-Mäusen (hier: *Clca1*<sup>-/-</sup>) konnte bis zu einem Alter von neun Monaten bislang kein Phänotyp beschrieben werden. In bakteriell und chemisch induzierten Entzündungsmodellen der Lunge, des Darms und der Gelenke zeigte die adulte *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus in einem Alter von bis zu 16 Wochen einen immunmodulatorischen Phänotyp. Ältere Mäuse entwickeln jedoch über ihre Lebenszeit eine Reihe pathophysiologischer Veränderungen, wie z.B. Tumore sowie entzündlichen oder degenerativen Erkrankungen als Teil des natürlichen Alterungsprozesses.

Bisher ist über die Rolle des CLCA1-Proteins im Prozess des Alterns und der damit einhergehenden Entwicklung von alterstypischen, pathologischen Veränderungen nichts bekannt. Ziel dieser Studie war es daher, die Auswirkungen des Fehlens von CLCA1 auf den Alterungsprozess von Mäusen zu untersuchen. Ferner sollte festgestellt werden, ob das Fehlen von CLCA1 Auswirkungen auf die Ausbildung von alterstypischen Veränderungen hat und somit das Fehlen des Proteins einen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Mäuse im Alter nimmt. Um dies zu erreichen, wurde die alternde *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus umfassend phänotypisiert. Dafür wurden sowohl klinische Untersuchungen wie die Bestimmung des Körpergewichts sowie hämatologischer und klinischer Parameter als auch eine vollständige pathologische Untersuchung mit

Bestimmung der Organgewichte und makroskopischer sowie histopathologischer Untersuchung durchgeführt. Es wurde das Modell einer Querschnittsaltersstudie gewählt, um zu definierten Zeitpunkten eine identische Anzahl von alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit deren WT-Geschwistertieren hinsichtlich der Ausbildung von pathophysiologischen Veränderungen vergleichen zu können.

In dieser Studie konnte für die alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Mäuse kein ausgeprägter, einheitlicher und somit offensichtlicher Phänotyp identifiziert werden, was eine essentielle Funktion des CLCA1-Proteins im Alterungsprozess sehr fraglich erscheinen lässt. Dennoch konnten in Einzelfällen Auffälligkeiten und initiale Beobachtungen für einen möglichen Altersphänotyp aufgezeigt werden. Während sich die Mäuse der beiden Genotypen mit altersgemäßer Physiologie in den klinisch erhobenen Parametern nicht unterschieden, konnten in der pathologischen Untersuchung, wenn auch ohne statistische Signifikanzen, erste initiale Hinweise auf das mögliche Vorliegen eines Altersphänotyps der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren festgestellt werden. Trotz einer höheren Anzahl „systemisch“ erkrankter Tiere im hohen Alter wies die *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus eine höhere Überlebensrate auf. Ihre Neigung zur Ausbildung inflammatorischer Erkrankungen, wie z.B. der C57BL/6-Dermatitis oder einer Pyometra, schienen hierbei erhöht, wohingegen chronische Entzündungen der Niere und der Zahnalveolen erst zu einem späteren Zeitpunkt auftraten. Hier könnten ähnliche, immunmodulatorische Funktionen des CLCA1-Proteins bei Entzündungen eine Rolle spielen, wie sie bereits mehrfach für verschiedene Mausmodelle publiziert wurden. Ebenso wiesen die hier erhobenen Befunde der *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus auf ein mögliches erhöhtes Metastasierungsrisiko hämatopoetischer Neoplasien, auf eine mögliche erhöhte Neigung zur Ausbildung endokriner Adenome sowie zu Tumoren des Genitaltraktes hin, was eine bereits hypothetisierte Funktion von CLCA1 als Tumorsuppressor durchaus bestärken könnte. Inwiefern es sich bei den getroffenen Beobachtungen um direkte Auswirkungen des Fehlens des CLCA1-Proteins oder um zufällige Variationen handeln könnte, konnte aufgrund der niedrigen Prävalenz der Befunde sowie der geringen Gruppengrößen nicht abschließend beurteilt werden.

Mit dieser Altersstudie konnte ein erster Überblick über einen möglichen Phänotyp in der alternden *Clca1*<sup>-/-</sup>-Maus aufgezeigt werden. In Einklang mit der bisherigen Literatur wurden eine etwaige immunmodulatorische Funktion sowie die Rolle von CLCA1-Proteinen bei Tumorerkrankungen weiter in den Fokus gerückt. Diese initialen Beobachtungen geben wichtige Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen, vor allem hinsichtlich der Fragestellung, warum manche Pathogene oder Stimuli eine vermehrte und andere wiederum eine reduzierte Immunantwort hervorrufen könnten. Ebenso sollten für die Maus, ähnlich wie bereits für einige humane Tumore durchgeführt, Untersuchungen hinsichtlich einer möglicherweise erhöhten Tumorigressivität und -metastasierungsrate bei Verlust des CLCA1-Proteins angestrebt werden.

## 8 Summary

---

### Phenotyping of the Aging *Clca1*-knockout Mouse

Kristina Dietert

The CLCA protein family (chloride channel regulators, calcium-activated) has been in the focus of research by various research groups worldwide for several decades. It consists of complex, highly conserved proteins with a partly broad species-specifically varying expression pattern. In particular, the CLCA1 protein, which is synthesized and entirely secreted by mucus-producing cells, primarily of the respiratory and intestinal tract, exhibits pleiotropic but not yet fully understood functions in humans and mice and has been associated with mucus-related human diseases such as cystic fibrosis, asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Recently published studies have hypothesized that CLCA1 may act as mucus processor, immunomodulator or tumor suppressor.

Genetically-modified mouse strains are becoming increasingly important as excellent models for human diseases. *Clca1*-knockout models (*Clca1*<sup>-/-</sup>) have been generated and so far used to primarily address questions regarding inflammation. Naive, specified pathogen-free *Clca1*<sup>-/-</sup> mice of up to nine months of age lack an observable phenotype. In bacterially or chemically-induced inflammation models of the lungs, intestine, and joints, the adult *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse showed an immunomodulatory phenotype at up to 16 weeks of age. However, elderly mice develop a number of pathophysiological changes during their lifetime, such as the appearance of tumors and inflammatory or degenerative diseases as part of the normal aging process.

To date, no knowledge exists concerning the role of the CLCA1 protein in the aging process and the associated development of age-associated pathological changes. Consequently, the aim of this study was to investigate the role of a lack of the CLCA1 protein in the aging process of mice. Furthermore, it was determined whether lack of the CLCA1 protein may have an effect on the development of age-associated alterations and thus whether a lack of the protein has an influence on the health status of mice of advanced age. To this end, the aging *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse was extensively phenotyped. Clinical parameters such as body weight, comprehensive haematological and clinically chemical investigations of the blood as well as a complete pathological examination including organ weight determination, macroscopy, and histopathology were performed. The model of a cross-sectional aging study was chosen in order to be able to compare an identical number of aging *Clca1*<sup>-/-</sup> mice with their WT siblings in regard of the development of patho-physiological changes at defined timepoints.

In this study no strong unique and obvious phenotype was observed for the aging *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse, which makes an essential function of the CLCA1 protein in the aging process very questionable. Nevertheless, first observations on single animals were made for a possible age-related phenotype. While both genotypes of age-related physiology did not differ in the clinically determined parameters, initial pathological evidence for the existence of an aging phenotype of the *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse compared to the wild-type control animals could be determined, albeit without statistical significance yet. Despite a higher number of "systemically" diseased animals at advanced age, the *Clca1*<sup>-/-</sup> mice showed a higher survival rate. Their tendency of developing inflammatory diseases such as C57BL/6 dermatitis or pyometra seemed to be increased, whereas chronic inflammation of the kidney and dental alveoli occurred at a later age. Here, similar immunomodulatory functions of the CLCA1 protein could play a role in inflammation as have already been published for mouse models of several inflammatory conditions. Further findings of this study pointed to a slight possibility of an increased metastasis risk for haematopoietic neoplasia as well as an increased tendency toward development of endocrine adenomas and tumors of the genital tract in the *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse, which could certainly strengthen a possible function of CLCA1 acting as a tumor suppressor. In this study it could not be conclusively assessed to what extent the observations made could have been direct effects of the absence of the CLCA1 protein or solely random variations due to the low prevalence of findings and small group sizes.

Thus, this aging study provided a first overview of a possible phenotype in the aging *Clca1*<sup>-/-</sup> mouse. In line with the previous studies, a possibly immunomodulatory function as well as the role of CLCA1 in tumor diseases were suspected. In subsequent studies, these initial observations should be further investigated, especially regarding the underlying causative role of some specific pathogens or stimuli evoking an increased and others a reduced immune response. Investigations should also be conducted in mice with regard to an increased tumor aggressiveness and metastasis rate in case of loss of the CLCA1 protein, as has already been performed for several human tumors.

## 9 Abbildungsverzeichnis

---

	Seite
Abb. 1: Standardkäfig im Tierhaltungs- und Zuchtbereich.....	29
Abb. 2: Darstellung und Punktion der <i>Vena cava caudalis</i> .....	31
Abb. 3: Organ- und Gewebeschnitte für die histopathologische Untersuchung.....	37
Abb. 4: „Systemisch“ erkranktes Tier.....	42
Abb. 5: Körpergewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	45
Abb. 6: Absolute Gehirngewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	46
Abb. 7: Absolute Herzgewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	47
Abb. 8: Absolute Lebergewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	48
Abb. 9: Absolute Nierengewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	49
Abb. 10: Absolute Milzgewichte aller Tiere über die untersuchten Altersstufen.....	50
Abb. 11: Anzahl der pathologischen Veränderungen je Tier und Altersstufe.....	56
Abb. 12: Häufigkeit des Auftretens der Hepatitis über alle Altersstufen.....	58
Abb. 13: Schweregrad der Hepatitis über alle Altersstufen.....	58
Abb. 14: Einteilung der Schweregrade der Hepatitis.....	59
Abb. 15: C57BL/6-Dermatitis.....	59
Abb. 16: Histologisches Bild der Pyometra.....	60
Abb. 17: Ausgewählte „nicht-altersassoziierte“ Pathologien mit niedriger Prävalenz.....	60
Abb. 18: Häufigkeit des Auftretens der Hyalinose über alle Altersstufen.....	62
Abb. 19: Schweregrad der Hyalinose über alle Altersstufen.....	62
Abb. 20: Histologisches Bild der Hyalinose.....	63
Abb. 21: Häufigkeit des Auftretens der glandulärzystischen endometrialen Hyperplasie.....	63
Abb. 22: Schweregrad der glandulärzystischen endometrialen Hyperplasie über alle Altersstufen.....	64
Abb. 23: Histologisches Bild der glandulärzystischen endometrialen Hyperplasie.....	64
Abb. 24: Häufigkeit des Auftretens der Alveolitis über alle Altersstufen.....	65

