

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

**Stadien- und gewebespezifische pränatale Expression
des porzinen *cystic fibrosis transmembrane conductance
regulator* in Trachea, Lunge und Dickdarm
– Hinweise auf seine Rolle in der Organogenese?**

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

vorgelegt von
Stefanie Binder
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4222

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

**Stadien- und gewebespezifische pränatale Expression des porcinen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* in Trachea, Lunge und Dickdarm
– Hinweise auf seine Rolle in der Organogenese?**

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

vorgelegt von
Stefanie Binder
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4222

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pigs, animal models, embryology, colon, trachea, lungs, cystic fibrosis
transmembrane conductance regulator (MeSH), reverse transcriptase pcr

Tag der Promotion: 18.02.2021

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: 978-3-96729-105-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

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 2021

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

„Between animal and human medicine, there is no dividing line –
nor should there be.” (R. Virchow, 1856)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANO1	Anoctamin1 (früher <i>transmembrane member 16A</i> , TMEM16A)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser, lat. <i>aqua destillata</i>
ASO	Antisense Oligonukleotide
ATP	Adenosin triphosphat
β2M	Beta-2-Mikroglobulin, engl. <i>Beta (β)-2-microglobulin</i>
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
bp	Basen paar
CaCC	Kalziumabhängige Chloridkanäle, engl. <i>calcium-activated chloride channel</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat, engl. <i>cyclic adenosinemonophosphate</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CF	Zystische Fibrose (auch Mukoviszidose), engl. <i>cystic fibrosis</i>
CFTR	Engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFTR ^{-/-}	CFTR- knockout-Tier
CLCA	Engl. <i>chloride channel regulator, calcium-activated</i> (früher engl. <i>chloride channel, calcium-activated</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CT	Computertomografie
Ct	Engl. <i>cycle threshold</i>
DAB	Diaminobenzidine
DEPC-Wasser	Diethylpyrokarbonat behandeltes, Nulease-freies Wasser, engl. <i>diethylpyrocarbonat</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
ENaC	Epithelialer Natriumkanal (Protein), engl. <i>epithelial sodium (Na) channel</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exon	Protein-kodierender Abschnitt eines Gens, engl. <i>expressed region</i>
GNS	Ziegen Normalserum, engl. <i>goat normal serum</i>
GOI	Nachzuweisendes Gen, engl. <i>gene of interest</i>
GT	Gestationstag
HK	Referenzgen, engl. <i>housekeeping gene</i>
Intron	Nicht-kodierende Genabschnitte zwischen zwei Exonen, engl. <i>in-tragenic region</i>
IRC	<i>Interrun</i> -Kalibrierung, engl. <i>interrun calibration</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl. <i>messenger-ribonucleic acid</i>
MZR	Mukoziliare Reinigung
ncRNA	Nichtkodierende-Ribonukleinsäure, engl. <i>non-coding-ribonucleic acid</i>

NHE3	Natriumionen- und Wasserstoffionenaustauscher 3, engl. <i>sodium (Na)-hydrogen exchanger 3</i>
NTC	Negativkontrolle, engl. <i>non-template control</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
<i>pCFTR</i>	P orzines CFTR -Gen
p.Phe508del	Deletion von Phenylalanin an der Stelle 508 des CFTR-Proteins (früher $\Delta F508del$)
PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
RFU	relative Leuchtstärke, engl. <i>relative fluorescence unit</i>
RIN	RNA Integritätsnummer, engl. <i>ribonucleic acid integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Polymerase Kettenreaktion, engl. <i>reverse transkriptase quantitative-polymerase chain reaction</i>
SCNN	Epithelialer Natriumkanal (Gen), engl. <i>sodium channel epithelial (non voltage gated)</i>
<i>SDHD</i>	SDHD-Gen, engl. <i>succinate dehydrogenase complex subunit d</i>
SSL	S cheitelstei β länge
SMD	S ubmukosale D rüse
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

totalRNA	Gesamtheit der RNA einer Zelle, engl. <i>total ribonucleic acid</i>
Wnt/ β -Canetin	Signaltransduktionsweg in der Differenzierung von tierischen Zellen, engl. <i>wingless-type Integration site family member 1/ beta-canetin</i>
WT	Wildtyp
YWHAZ	YWHAZ-Gen, engl. <i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta – polypeptide</i>