	Seite
Abb. 25: Schweregrad der Alveolitis über alle Altersstufen.....	65
Abb. 26: Histologisches Bild der Alveolitis.....	66
Abb. 27: Ausgewählte, altersassoziierte Pathologien mit mittlerer Prävalenz.....	66
Abb. 28: Ausgewählte, altersassoziierte Pathologien mit niedriger Prävalenz.....	67
Abb. 29: Häufigkeit des Auftretens von Tumorerkrankungen über alle Altersstufen.....	68
Abb. 30: Häufigkeit des Auftretens von Lymphomen über alle Altersstufen.....	69
Abb. 31: Histologisches Bild eines typischen intestinalen Lymphoms.....	70
Abb. 32: Histologisches Bild eines typischen multizentrischen Lymphoms.....	70
Abb. 33: Häufigkeit des Auftretens von Adenomen über alle Altersstufen.....	71
Abb. 34: Histologische Bilder der Adenome unterschiedlicher Herkunft.....	71
Abb. 35: Häufigkeit des Auftretens von histiozytären Sarkomen über alle Altersstufen.....	72
Abb. 36: Histologisches Bild eines typischen histiozytären Sarkoms.....	72
Abb. 37: Häufigkeit des Auftretens von sonstigen Neoplasien über alle Altersstufen.....	73
Abb. 38: Histologische Bilder der sonstigen Neoplasien.....	73
Abb. 39: Hämatologie aller untersuchten Tiere.....	121
Abb. 40: Klinische Chemie aller untersuchten Tiere.....	126

## 10 Tabellenverzeichnis

---

	Seite
Tab. 1: Nomenklatur und Eingruppierung der orthologen Gene von Mensch und Maus.....	3
Tab. 2: Expressionsmuster von humanem und murinem CLCA1.....	5
Tab. 3: Zusammenfassung der <i>Clca1</i> -Knockout-Modelle.....	12
Tab. 4: Neoplastische Veränderungen der C57BL/6-Maus aus bisherigen Altersstudien.....	22
Tab. 5: „Nicht-neoplastische“ Veränderungen der C57BL/6-Maus aus bisherigen Altersstudien.....	22
Tab. 6: Studiendesign.....	25
Tab. 7: Primersequenzen und Schmelztemperaturen.....	26
Tab. 8: PCR-Ansatz „gob-5“.....	27
Tab. 9: Programmeinstellungen, PCR „gob-5“.....	27
Tab. 10: PCR-Ansatz „ <i>Clca1</i> “.....	27
Tab. 11: Programmeinstellungen, PCR „ <i>Clca1</i> “.....	28
Tab. 12: Herstellungsprotokoll des 5-fachen TBE-Puffers.....	28
Tab. 13: Längen der erwarteten PCR-Produkte, Genotypisierung.....	29
Tab. 14: Blutentnahmevolumina.....	31
Tab. 15: Organentnahmeprotokoll (Sektion nach OECD-, RITA- und NACAD-Standard).....	33
Tab. 16: Zuschnitt des Organspektrums.....	34
Tab. 17: Programm zur Entwässerung und Paraffineinbettung.....	35
Tab. 18: Entparaffinieren und Rehydrieren der histologischen Schnitte.....	36
Tab. 19: Färbeprotokoll Hämalaun-Eosin (HE).....	36
Tab. 20: Dehydrieren der histologischen Schnitte.....	37
Tab. 21: Untersuchungsbogen zur histopathologischen Auswertung.....	40
Tab. 22: Tatsächlich ausgewertete Anzahl der Tiere pro Gruppe.....	41
Tab. 23: „Systemisch“ erkrankte Tiere.....	43
Tab. 24: Körpergewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	44
Tab. 25: Gehirngewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	46
Tab. 26: Herzgewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	47

	Seite
Tab. 27: Lebergewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	48
Tab. 28: Nierengewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	49
Tab. 29: Milzgewichte der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	50
Tab. 30: Einflussfaktoren auf die Blutuntersuchung.....	51
Tab. 31: Referenzwerte Hämatologie.....	52
Tab. 32: Referenzwerte klinische Chemie.....	53
Tab. 33: Hämatologische Untersuchung der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	54
Tab. 34: Klinisch-chemische Untersuchung der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere aller Altersstufen.....	55
Tab. 35: Anzahl der „systemisch-erkrankten“ und verstorbenen Tiere über alle Altersstufen.....	57
Tab. 36: „Nicht-altersassoziierte“, pathologische Veränderungen.....	57
Tab. 37: „Altersassoziierte“, pathologische Veränderungen.....	61
Tab. 38: Zusammenfassung der Neoplasien über alle Altersstufen.....	68
Tab. 39: Prävalenz der Veränderungen dieser Studie im Vergleich zu Daten aus der Literatur.....	87
Tab. 40: Zusammenfassung der abweichenden Befunde zwischen <i>Ctca1</i> -Knockout- und Wildtyp-Tieren.....	88
Tab. 41: Körper- und Organgewichte, einschließlich Referenzdaten.....	119
Tab. 42: Hämatologie der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere, einschließlich Referenzdaten.....	120
Tab. 43: Klinische Chemie der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere, einschließlich Referenzdaten.....	125
Tab. 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere.....	129
Tab. 45: Schweregrade ausgewählter Pathologien.....	134

## 11 Literaturverzeichnis

---

- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Lin H, DiBiasio J, Pauli BU (2003) The interacting binding domains of the beta(4) integrin and calcium-activated chloride channels (CLCAs) in metastasis. *J Biol Chem* 278:49406-49416 doi:10.1074/jbc.M309086200
- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU (2001) The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem* 276:25438-25446 doi:10.1074/jbc.M100478200
- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU (2002) Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. *J Biol Chem* 277:34391-34400 doi:10.1074/jbc.M205307200
- Ackert-Bicknell CL et al. (2015) Aging research using mouse models. *Current Protocols in Mouse Biology* 5:95-133 doi:10.1002/9780470942390.mo140195
- Agnel M, Vermat T, Culouscou JM (1999) Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS letters* 455:295-301 doi:10.1016/s0014-5793(99)00891-1
- AKBT (2017) Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragten eV: Orientierungshilfe zur Belastungseinschätzung und Einstufung in Belastungsgrade von genetisch veränderten Maus- und Rattenlinien; [cited 2019 01/12], Available from: <http://www.ak-tierschutzbeauftragte.berlin/empfehlungen/>.
- Alevy YG et al. (2012) IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. *The Journal of Clinical Investigation* 122:4555-4568 doi:10.1172/jci64896
- Anthonisen NR (1988) Chronic obstructive pulmonary disease. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 138:503-510
- Barnes KC, Marsh DG (1998) The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunology Today* 19:325-332 doi:10.1016/s0167-5699(97)01241-3
- Barnes PJ (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8:183-192 doi:10.1038/nri2254

- BfR (2014) Definition of criteria for severity assessment of genetically altered laboratory animals: Communications No. 029/2014. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin: 25 July 2014
- BfR (2016) Severity assessment of genetically altered mice and rats-Version 2. Recommendation no. 002/2016 by the national Committee (TschG). Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, 9 September 2016
- Blackwell BN, Bucci TJ, Hart RW, Turturro A (1995) Longevity, body weight, and neoplasia in ad libitum-fed and diet-restricted C57BL6 mice fed NIH-31 open formula diet. *Toxicol Pathol* 23:570-582 doi:10.1177/019262339502300503
- Bolon B et al. (2008) Editorial: best pathology practices in research using genetically engineered mice. *Veterinary Pathology* 45:939-940 doi:10.1354/vp.45-6-939
- Bothe MK, Braun J, Mundhenk L, Gruber AD (2008) Murine mCLCA6 is an integral apical membrane protein of non-goblet cell enterocytes and co-localizes with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Histochem Cytochem* 56:495-509 doi:10.1369/jhc.2008.950592
- Bothe MK, Mundhenk L, Kaup M, Weise C, Gruber AD (2011) The murine goblet cell protein mCLCA3 is a zinc-dependent metalloprotease with autoproteolytic activity. *Mol Cells* 32:535-541 doi:10.1007/s10059-011-0158-8
- Braun J, Bothe MK, Mundhenk L, Beck CL, Gruber AD (2010) Murine mCLCA5 is expressed in granular layer keratinocytes of stratified epithelia. *Histochem Cell Biol* 133:285-299 doi:10.1007/s00418-009-0667-0
- Brayton C, Justice M, Montgomery CA (2001) Evaluating mutant mice: anatomic pathology. *Veterinary Pathology* 38:1-19 doi:10.1354/vp.38-1-1
- Brayton CF, Treuting PM, Ward JM (2012) Pathobiology of aging mice and GEM: background strains and experimental design. *Veterinary Pathology* 49:85-105 doi:10.1177/0300985811430696
- Brett, TJ (2015) CLCA1 and TMEM16A: The link towards potential cure for airway diseases. *Expert Rev Respir Med* 9(5):503-506 doi: 1586/17476348.2015.1081064
- Bronson RT, Lipman RD (1993) FRAR course on laboratory approaches to aging. The role of pathology in rodent experimental gerontology. *Aging (Milan, Italy)* 5:253-257 doi:10.1007/bf03324169

## LITERATURVERZEICHNIS

- Brouillard F et al. (2005) Blue native/SDS-PAGE analysis reveals reduced expression of the mCLCA3 protein in cystic fibrosis knock-out mice. *Mol Cell Proteomics* 4:1762-1775 doi:10.1074/mcp.M500098-MCP200
- Bustin SA, Li SR, Dorudi S (2001) Expression of the Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel genes CLCA1 and CLCA2 is downregulated in human colorectal cancer. *DNA and Cell Biology* 20:331-338 doi:10.1089/10445490152122442
- Chen JM, Stevens RA, Wray PW, Rawlings ND, Barrett AJ (1998) Thimet oligopeptidase: site-directed mutagenesis disproves previous assumptions about the nature of the catalytic site. *FEBS letters* 435:16-20 doi:10.1016/s0014-5793(98)01032-1
- Ching JC, Lobanova L, Loewen ME (2013) Secreted hCLCA1 is a signaling molecule that activates airway macrophages. *PLoS One* 8:e83130 doi:10.1371/journal.pone.0083130
- Daser A, Daheshia M, De Sanctis GT (2001) Genetics of allergen-induced asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108:167-174 doi:10.1067/mai.2001.116987
- De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M (2001) Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology* 55:1509-1519 doi:10.1016/s0093-691x(01)00498-8
- Dietert K, Reppe K, Mundhenk L, Witzernath M, Gruber AD (2014) mCLCA3 modulates IL-17 and CXCL-1 induction and leukocyte recruitment in murine *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One* 9:e102606 doi:10.1371/journal.pone.0102606
- Dodge JA et al. (1997) Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee *Arch Dis Child* 77:493-496 doi:10.1136/adc.77.6.493
- Donovan JC, Mayo JG, Rice JM, Ward JM, Fox JG (1993) Helicobacter-associated hepatitis of mice. *Laboratory Animal Science* 43:403
- Ebbinghaus M, Gajda M, Holtzman MJ, Schulz S, Schaible HG (2014) Does chloride channel accessory 3 have a role in arthritis pain? A study on murine antigen-induced arthritis. *Neurosci Lett* 576:40-44 doi:10.1016/j.neulet.2014.05.051
- EC (2013) European Commission Expert Working Group. Working document on genetically altered animals, Brussels, 24 January 2013

- Elble RC, Walia V, Cheng HC, Connon CJ, Mundhenk L, Gruber AD, Pauli BU (2006) The putative chloride channel hCLCA2 has a single C-terminal transmembrane segment. *J Biol Chem* 281:29448-29454 doi:10.1074/jbc.M605919200
- Elmore SA, Peddada SD (2009) Points to consider on the statistical analysis of rodent cancer bioassay data when incorporating historical control data. *Toxicol Pathol* 37:672-676 doi:10.1177/0192623309339606
- Erickson NA, Dietert K, Enders J, Glauben R, Nouailles G, Gruber AD, Mundhenk L (2018) Soluble mucus component CLCA1 modulates expression of leukotactic cytokines and BPIFA1 in murine alveolar macrophages but not in bone marrow-derived macrophages. *Histochem Cell Biol* 149:619-633 doi:10.1007/s00418-018-1664-y
- Erickson NA, Mundhenk L, Giovannini S, Glauben R, Heimesaat MM, Gruber AD (2016) Role of goblet cell protein CLCA1 in murine DSS colitis. *J Inflamm (Lond)* 13:5 doi:10.1186/s12950-016-0113-8
- Erickson NA et al. (2015) The Goblet Cell Protein Clca1 (Alias mClca3 or Gob-5) Is Not Required for Intestinal Mucus Synthesis, Structure and Barrier Function in Naive or DSS-Challenged Mice. *PLoS One* 10:e0131991 doi:10.1371/journal.pone.0131991
- EU (2010) Europäisches Parlament und Rat: Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere; [cited 2019 01/12]
- Fay MP, Proschan MA (2010) Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys* 4:1-39 doi:10.1214/09-ss051
- FELASA (2012) FELASA Guidelines and Recommendations, [cited 2019 01/12], Available from:[http://eslav-clam.org/uploads/editor/Felasa\\_Guidelines\\_and\\_Recommendations\\_2012.pdf](http://eslav-clam.org/uploads/editor/Felasa_Guidelines_and_Recommendations_2012.pdf).
- Fox JG (2007) The mouse in biomedical research. American College of Laboratory Animal Medicine series, 2nd edn. Elsevier, AP, Amsterdam
- Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT, American College of Laboratory Animal Medicine. (2015) Laboratory animal medicine. American College of Laboratory Animal Medicine series, Third edition. edn. Elsevier/Academic Press, Amsterdam

## LITERATURVERZEICHNIS

- Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman SE, Horwitz BH (2011) *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunology* 4:22-30 doi:10.1038/mi.2010.61
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Taylor NS, Xu S, Feng Y, Keys S (2004) *Helicobacter bilis*-associated hepatitis in outbred mice. *Comparative Medicine* 54:571-577
- Frede J et al. (2013) Ovarian cancer: Ion channel and aquaporin expression as novel targets of clinical potential. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 49:2331-2344 doi:10.1016/j.ejca.2013.03.016
- Gaspar KJ, Racette KJ, Gordon JR, Loewen ME, Forsyth GW (2000) Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. *Physiological Genomics* 3:101-111
- Gibson A, Lewis AP, Affleck K, Aitken AJ, Meldrum E, Thompson N (2005) hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J Biol Chem* 280:27205-27212 doi:10.1074/jbc.M504654200
- Gruber AD, Elble RC, Ji HL, Schreur KD, Fuller CM, Pauli BU (1998a) Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel proteins. *Genomics* 54:200-214 doi:10.1006/geno.1998.5562
- Gruber AD, Elble RC, Pauli BU (2002) Discovery and cloning of the CLCA gene family. *Curr Top Membr* 53:367-387
- Gruber AD, Gandhi R, Pauli BU (1998b) The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochemistry and Cell Biology* 110:43-49 doi:DOI 10.1007/s004180050263
- Gruber AD, Pauli BU (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels'. *Bba-Gene Struct Expr* 1444:418-423 doi:Doi 10.1016/S0167-4781(99)00008-1
- Grune B, Hensel A, Schonfelder G (2014) Animal welfare: Rules for assessing pain in lab animals. *Nature* 512:28 doi:10.1038/512028c
- Guo L, Johnson RS, Schuh JC (2000) Biochemical characterization of endogenously formed eosinophilic crystals in the lungs of mice. *J Biol Chem* 275:8032-8037 doi:10.1074/jbc.275.11.8032

- Haines DC, Chattopadhyay S, Ward JM (2001) Pathology of aging B6;129 mice. *Toxicol Pathol* 29:653-661 doi:10.1080/019262301753385988
- Hamann M et al. (2009) Human ClCa1 modulates anionic conduction of calcium-dependent chloride currents. *The Journal of Physiology* 587:2255-2274 doi:10.1113/jphysiol.2009.170159
- Hampton AL et al. (2012) Progression of ulcerative dermatitis lesions in C57BL/6Crl mice and the development of a scoring system for dermatitis lesions. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 51:586-593
- Hauber HP, Lavigne F, Hung HL, Levitt RC, Hamid Q (2010) Effect of Th2 type cytokines on hCLCA1 and mucus expression in cystic fibrosis airways. *J Cyst Fibros* 9:277-279 doi:10.1016/j.jcf.2010.05.002
- Hauber HP et al. (2003) Increased expression of interleukin-9, interleukin-9 receptor, and the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in the upper airways of patients with cystic fibrosis. *Laryngoscope* 113:1037-1042 doi:10.1097/00005537-200306000-00022
- Hauber HP et al. (2004) Expression of HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction. *Eur Respir J* 23:846-850 doi:10.1183/09031936.04.00096504
- Hedrich HJ (2012) *The laboratory mouse*. Second edition / edn. AP, Elsevier, Amsterdam
- Hegab AE et al. (2004) CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 41:e27 doi:10.1136/jmg.2003.012484
- Hoshino M et al. (2002) Increased expression of the human Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1132-1136 doi:10.1164/ajrccm.165.8.2107068
- Hrapkiewicz K, Colby L, Denison P (2013) *Clinical laboratory animal medicine : an introduction*. Fourth edition. edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa
- Hu DY, Ansari D, Bauden M, Zhou QM, Andersson R (2019) The Emerging Role of Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 in Cancer. *Anticancer Res* 39:1661-1666 doi:10.21873/anticancer.13271
- Hu DY et al. (2018) Calcium-activated chloride channel regulator 1 as a prognostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Bmc Cancer* 18 doi:ARTN 109610.1186/s12885-018-5013-2

## LITERATURVERZEICHNIS

- IMSR (2019) International Mouse Strain Resource, [cited 2019 01/12], Available from: <http://www.findmice.org/>.
- JAX-Mice (2007a) The Jackson Laboratory: Physiological Data summary - aged C57BL/6J; [cited 2019 01/12]; Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/most-popular-jax-mice-strains/aged-b6>.
- JAX-Mice (2007b) The Jackson Laboratory: Physiological data summary - C57BL/6J; [cited 2019 01/12]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>.
- JAX-mice (2017) The Jackson Laboratory: Aged C57BL/6J mice for research studies: considerations, applications, and best practices; [cited 2019 01/12]; Available from: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/manuals-posters-and-guides/jmcrs-manuals-guides/aged-b6-whitepaper#>.
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *P Natl Acad Sci USA* 105:15064-15069 doi:10.1073/pnas.0803124105
- Kaeberlein M (2016) The Biology of Aging: Citizen Scientists and Their Pets as a Bridge Between Research on Model Organisms and Human Subjects. *Veterinary Pathology* 53:291-298 doi:10.1177/0300985815591082
- Kamada F et al. (2004) Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun* 5:540-547 doi:10.1038/sj.gene.6364124
- Kavirayani AM, Sundberg JP, Foreman O (2012) Primary neoplasms of bones in mice: retrospective study and review of literature. *Veterinary Pathology* 49:182-205 doi:10.1177/0300985811398252
- Kilkenny C et al. (2009) Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One* 4:e7824 doi:10.1371/journal.pone.0007824
- Kittel B et al. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* 55:413-431
- Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S (1999) Cloning and identification of the gene gob-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 255:347-351 doi:DOI 10.1006/bbrc.1999.0168

- Ladiges W (2011) Pathobiology of aging: an old problem gets a new look. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases* 1 doi:10.3402/pba.v1i0.7281
- Ladiges W, Ikeno Y, Liggitt D, Treuting PM (2013) Pathology is a critical aspect of preclinical aging studies. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases* 3 doi:10.3402/pba.v3i0.22451
- Ladiges W, Van Remmen H, Strong R, Ikeno Y, Treuting P, Rabinovitch P, Richardson A (2009) Lifespan extension in genetically modified mice. *Aging Cell* 8:346-352 doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00491.x
- Lawson GW, Sato A, Fairbanks LA, Lawson PT (2005) Vitamin E as a treatment for ulcerative dermatitis in C57BL/6 mice and strains with a C57BL/6 background. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 44:18-21
- Leverkoehne I, Gruber AD (2002) The murine mCLCA3 (alias gob-5) protein is located in the mucin granule membranes of intestinal, respiratory, and uterine goblet cells. *J Histochem Cytochem* 50:829-838 doi:10.1177/002215540205000609
- Li XF et al. (2017) CLCA1 suppresses colorectal cancer aggressiveness via inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cell Commun Signal* 15 doi:ARTN 3810.1186/s12964-017-0192-z
- Liang S, Hosur KB, Domon H, Hajishengallis G (2010) Periodontal inflammation and bone loss in aged mice. *Journal of Periodontal Research* 45:574-578 doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01245.x
- Locksley RM (2010) Asthma and allergic inflammation. *Cell* 140:777-783 doi:10.1016/j.cell.2010.03.004
- Loewen ME, Bekar LK, Walz W, Forsyth GW, Gabriel SE (2004) pCLCA1 lacks inherent chloride channel activity in an epithelial colon carcinoma cell line. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 287:G33-41 doi:10.1152/ajpgi.00023.2004
- Long AJ, Sypek JP, Askew R, Fish SC, Mason LE, Williams CM, Goldman SJ (2006) Gob-5 contributes to goblet cell hyperplasia and modulates pulmonary tissue inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:357-365 doi:10.1165/rcmb.2005-0451OC
- Maddatu TP, Grubb SC, Bult CJ, Bogue MA (2012) Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res* 40:D887-D894 doi:10.1093/nar/gkr1061

## LITERATURVERZEICHNIS

- Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M (2014) FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48:178-192 doi:10.1177/0023677213516312
- Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet (London, England)* 370:765-773 doi:10.1016/s0140-6736(07)61380-4
- McAuley DF, Elborn JS (2000) Cystic fibrosis: basic science. *Paediatric Respiratory Reviews* 1:93-100 doi:10.1053/prrv.2000.0029
- McFadden ER, Jr., Gilbert IA (1992) Asthma. *The New England Journal of Medicine* 327:1928-1937 doi:10.1056/nejm199212313272708
- MGI (2019) Mouse Genome Informatics, [cited 2019 01/12], Available from: <http://www.informatics.jax.org/>.
- Michaud CR, Qin J, Elkins WR, Gozalo AS (2016) Comparison of 3 Topical Treatments against Ulcerative Dermatitis in Mice with a C57BL/6 Background. *Comparative Medicine* 66:100-104
- Miller RA et al. (2007) An Aging Interventions Testing Program: study design and interim report. *Aging Cell* 6:565-575 doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00311.x
- Moolenbeek C, Ruitenberg EJ (1981) The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 15:57-59
- Morawietz G et al. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-- Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* 55:433-449
- Moskowitz SM et al. (2008) Shifting patterns of inhaled antibiotic use in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 43:874-881 doi:10.1002/ppul.20873
- Mundhenk L, Alfalah M, Elble RC, Pauli BU, Naim HY, Gruber AD (2006) Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. *Journal of Biological Chemistry* 281:30072-30080 doi:10.1074/jbc.M606489200
- Mundhenk L et al. (2012) mCLCA3 does not contribute to calcium-activated chloride conductance in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:87-93 doi:10.1165/rcmb.2010-0508OC