1 Einleitung

Die Zystische Fibrose (engl. *Cystic Fibrosis*, CF, oder auch Mukoviszidose) ist die häufigste tödliche, vererbte Erkrankung bei weißen, europäischstämmigen Menschen. Ursache der CF sind Mutationen in einem Gen, welches für den epithelialen Chloridkanal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) kodiert. Dieses Membranprotein wird in verschiedenen Organen, wie z. B. in der Lunge und im Darm, exprimiert. Durch verschiedene Mutationen in dem CFTR-Gen treten Störungen im Ionentransport und dadurch Exokrinopathien in diesen Organen auf. Diese Störungen können zum einen auf den direkten Einfluss des veränderten Chloridkanals CFTR selbst zurückgeführt werden. Zum anderen scheint der bisher unvollständig verstandene Einfluss von CFTR auf andere Ionentransportwege wie den epithelialen Natriumkanal (ENaC, engl. *Epithelial sodium (Na) channel*) eine Rolle zu spielen.

Der gestörte Ionentransport bei CF-PatientInnen führt zu einer Eindickung von Sekreten und zu diversen klinischen Krankheitsbildern. Dabei führen die Lungenveränderungen bei Jugendlichen und Erwachsenen zu den schwerwiegendsten Symptomen. Sie sind bei 95 % der CF-PatientInnen die Todesursache. Bei Neugeborenen ist die Lunge zunächst klinisch unauffällig. Der sich mit der Zeit in den Luftwegen akkumulierende zähe Mukus prädisponiert jedoch für bakterielle Lungenentzündungen, die im Laufe des Lebens der CF-PatientInnen immer wieder auftreten. Dabei kommt es im weiteren Verlauf zu progressiven Umbauprozessen der Lunge, wie Fibrosen, die schließlich zum Tod der PatientInnen führen. Die durchschnittliche Lebensdauer konnte zwar in den letzten Jahrzehnten durch bessere Behandlungsmethoden erhöht werden, liegt aber trotz allem nur bei ca. 50 Jahren – eine Heilung der CF ist bis heute nicht möglich.

Neben den klinischen Symptomen in der Lunge, von denen überwiegend Jugendliche und Erwachsene betroffen sind, gibt es jedoch auch Veränderungen, die bereits bei Feten und Neugeborenen zu finden sind. Zu diesen gehören sowohl klinisch apparente Veränderungen wie ein Mekoniumileus, als auch strukturelle Veränderungen innerhalb der Atemwege, die zunächst nicht mit klinischen Symptomen verbunden sind. Ein Beispiel hierfür ist ein verringerter Durchmesser der Trachea bei CF-Neugeborenen im Vergleich zu gesunden Neugeborenen. Die Rolle dieser strukturellen Veränderungen in der Pathogenese der CF ist bisher nicht abschließend geklärt. Sowohl die klinisch relevanten als auch die rein strukturellen Veränderungen bei Neugeborenen scheinen ihren Ursprung in der fetalen Entwicklung der Organe zu haben. Frühere Untersuchungen zeigten außerdem, dass CFTR während einer bestimmten Phase der fetalen humanen Lungenentwicklung verstärkt exprimiert zu sein scheint. Es wur-

de daher postuliert, dass CFTR eine Rolle bei der Ausreifung der Lunge spielt. Diese Rolle und der Einfluss eines funktionslosen CFTR-Proteins während der fetalen Entwicklung auf die spätere CF-Erkrankung wurden jedoch bisher kaum untersucht.

Als vielversprechendes Tiermodell für CF hat sich in den letzten Jahren das Schwein bewährt. Dieses weist bei neugeborenen *CFTR-knockout* ($CFTR^{-/-}$)-Ferkeln große Ähnlichkeiten zu den Veränderungen auf die bei neugeborenen Menschen mit CF gefunden werden.