- Murray AB, Luz A (1990) Acidophilic macrophage pneumonia in laboratory mice. *Veterinary Pathology* 27:274-281 doi:10.1177/030098589002700409
- Musrap N, Tuccitto A, Karagiannis G, Saraon P, Diamandis EP (2015a) Comparative proteomics of ovarian cancer spheroid formation reveals an increased expression of calcium-activated chloride channel regulator 1. *Gynecol Oncol* 137:116-116 doi:10.1016/j.ygyno.2015.01.288
- Musrap N, Tuccitto A, Karagiannis GS, Saraon P, Batruch I, Diamandis EP (2015b) Comparative Proteomics of Ovarian Cancer Aggregate Formation Reveals an Increased Expression of Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1). *Journal of Biological Chemistry* 290:17218-17227 doi:10.1074/jbc.M115.639773
- Nakanishi A et al. (2001) Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5175-5180 doi:10.1073/pnas.081510898
- NIH (2019) Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals, [cited 2019 01/12], Available from: [https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/b13\\_endpoints\\_guidelines\\_24apr2019.pdf](https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/b13_endpoints_guidelines_24apr2019.pdf).
- Nystrom EEL, Arike L, Ehrencrona E, Hansson GC, Johansson MEV (2019) Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1) forms non-covalent oligomers in colonic mucus and has mucin 2-processing properties. *J Biol Chem* 294:17075-17089 doi:10.1074/jbc.RA119.009940
- Nystrom EEL, Birchenough GMH, van der Post S, Arike L, Gruber AD, Hansson GC, Johansson MEV (2018) Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine* 33:134-143 doi:10.1016/j.ebiom.2018.05.031
- O'Connell KE et al. (2015) Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comparative Medicine* 65:96-113
- Parameswaran K, Hildreth AJ, Chadha D, Keaney NP, Taylor IK, Bansal SK (1998) Asthma in the elderly: underperceived, underdiagnosed and undertreated; a community survey. *Respir Med* 92:573-577 doi:10.1016/s0954-6111(98)90311-0
- Patel AC, Brett TJ, Holtzman MJ (2009) The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu Rev Physiol* 71:425-449 doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163253

## LITERATURVERZEICHNIS

- Patel AC et al. (2006) Genetic segregation of airway disease traits despite redundancy of calcium-activated chloride channel family members. *Physiol Genomics* 25:502-513 doi:10.1152/physiolgenomics.00321.2005
- Pauli BU, Abdel-Ghany M, Cheng HC, Gruber AD, Archibald HA, Elble RC (2000) Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 27:901-905 doi:10.1046/j.1440-1681.2000.03358.x
- Pawlowski K, Lepisto M, Meinander N, Sivars U, Varga M, Wieslander E (2006) Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels. *Proteins* 63:424-439 doi:10.1002/prot.20887
- Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C (2007) Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62:758-766 doi:10.1136/thx.2006.070169
- Pettan-Brewer C, Treuting PM (2011) Practical pathology of aging mice. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases* 1 doi:10.3402/pba.v1i0.7202
- Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB (2009) Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 43:165-173 doi:10.1258/la.2008.008009
- Ran S, Benos DJ (1991) Isolation and functional reconstitution of a 38-kDa chloride channel protein from bovine tracheal membranes. *J Biol Chem* 266:4782-4788
- Ran S, Benos DJ (1992) Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl<sup>-</sup> channel protein isolated from bovine trachea. *J Biol Chem* 267:3618-3625
- Rivera J, Tessarollo L (2008) Genetic background and the dilemma of translating mouse studies to humans. *Immunity* 28:1-4 doi:10.1016/j.immuni.2007.12.008
- Robichaud A et al. (2005) Gob-5 is not essential for mucus overproduction in preclinical murine models of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:303-314 doi:10.1165/rcmb.2004-0372OC
- Rodriguez-Pineiro AM, Bergstrom JH, Ermund A, Gustafsson JK, Schutte A, Johansson ME, Hansson GC (2013) Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set

- of core proteins. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 305:G348-356 doi:10.1152/ajpgi.00047.2013
- Rogers CS et al. (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321:1837-1841 doi:10.1126/science.1163600
- Rosai J (2007) Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology Laboratory investigation. *Journal of Technical Methods and Pathology* 87:403-408 doi:10.1038/labinvest.3700551
- Rosli Y, Breckenridge LJ, Smith RA (1999) An ultrastructural study of age-related changes in mouse olfactory epithelium. *J Electron Microsc* 48:77-84 doi:DOI 10.1093/oxford journals.jmicro.a023653
- Rouze A, Cottreau A, Nseir S (2014) Chronic obstructive pulmonary disease and the risk for ventilator-associated pneumonia. *Current opinion in Critical Care* 20:525-531 doi:10.1097/mcc.0000000000000123
- Rowntree RK, Harris A (2003) The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of Human Genetics* 67:471-485 doi:10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x
- Ruehl-Fehlert C et al. (2003) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-part 1. *Exp Toxicol Pathol* 55:91-106
- Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Berry KN, Nichols CG, Brett TJ (2017) Modulation of TMEM16A channel activity by the von Willebrand factor type A (VWA) domain of the calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1). *J Biol Chem* 292(22) 9164-9174 doi:10.1074/jbc.M117.788232
- Sarna JR, Dyck RH, Wishaw IQ (2000) The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behavioural Brain Research* 108:39-45 doi:10.1016/s0166-4328(99)00137-0
- Schnell MA, Hardy C, Hawley M, ProPERT KJ, Wilson JM (2002) Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther* 13:155-161 doi:10.1089/10430340152712700
- Snyder JM, Ward JM, Treuting PM (2016) Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies. *Veterinary Pathology* 53:233-243 doi:10.1177/0300985815610391
- Song WJ et al. (2012) Association between obesity and asthma in the elderly population: potential roles of abdominal subcutaneous adiposity and sarcopenia. *Ann Allerg Asthma Im* 109:243-248 doi:10.1016/j.anai.2012.07.017

## LITERATURVERZEICHNIS

- Sonoda Y, Sasaki K (2012) Hepatic extramedullary hematopoiesis and macrophages in the adult mouse: histometrical and immunohistochemical studies. *Cells, Tissues, Organs* 196:555-564 doi:10.1159/000338336
- Steinke JW et al. (2003) Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: importance to eosinophilia and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111:342-349 doi:10.1067/mai.2003.67
- Sundberg JP et al. (2011) The mouse as a model for understanding chronic diseases of aging: the histopathologic basis of aging in inbred mice. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases* 1 doi:10.3402/pba.v1i0.7179
- Szymanska H et al. (2014) Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging mice of unique and common inbred strains contribution to modeling of human neoplastic diseases. *Veterinary Pathology* 51:663-679 doi:10.1177/0300985813501334
- Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP (2002) Asthma. *Lancet* (London, England) 360:1313-1322 doi:10.1016/s0140-6736(02)11312-2
- Taylor NS, Xu S, Nambiar P, Dewhirst FE, Fox JG (2007) Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2166-2172 doi:10.1128/jcm.00137-07
- Thai P, Chen Y, Dolganov G, Wu R (2005) Differential regulation of MUC5AC/Muc5ac and hCLCA-1/mGob-5 expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:523-530 doi:10.1165/rcmb.2004-0220RC
- Thrall MA (2012) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2nd edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa
- TierSchG (2013) Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2586) geändert worden ist. [Cited 2019 01/12]
- Toda M, Tulic MK, Levitt RC, Hamid Q (2002) A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. *J Allergy Clin Immun* 109:246-250 doi:10.1067/mai.2002.121555
- Tomlinson L et al. (2013) *Best practices for veterinary toxicologic clinical pathology, with*

- emphasis on the pharmaceutical and biotechnology industries. *Veterinary Clinical Pathology* 42:252-269 doi:10.1111/vcp.12059
- Treuting PM, Clifford CB, Sellers RS, Brayton CF (2012) Of mice and microflora: considerations for genetically engineered mice. *Veterinary Pathology* 49:44-63 doi:10.1177/0300985811431446
- Treuting PM et al. (2008) Reduction of age-associated pathology in old mice by overexpression of catalase in mitochondria. *The Journals of Gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 63:813-822 doi:10.1093/gerona/63.8.813
- Treuting PM, Snyder JM (2015) Mouse Necropsy. *Current protocols in Mouse Biology* 5:223-233 doi:10.1002/9780470942390.mo140296
- Treuting PM, Snyder JM, Ikeno Y, Schofield PN, Ward JM, Sundberg JP (2016) The Vital Role of Pathology in Improving Reproducibility and Translational Relevance of Aging Studies in Rodents. *Veterinary Pathology* 53:244-249 doi:10.1177/0300985815620629
- Uchihashi M, Wilding LA, Nowland MH (2015) Surgical Correction of Rectal Prolapse in Laboratory Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 54:433-438
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 1:13-29 doi:10.1016/s1569-1993(01)00003-0
- Vestbo J (2014) COPD: definition and phenotypes. *Clinics in Chest Medicine* 35:1-6 doi:10.1016/j.ccm.2013.10.010
- Wang K et al. (2007) Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 is correlated with mucus overproduction in the airways of Chinese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)* 120:1051-1057
- Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE (1994) Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol* 145:959-968
- Ward JM et al. (2006) Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol* 34:708-715 doi:10.1080/01926230600918876
- Ward JM, Yoon M, Anver MR, Haines DC, Kudo G, Gonzalez FJ, Kimura S (2001) Hyalinosis and Ym1/Ym2 gene expression in the stomach and respiratory tract of 129S4/SvJae

## LITERATURVERZEICHNIS

- and wild-type and CYP1A2-null B6, 129 mice. *Am J Pathol* 158:323-332 doi:10.1016/S0002-9440(10)63972-7
- Ward JM, Youssef SA, Treuting PM (2016) Why Animals Die: An Introduction to the Pathology of Aging. *Veterinary Pathology* 53:229-232 doi:10.1177/0300985815612151
- Waterston RH et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562 doi:10.1038/nature01262
- Weindruch R, Masoro EJ (1991) Concerns about rodent models for aging research. *Journal of Gerontology* 46:B87-88 doi:10.1093/geronj/46.3.b87
- Whary MT, Fox JG (2004) Natural and experimental Helicobacter infections. *Comparative Medicine* 54:128-158
- Wheeler DL et al. (2008) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 36:D13-21 doi:10.1093/nar/gkm1000
- Whittaker CA, Hynes RO (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13:3369-3387 doi:10.1091/mbc.e02-05-0259
- WHO (2019) Chronic obstructive pulmonary disease: World Health Organization; [cited 2019 01/12]. Available from: <https://www.who.int/respiratory/copd/en/>.
- Winpenny JP, Marsey LL, Sexton DW (2009) The CLCA gene family: putative therapeutic target for respiratory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8:146-160 doi:10.2174/187152809788462590
- Wittig O, Paez-Cortez J, Cardier JE (2010) Liver sinusoidal endothelial cells promote B lymphopoiesis from primitive hematopoietic cells. *Stem cells and Development* 19:341-350 doi:10.1089/scd.2009.0300
- Wolfensohn S, Lloyd M (2013) Handbook of laboratory animal management and welfare. 4th edn. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK
- Woodruff PG et al. (2007) Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15858-15863 doi:10.1073/pnas.0707413104
- Wu Y et al. (2016) Effect of Aging on Periodontal Inflammation, Microbial Colonization, and

- Disease Susceptibility. *Journal of Dental Research* 95:460-466 doi:10.1177/0022034515625962
- Yang B, Cao L, Liu B, McCaig CD, Pu J (2013) The transition from proliferation to differentiation in colorectal cancer is regulated by the calcium activated chloride channel A1. *PLoS One* 8:e60861 doi:10.1371/journal.pone.0060861
- Yang B et al. (2015) Low expression of chloride channel accessory 1 predicts a poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer* 121:1570-1580 doi:10.1002/cncr.29235
- Yao H, Rahman I (2011) Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254:72-85 doi:10.1016/j.taap.2009.10.022
- Young FD, Newbigging S, Choi C, Keet M, Kent G, Rozmahel RF (2007) Amelioration of cystic fibrosis intestinal mucous disease in mice by restoration of mCLCA3. *Gastroenterology* 133:1928-1937 doi:10.1053/j.gastro.2007.10.007
- Yurtsever Z et al. (2012) Self-cleavage of human CLCA1 protein by a novel internal metalloprotease domain controls calcium-activated chloride channel activation. *J Biol Chem* 287:42138-42149 doi:10.1074/jbc.M112.410282
- Zeiss CJ (2002) Mutant mouse pathology: an exercise in integration. *Lab Animal* 31:34-39 doi:10.1038/5000124
- Zeiss CJ, Ward JM, Allore HG (2012) Designing phenotyping studies for genetically engineered mice. *Veterinary Pathology* 49:24-31 doi:10.1177/0300985811417247
- Zhang HL, He L (2010) Overexpression of mclca3 in airway epithelium of asthmatic murine models with airway inflammation. *Chinese Med J-Peking* 123:1603-1606 doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.12.022
- Zhou Y et al. (2001) Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:486-491 doi:10.1165/ajrcmb.25.4.4578
- Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU (1991) Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9568-9572 doi:10.1073/pnas.88.21.9568
- Zintzsch A et al. (2017) Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines. *Lab Anim* 51:573-582 doi:10.1177/0023677217718863

## 12 Anhang

---

### 12.1 Zusammenstellung der detaillierten Untersuchungsergebnisse

Im Folgenden erfolgte eine Zusammenstellung aller Daten der klinischen Untersuchung (KGW, OGW, Hämatologie und klinische Chemie) sowie der pathologischen Untersuchung.

	Seite
<b>12.1.1</b> Deskriptive Statistik der Körper- und Organgewichte vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten.....	119
<b>12.1.2</b> Deskriptive Statistik der Hämatologie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten.....	120
<b>12.1.3</b> Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere.....	121
<b>12.1.4</b> Deskriptive Statistik der klinischen Chemie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten.....	125
<b>12.1.5</b> Graphische Darstellung der klinischen Chemie aller Tiere.....	126
<b>12.1.6</b> Zusammenfassung der pathologischen Befunde aller untersuchten Tiere.....	129
<b>12.1.7</b> Zusammenfassung der Schweregrade ausgewählter pathologischer Veränderungen.....	134

**12.1.1 Deskriptive Statistik der Körper- und Organgewichte vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten**

*Tabelle 41: Körper- und Organgewichte einschließlich Referenzdaten*

			2 Monate			12 Monate			18 Monate			
			Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®	
			WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	
Parameter		Einheit	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>		
<b>Körpergewicht</b>			g	20,32	22,32	18,28	27,20	28,46	39,70	31,13	26,77	40,40
<b>Gehirn</b>	absolut	mg	453,02	465,62	417,00	477,57	477,78	460,00	488,47	468,63	460,00	
	relativ	%	2,23	2,09	2,35	1,76	1,68	1,16	1,57	1,75	1,16	
<b>Herz</b>	absolut	mg	128,46	127,56	109,00	147,47	153,92	130,00	169,37	147,83	140,00	
	relativ	%	0,63	0,57	0,61	0,54	0,54	0,34	0,54	0,55	0,34	
<b>Leber</b>	absolut	mg	721,64	808,14	913,00	973,87	881,86	1570,00	996,80	911,30	1580,00	
	relativ	%	3,55	3,62	5,12	3,58	3,08	3,96	3,22	3,39	3,92	
<b>Nieren</b>	absolut	mg	245,00	277,64	262,00	309,57	352,56	350,00	395,20	349,70	360,00	
	relativ	%	1,21	1,24	1,48	1,14	1,24	0,88	1,27	1,31	0,92	
<b>Milz</b>	absolut	mg	78,96	88,34	72,00	119,10	135,10	100,00	140,97	117,10	120,00	
	relativ	%	0,39	0,40	0,41	0,44	0,47	0,26	0,45	0,44	0,30	

*JAX® = Referenzwerte des Jackson Laboratory, Mouse Phenome Database, WT = Wildtyp, *Clca1<sup>-/-</sup>* = *Clca1*-Knockout*

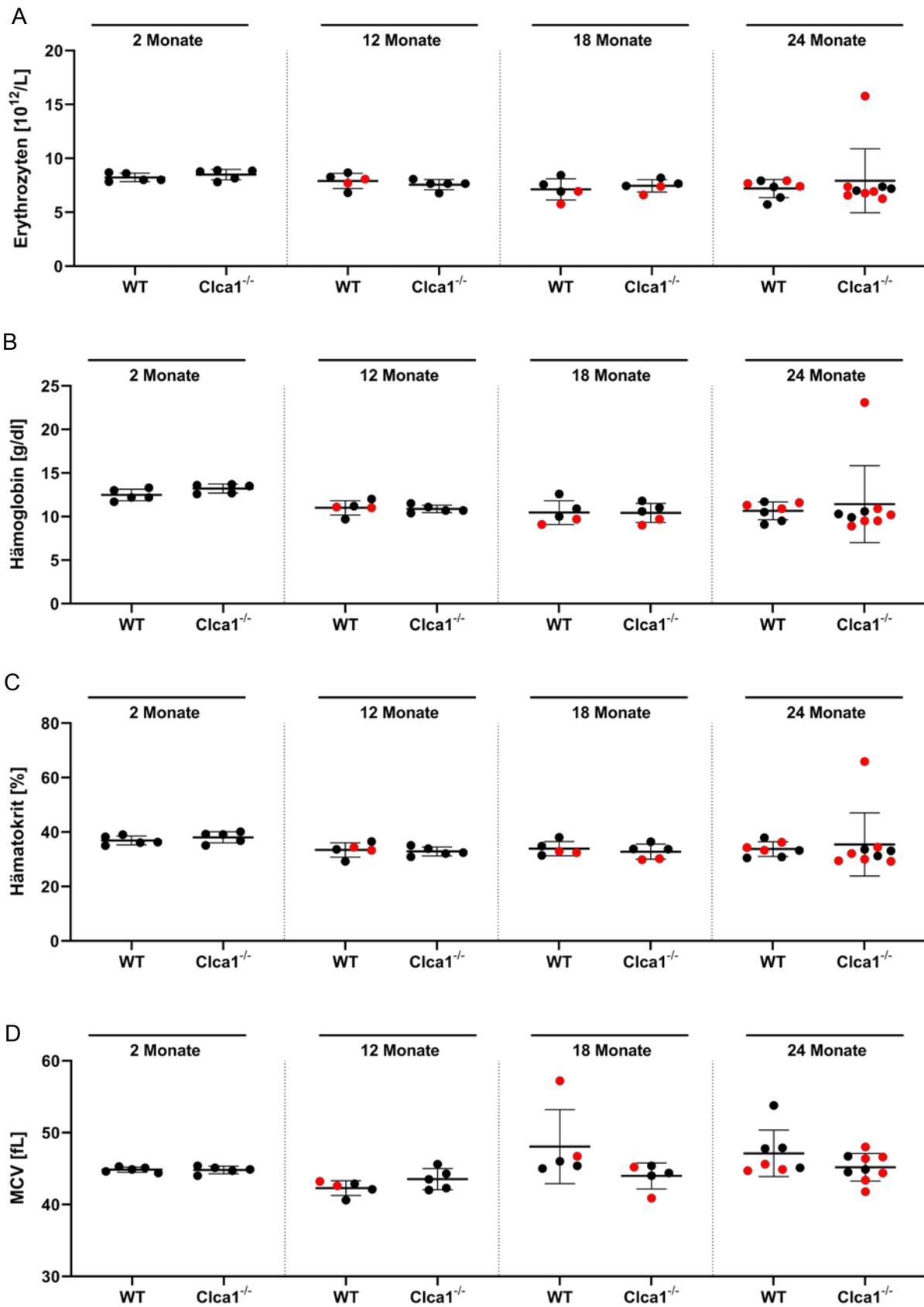
**12.1.2 Deskriptive Statistik der Hämatologie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten**

*Tabelle 42: Hämatologie der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere einschließlich Referenzdaten*

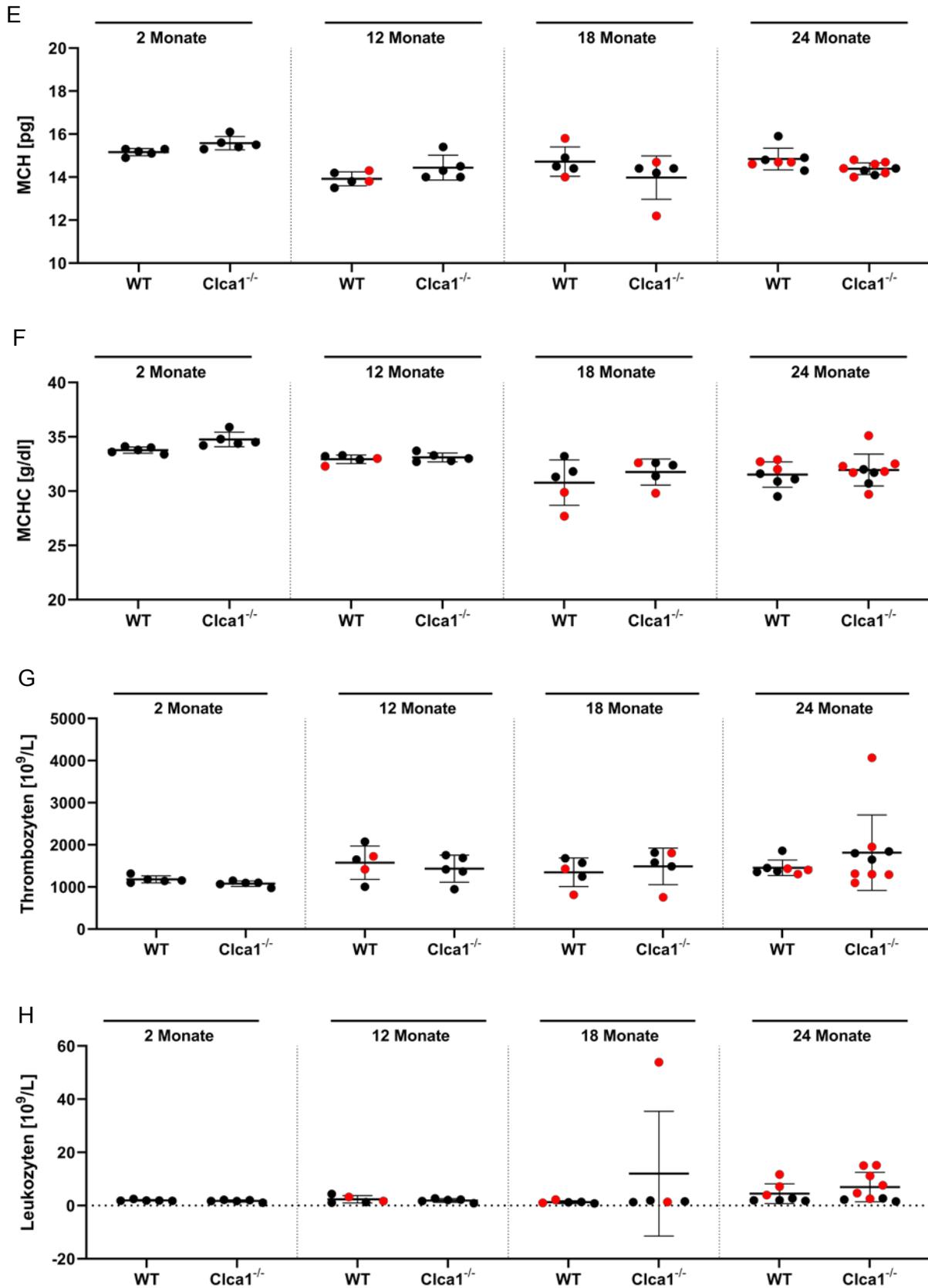
		2 Monate			12 Monate			18 Monate		
		Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®
		WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J
Parameter	Einheit	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	
Erythrozyten	10 <sup>12</sup> /L	8,23	8,49	10,77	7,92	7,56	8,20	7,64	7,76	8,30
Hämoglobin	g/dl	12,48	13,22	17,00	10,97	10,88	11,40	11,17	11,13	11,60
Hämatokrit	%	36,92	38,06	51,50	33,10	32,88	36,80	34,73	34,63	35,40
MCV	fL	44,86	44,82	47,80	41,87	43,54	44,90	45,47	44,60	43,10
MCH	pg	15,16	15,58	15,80	13,83	14,44	13,90	14,60	14,33	14,10
MCHC	g/dl	33,78	34,76	33,20	33,13	33,10	31,00	32,10	32,13	32,70
Thrombozyten	10 <sup>9</sup> /L	1180,00	1079,40	1019,00	1579,00	1435,20	816,00	1500,00	1627,33	937,00
Leukozyten	10 <sup>9</sup> /L	1,99	1,73	3,48	2,26	1,92	5,30	1,13	1,57	3,60
Neutrophile	%	8,02	8,98	7,40	16,10	10,18	10,80	26,93	28,57	17,80
Lymphozyten	%	85,10	88,00	88,60	75,60	79,44	80,80	60,37	57,43	74,20
Monozyten	%	5,92	2,30	0,70	11,67	7,16	5,10	12,70	13,37	5,40
Eosinophile	%	0,66	0,52	2,60	0,67	0,56	2,40	0,00	0,63	2,00
Basophile	%	0,30	0,20	0,20	0,40	2,66	0,30	0,00	0,00	0,20
Retikulozyten	%	5,00	4,39	3,60	5,06	5,48	2,90	6,04	5,16	3,40