Um die stadien- und gewebeabhängige Expression von CFTR systematisch zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie das Expressionsmuster von *porzinem CFTR* ($pCFTR$) in Feten von Wildtyp-Schweinen zu unterschiedlichen Gestationstagen sowie neugeborenen und adulten Schweinen im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm untersucht und mit den vorliegenden Daten beim Menschen verglichen.

2 Literaturübersicht

2.1 Zystische Fibrose (CF)

Zystische Fibrose (CF, engl. *Cystic fibrosis*), auch Mukoviszidose genannt, ist eine multisystemische Erkrankung, die bei einer von 2000 bis 3000 Lebendgeburten vorkommt, wobei derzeit etwa 8000 an CF erkrankte PatientInnen in Deutschland leben (World Health Organization 2020). Die klinischen Symptome gehen vor allem auf verschiedene Exokrinopathien zurück, die zur Eindickung von Sekreten in exokrinen Geweben im gesamten Körper führen (Barrett, Alagely et al. 2012). Zu den betroffenen Organen gehören vor allem Lunge, Darm, Pankreas, Leber und die Geschlechtsorgane. Die ersten CF-Symptome in einzelnen Organen treten teilweise bereits bei Neugeborenen (bis 28 Tage alt) und Säuglingen (ein Monat alt bis Vollendung des ersten Lebensjahres) auf. Die typischen Veränderungen der CF entwickeln sich in der Altersgruppe der Jugendlichen (13–18 Jahre alt) und Erwachsenen (älter als 19 Jahre). Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl und Schwere der klinischen Symptome zu.

Insbesondere die Lungenveränderungen bei Jugendlichen und Erwachsenen führen zu den schwerwiegendsten Symptomen. Sie stellen bei den meisten CF-PatientInnen die Todesursache dar (Welsh, Ramsey et al. 2001). Trotz verbesserter Behandlungsmethoden, durch die die Lebensqualität von CF-Patienten deutlich verbessert werden konnte, liegt die durchschnittliche Lebenserwartung immer noch bei nur ca. 50 Jahren (Lopes-Pacheco 2019).

2.1.1 Pathologische Veränderungen bei Jugendlichen und Erwachsenen mit CF

Im unteren Respirationstrakt, bestehend aus Trachea und Lunge, treten bei CF verschiedene pathologische Veränderungen auf. So liegt bei 69 % der erwachsenen CF-PatientInnen eine Tracheomalazie vor, die teilweise als Folge von chronischen Entzündungen im Respirationstrakt auftreten (Fischer, Singh et al. 2014). Weil bei diesen PatientInnen die Trachea bei der Atmung immer wieder kollabiert, tragen solche Veränderungen zu einer deutlich verringerten Lungenfunktion mit einem reduzierten Ausatemvolumen bei (McDermott, Barry et al. 2009).

In der Lunge führt die zähe Viskosität des Mukus bei CF dazu, dass Mukus in den luftführenden Wegen akkumuliert. Durch diese vermehrten Mukusansammlungen treten klinische Symptome wie Husten, der sowohl produktiv als auch mit Blut versetzt sein kann, und eine keuchende Atmung bis hin zu Atemnot auf. Diese Symptome werden i. d. R. von allgemei-

nem Unwohlsein und teilweise Fieber begleitet (Geddes und Shiner 1989). Zusätzlich prädisponieren die Mukusansammlungen für bakterielle Lungenentzündungen. Typische Pneumonieerreger, die bei CF nachgewiesen werden, sind *Staphylococcus aureus*, *Pneumokokken* und *Pseudomonas aeruginosa*, für die der zähe Mukus einen idealen Nährboden darstellt. Neben den auch histologisch sichtbaren Obstruktionen durch Mukus finden sich in den luftführenden Wegen neutrophile Entzündungsreaktionen, Metaplasien von Becherzellen und Hypertrophien der submukosalen Drüsen (SMD) (Zuelzer und Newton 1949; Bedrossian, Greenberg et al. 1976). Durch die immer wiederkehrenden Entzündungen kommt es zu progressiven Fibrosierungen, die die Lungenfunktion immer weiter einschränken und schließlich zum Lungenversagen führen (Oppenheimer und Esterly 1975; Barrett, Alagely et al. 2012).