*JAX® = Referenzwerte des Jackson Laboratory, Mouse Phenome Database, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout*

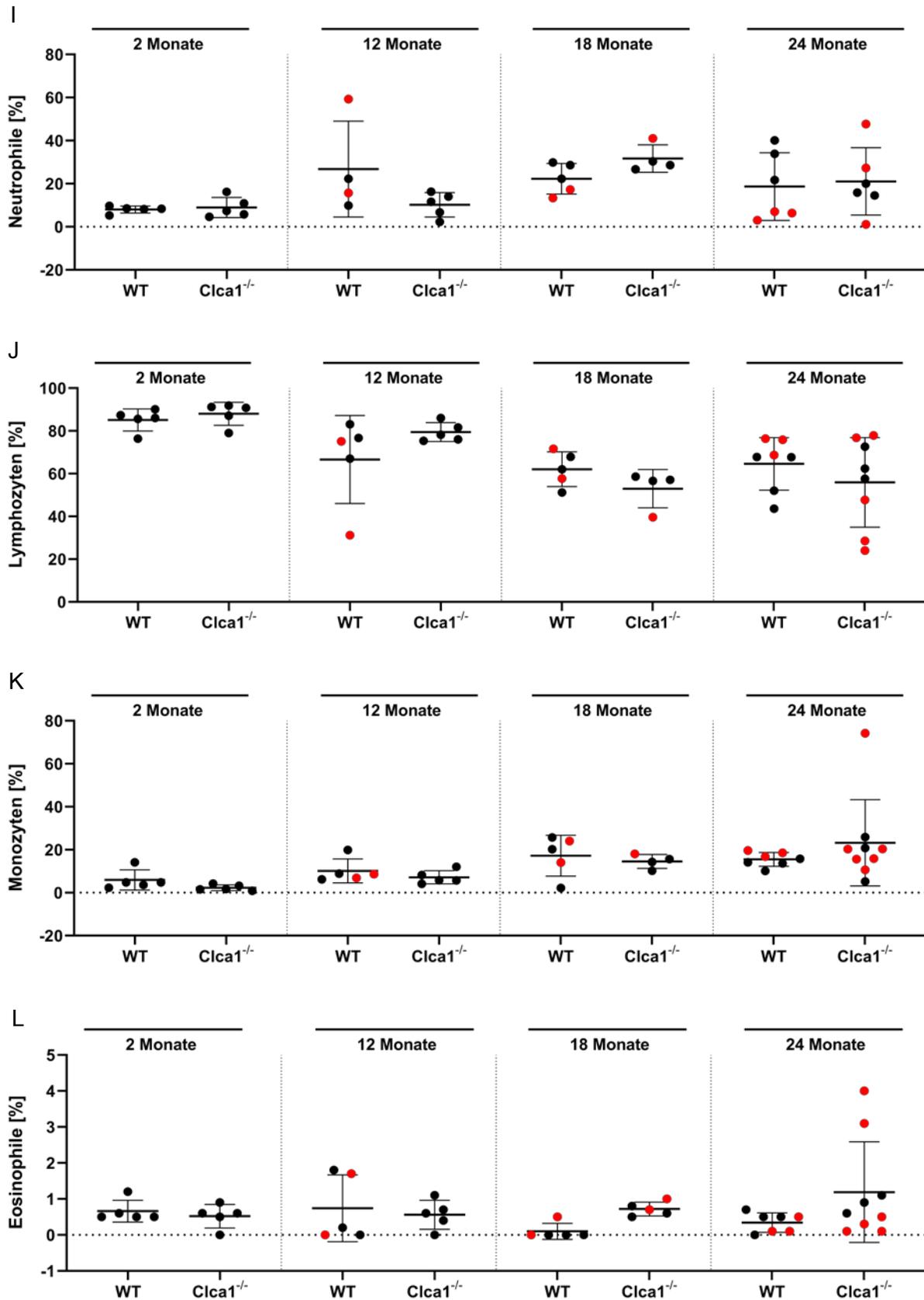
12.1.3 Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere



12.1.3 Fortgeführt: Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere



12.1.3 Fortgeführt: Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere



12.1.3 Fortgeführt: Graphische Darstellung der Hämatologie aller Tiere

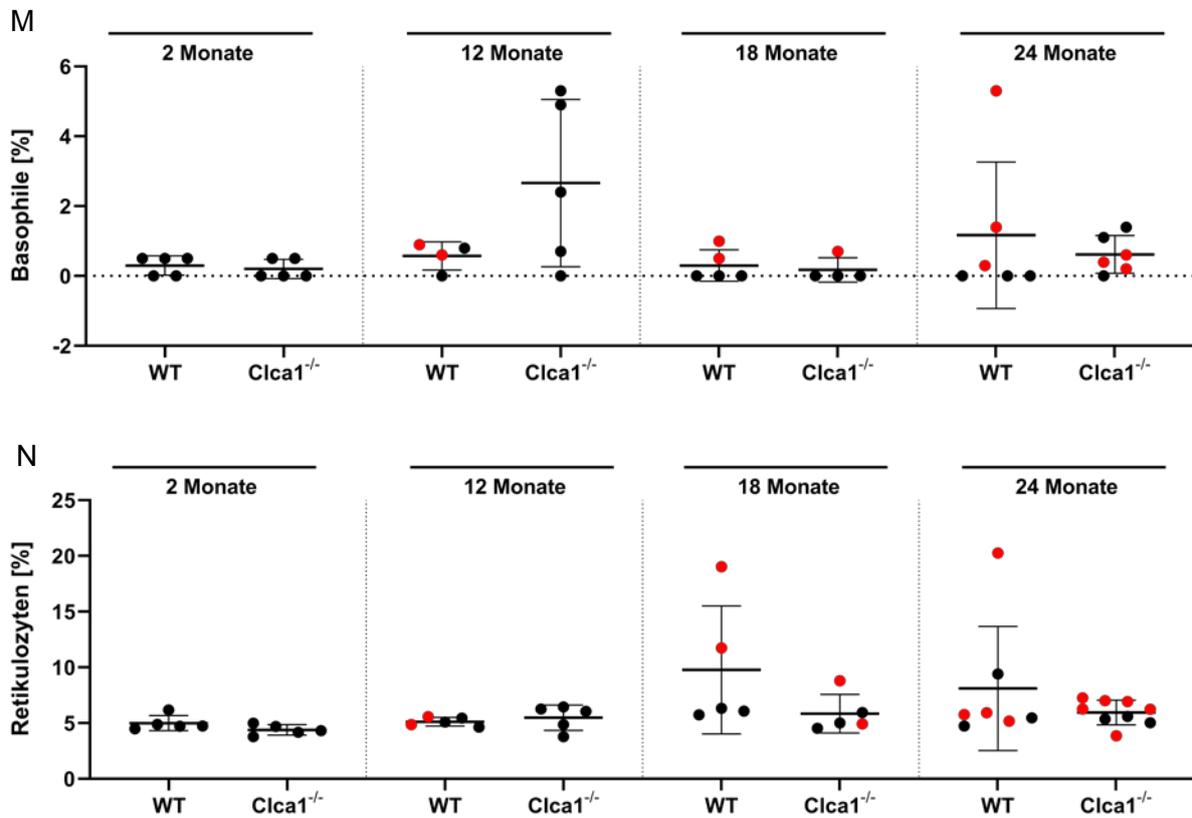


Abb. 39: Hämatologie aller untersuchten Tiere (A bis N)

Von allen untersuchten Tieren wurden die Erythrozyten (A), der Hämoglobingehalt (B), der Hämatokrit (C), das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV, D), der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH, E), die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC, F), die Thrombozyten (G), die Leukozyten (H), der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten (I), der Lymphozyten (J), der Monozyten (K), der eosinophilen Granulozyten (L), der basophilen Granulozyten (M) sowie der Retikulozyten (N) bestimmt. Scatter-Dot-Plot: Mittelwert (horizontale Balken) ± Standardabweichung (vertikale Balken), n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

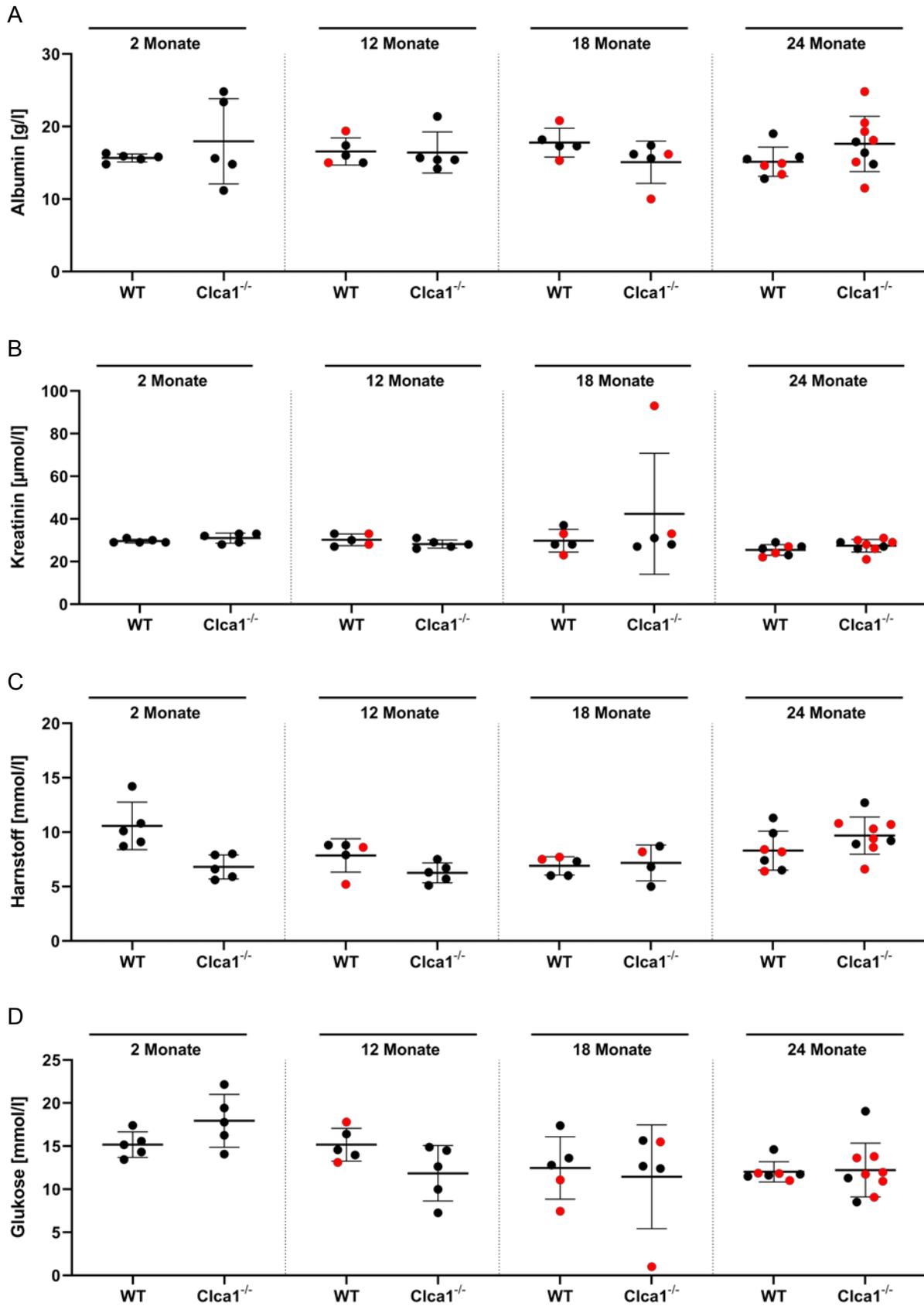
**12.1.4 Deskriptive Statistik der klinischen Chemie vom 2. bis zum 18. Lebensmonat einschließlich Referenzdaten**

*Tabelle 43: Klinische Chemie der „nicht-systemisch“ erkrankten Tiere einschließlich Referenzdaten*

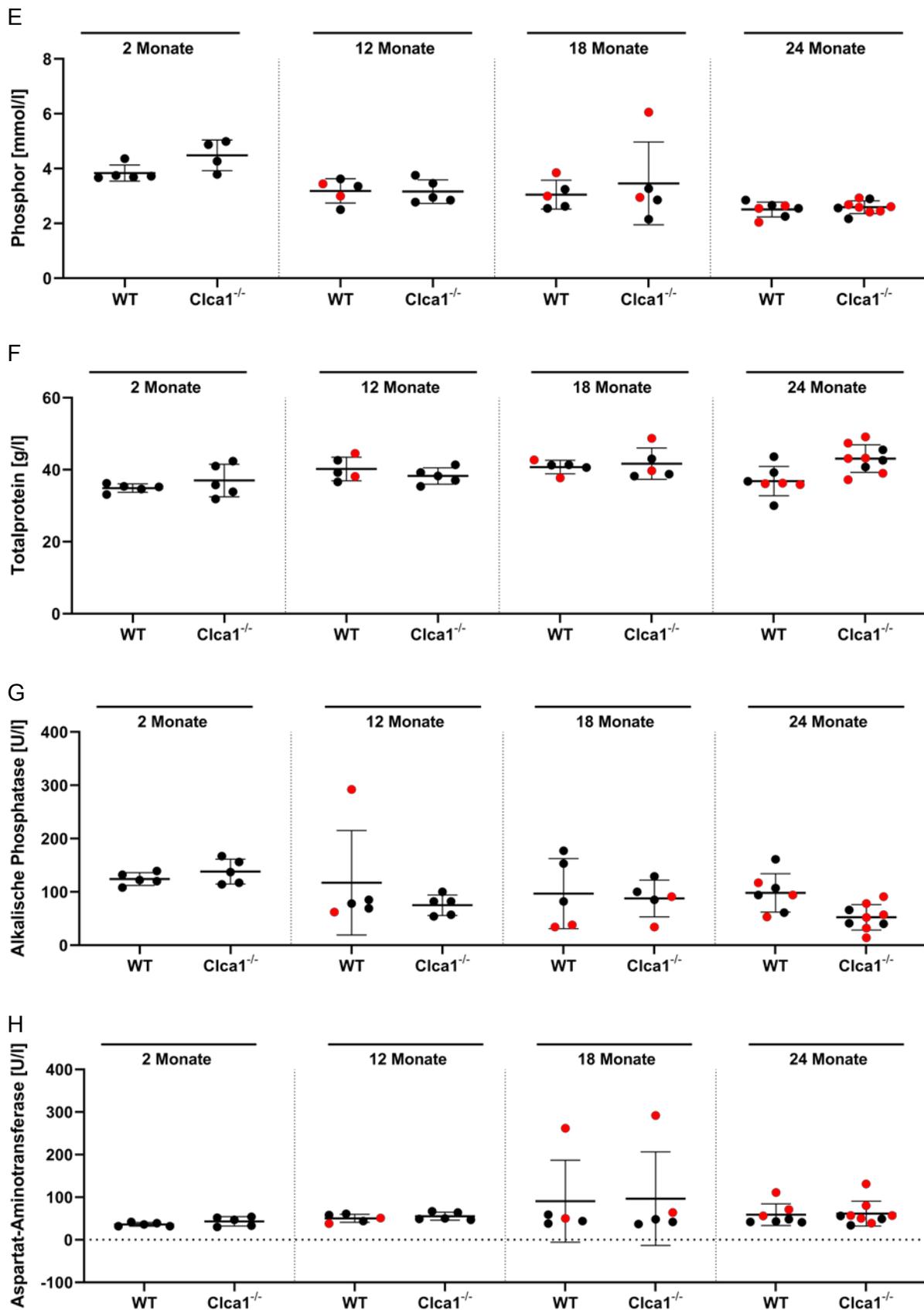
		2 Monate			12 Monate			18 Monate		
		Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®	Eigene Untersuchungen		JAX®
		WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J	WT	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6J
Parameter	Einheit	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	<i>MW</i>	
Albumin	g/l	15,66	17,96	39,00	16,13	16,42	29,00	17,60	16,40	28,00
Kreatinin	µmol/l	29,60	31,00	n.a.	30,00	28,20	n.a.	31,00	28,67	n.a.
Harnstoff	mmol/l	10,58	6,80	4,51	8,50	6,26	4,18	6,43	6,83	4,01
Glucose	mmol/l	15,18	17,94	9,77	14,98	11,85	13,43	14,61	13,58	13,04
Phosphor	mmol/l	3,84	4,48	1,72	3,16	3,16	0,38	2,80	2,76	1,10
Totalprotein	g/l	34,90	37,00	61,00	39,47	38,26	51,00	41,10	40,00	52,00
AP	U/l	124,20	138,20	n.a.	77,33	75,00	n.a.	137,33	104,67	n.a.
AST	U/l	36,20	43,20	n.a.	54,33	55,40	n.a.	47,00	42,33	n.a.
ALT	U/l	23,40	23,20	43,00	37,67	32,80	n.a.	40,33	31,67	n.a.
CK	U/l	114,50	155,60	720,00	758,33	520,00	n.a.	45,67	45,67	n.a.
GLDH	U/l	5,20	4,67	n.a.	5,33	5,20	n.a.	12,00	5,33	n.a.

*JAX® = Referenzwerte des Jackson Laboratory, Mouse Phenome Database, AP = alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, CK = Creatinkinase, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout; n.a. = nicht angegeben*

12.1.5 Graphische Darstellung der klinischen Chemie aller Tiere



12.1.5 Fortgeführt: Graphische Darstellung der klinischen Chemie aller Tiere



12.1.5 Fortgeführt: Graphische Darstellung der klinischen Chemie aller Tiere

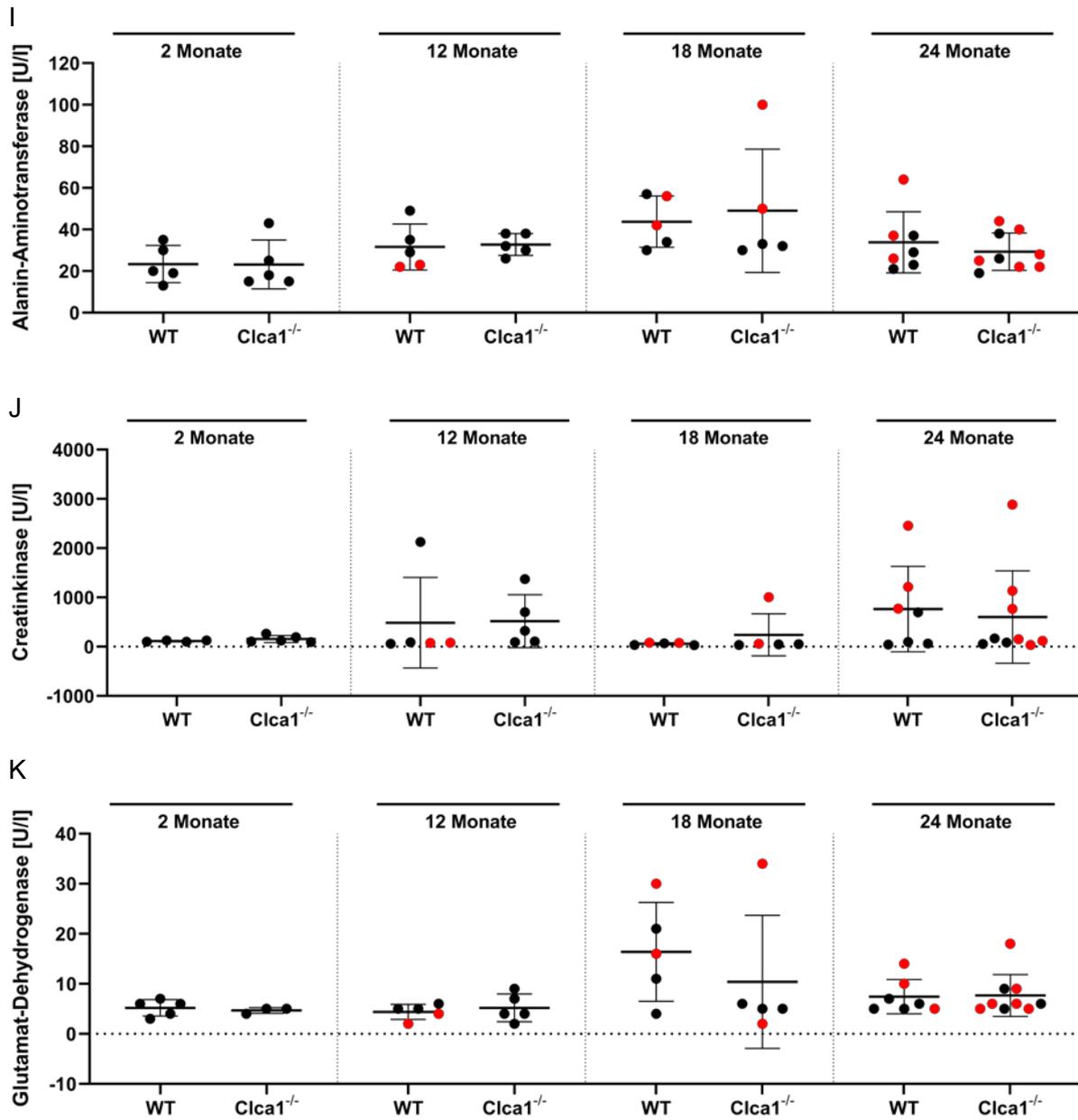


Abb. 40: Klinische Chemie aller untersuchten Tiere

Von allen untersuchten Tieren wurden das Albumin (A), das Kreatinin (B), der Harnstoff (C), die Glukose (D), der Phosphor (E), das Totalprotein (F), die Alkalische Phosphatase (G), die Aspartat-Aminotransferase (H), die Alanin-Aminotransferase (I), die Creatinkinase (J) sowie die Glutamat-Dehydrogenase (K) bestimmt. Scatter-Dot-Plot: Mittelwert (horizontale Balken) ± Standardabweichung (vertikale Balken), n = 5 - 9, schwarz = „nicht-systemisch“ erkrankt, rot = „systemisch“ erkrankt, WT = Wildtyp, Clca1<sup>-/-</sup> = Clca1-Knockout

**12.1.6 Zusammenfassung der pathologischen Befunde aller untersuchten Tiere**

*Tabelle 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere*

Organsystem	Pathologie	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 9)
		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)	
<b>Schilddrüse</b>	Kolloidzysten	-	-	-	-	-	3 (50)	3 (43)	1 (11)
<b>Nebenschilddrüse</b>	Adenom	-	-	-	-	1 (20)	1 (17)	-	-
<b>Trachea</b>	Hyalinose	-	-	4 (80)	4 (80)	3 (60)	3 (50)	7 (100)	7 (78)
<b>Pleura</b>	Pleuritis	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
<b>Lunge</b>	Pneumonie	-	-	-	-	1 (20)	-	1 (14)	1 (11)
	Bronchoalveoläres Adenom	-	-	-	-	-	-	1 (29)	-
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
<b>Thymus</b>	Lymphatische Atrophie	-	-	-	-	1 (20)	-	-	-
	Lymphatische Hyperplasie	-	-	-	-	-	-	3 (43)	1 (11)
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	1 (11)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
	Zyste	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
<b>Speicheldrüse</b>	Adenom	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere

Organsystem	Pathologie	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 9)
		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)	
<b>Lymphknoten</b> (Mandibularlnn./ Mesenteriallnn.)	Lymphadenitis	-	-	-	1 (20)	1 (20)	1 (17)	-	-
	Lymphom	-	-	1 (20)	-	1 (20)	1 (17)	-	2 (22)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	2 (34)	-	-
<b>Herz</b>	Myokarditis /Endokarditis	-	-	-	-	-	-	1 (14)	1 (11)
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	1 (11)
<b>Peritoneum</b>	Peritonitis	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
<b>Nieren</b>	Interstitielle Nephritis	-	-	2 (40)	-	1 (20)	1 (17)	3 (43)	4 (44)
	Membranöse Glomerulonephritis	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
	Hydronephrose	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
	Zyste	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
<b>Milz</b>	Lymphatische Atrophie	-	-	-	-	-	-	-	2 (22)
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	2 (22)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	2 (34)	-	-
<b>Leber</b>	Hepatitis	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (85)	7 (100)	9 (100)
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	1 (11)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere

Organsystem	Pathologie	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Ctca1<sup>-/-</sup></i> (n = 9)
		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)	
Pankreas	Pankreatitis	-	-	-	-	1 (20)	2 (34)	-	-
	Steatitis	-	-	-	-	-	2 (34)	-	-
	Lymphom	-	-	-	-	1 (20)	1 (17)	-	1 (11)
Dünndarm	Lymphom	-	-	-	-	-	-	1 (14)	2 (22)
	Adenom	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
Dickdarm	Lymphom	-	-	-	-	1 (20)	-	-	-
Nebenniere	Noduläre Hyperplasie	-	-	-	1 (20)	-	-	1 (14)	-
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
Harnblase	Urozystitis	-	-	1 (20)	-	-	-	-	-
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
Ovarien	Rete ovarii Zysten	-	-	-	1 (20)	-	-	2 (29)	2 (22)
	Follikelzysten	-	-	-	1 (20)	1 (20)	2 (34)	2 (29)	1 (11)
	Ovarielle Atrophie	-	-	-	-	1 (20)	3 (50)	3 (43)	4 (44)
	Lymphom	-	-	-	-	-	-	-	2 (22)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	2 (34)	-	-
	Granulosazelltumor	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
	Ovariitis	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere

Organsystem	Pathologie	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Ctca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 9)
		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)	
<b>Uterus</b>	Endometritis/Pyometra	-	1 (20)	-	-	-	1 (17)	-	1 (11)
	Hydrometra/Mukometra	2 (40)	1 (20)	-	1 (20)	-	-	-	-
	Papillom	-	-	-	1 (20)	-	-	-	-
	GEH	-	-	4 (80)	3 (60)	4 (80)	4 (68)	6 (86)	7 (77)
	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
<b>Vagina</b>	Adenitis	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
<b>Haut</b> (Nacken, Rücken)	Dermatitis	-	1 (20)	-	-	1 (20)	-	1 (14)	3 (33)
	Steatitis	-	1 (20)	-	-	-	-	-	-
	Myositis	-	1 (20)	-	-	-	-	1 (14)	1 (11)
	Folikulitis	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
	Adenitis	-	2 (40)	-	-	-	-	-	-
	Epidermale Einschlusszyste	-	-	-	1 (20)	-	-	-	-
<b>Milchdrüse</b>	Lymphom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
	Laktildilatation	-	-	-	-	-	-	-	2 (22)
	Mastitis	-	-	-	-	-	-	-	2 (22)
<b>Muskulatur</b>	Myositis	-	-	-	1 (20)	-	1 (17)	-	-

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 44: Pathologische Befunde aller untersuchten Tiere

Organsystem	Pathologie	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 9)
		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)		abs. (rel. in % je Gruppe)	
Wirbelsäule	Bandscheibendegeneration	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
Rückenmark	Myelitis	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
Knochenmark	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	1 (20)	1 (17)	-	-
Gelenke	Arthritis	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
	Arthrose	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
Gehirn	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	-	1 (17)	-	-
Hypophyse	Adenom	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
Zähne	Alveolitis	-	-	4 (80)	2 (40)	4 (80)	5 (85)	6 (86)	6 (67)
	Myositis	-	-	2 (40)	-	-	-	-	1 (11)
	Neuritis	-	-	-	-	-	-	-	1 (11)
	Ostitis	-	-	2 (40)	-	-	-	-	-
	Osteom	-	-	-	-	-	-	1 (14)	-
Augen	Retinale Atrophie	-	-	-	-	-	1 (17)	-	2 (22)
Tumorerkrankung	Lymphom	-	-	1 (20)	-	1 (20)	1 (17)	1 (14)	2 (22)
	Adenom	-	-	-	-	1 (20)	1 (17)	3 (43)	1 (11)
	Histiozytäres Sarkom	-	-	-	-	1 (20)	2 (34)	-	-
	Sonstige	-	-	-	1 (20)	-	-	1 (14)	1 (11)

WT = Wildtyp, *Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, Lnn. = Lymphknoten, GEH = glandulärzystische, endometriale Hyperplasie

**12.1.7 Zusammenfassung der Schweregrade ausgewählter pathologischer Veränderungen**

*Tabelle 45: Schweregrade ausgewählter Pathologien*

Pathologie	Schweregrad	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Clca1<sup>-/-</sup></i> (n = 9)
Hyalinose	minimal	-	-	1	1	2	1	1	2
	geringgradig	-	-	-	-	1	2	3	2
	mittelgradig	-	-	3	3	-	-	3	3
	hochgradig	-	-	-	-	-	-	-	-
Nephritis	minimal	-	-	-	-	-	-	-	-
	geringgradig	-	-	2	-	-	-	1	4
	mittelgradig	-	-	-	-	1	1	2	-
	hochgradig	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatitis	minimal	2	4	2	2	3	-	1	-
	geringgradig	2	1	3	2	1	3	2	3
	mittelgradig	-	-	-	1	1	1	2	5
	hochgradig	-	-	-	-	-	-	2	1
GEH	minimal	-	-	-	-	-	1	-	-
	geringgradig	-	-	2	1	1	1	2	1
	mittelgradig	-	-	2	2	1	-	2	3
	hochgradig	-	-	-	-	2	2	3	3

ANHANG

Fortsetzung Tabelle 45: Schweregrade ausgewählter Pathologien

Pathologie	Schweregrad	2 Monate		12 Monate		18 Monate		24 Monate	
		WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 5)	WT (n = 5)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 6)	WT (n = 7)	<i>Clca1</i> <sup>-/-</sup> (n = 9)
Alveolitis	minimal	-	-	-	-	-	-	-	-
	geringgradig	-	-	-	-	-	-	-	2
	mittelgradig	-	-	1	-	2	2	1	-
	hochgradig	-	-	3	2	2	2	5	4
	einseitig	-	-	2	-	1	2	4	3
	beidseitig	-	-	1	2	3	2	2	3
	mit Zahnverlust	-	-	1	-	1	1	4	2

#1WT = Wildtyp, #2*Clca1*<sup>-/-</sup> = *Clca1*-Knockout, #3GEH = glandulärzystische, endometriale Hyperplasie

## Danksagungen

---

Die hier vorliegende Arbeit entstand am Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Mein ganz besonderer Dank gilt zum wiederholten Male **Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.**, geschäftsführender Direktor des Instituts für Tierpathologie, für seine unermüdliche Unterstützung und sein offenes Ohr zu jedem Zeitpunkt. Ich danke ihm für sein grenzenloses Vertrauen und die vielen Freiräume und Zugeständnisse, die es mir ermöglichten, mich wissenschaftlich und persönlich zu entfalten.

Ebenso möchte ich **Frau Nancy A. Erickson, Ph.D.**, für ihre Unterstützung und wertvollen Diskussionen danken. **Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch** und **Frau Nadine Schunter** danke ich für ihre Menschlichkeit und für das Schmunzeln, das sie mir so häufig in mein Gesicht zauberten.

Bei **Frau Alexandra Harder** und **Frau Angelika Linke** möchte ich mich herzlich für die übertragende technische Unterstützung sowie die aufmunternden Gespräche bedanken.

**Dem gesamten Pathologie-Team**, insbesondere **Frau Sylke Giese, Frau Ines Krause** und natürlich auch allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern danke ich herzlich für ein tolles Arbeitsklima, die Unterstützung, wann immer ich sie brauchte, und die vielen offenen Ohren in allen Lebenslagen.

**Frau Silvia Kühnel** möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie nach wie vor seit so vielen Jahren mein unerschütterlicher Fels in der Brandung ist und jederzeit ein offenes Ohr für mich hat.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem **Mann Raik** und meiner **Tochter Lisa**, die nun schon zum zweiten Mal durch ihre großartige und unermüdliche Unterstützung eine solche Arbeit erst ermöglicht haben. Durch euch bin ich ein Mensch, der sowohl stolz in seine Vergangenheit als auch in eine tolle Zukunft blicken kann. Ihr seid für mich das Allerwichtigste auf der Welt!

Zu guter Letzt danke ich **meinen Eltern** für ihre immerwährende und langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

## **Selbstständigkeitserklärung**

---

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 21.01.2020

Kristina Dietert, Ph.D.











9 783967 290363

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-036-3