Neben den typischen Lungenveränderungen treten bei allen jugendlichen und erwachsenen CF-PatientInnen Veränderungen im Darm in verschiedenen Schweregraden auf (De Lisle und Borowitz 2013). Diese führen unbehandelt zu teils starken Gewichtsverlusten und bei Jugendlichen außerdem zu Wachstumsstörungen. Bei 25 % der erwachsenen CF-PatientInnen treten dabei Obstruktionen auf, die unter dem Begriff des *distal intestinal obstruction syndrome* zusammengefasst werden (Zielenski, Corey et al. 1999). Diese Obstruktionen treten bei CF gehäuft im terminalen Ileum und im Dickdarm auf. Unbehandelt können sie zu einer Ruptur des Darmabschnittes und einer letalen Sepsis führen. Als Ursache dieser Obstruktionen wird ein multifaktorielles Geschehen mit Maldigestion, zähem Mukus sowie gesteigerter Resorption von Wasser und Elektrolyten vermutet (Park und Grand 1981). Neben der Obstruktionen liegen auch häufig Malabsorptionen vor, die häufig im Zusammenhang mit Pankreas- und Leberveränderungen bei CF auftreten (Lopes-Pacheco 2016).

Im Pankreas verursachen die eingedickten Pankreassekrete Obstruktionen der Ausführungsgänge. Dies führt zu wiederkehrenden Entzündungen und schließlich zu Fibrosierungen innerhalb des Organs mit konsekutiver exokriner und teils endokriner Pankreasinsuffizienz. Die aus der exokrinen Pankreasinsuffizienz folgende Reduktion der Abpufferung der Magensäure und Reduktion der Verdauungsenzyme ist einer der wichtigsten Faktoren für das Entstehen der Darmpathologien bei CF (Cipolli, Castellani et al. 2007). Die Reduktion der Pankreasenzyme im Dünndarm verschlechtert außerdem die Verdaulichkeit von Proteinen und Fetten und kann so zu Steatorrhoe und Malabsorptionen führen (Salvatore, Scudiero et al. 2002; Barrett, Alagely et al. 2012). Eine solche exokrine Pankreasinsuffizienz liegt bei 85–90 % der erwachsenen CF-PatientInnen vor (Salvatore, Scudiero et al. 2002).

Lebererkrankungen treten bei ca. 5–15 % der CF-PatientInnen auf (De Lisle und Borowitz 2013). Die auftretenden Obstruktionen der kleinen Gallengänge in der Leber führen zu periportal Fibrosen und lokalen zirrhotischen Knoten. Mit fortschreitenden Obstruktionen und

Fibrosen breiten sich auch die zirrhotischen Veränderungen in der Leber aus und führen zu portalen Hypertonien und schließlich zum Leberversagen (Colombo 2007). Als Folge der reduzierten Gallensäurekonzentration im Darm kommt es zusätzlich zu einer Malabsorption von Fett und Vitaminen (De Lisle und Borowitz 2013).

Auch die Geschlechtsorgane sind von der CF betroffen. So sind die männlichen CF-Patienten i. d. R. aufgrund einer Azoospermie infertil. Die Fertilität der CF-Patientinnen ist durch die Eindickung der Uterussekrete deutlich eingeschränkt (Jarzabek, Zbucka et al. 2004; Barrett, Alagely et al. 2012).

Dadurch, dass durch moderne Therapieerfolge das Lebensalter von CF-PatientInnen immer weiter steigt, werden in den letzten Jahren neben den oben genannten, klassischen Krankheitskomplexen und klinischen Veränderungen weitere Veränderungen im Zusammenhang mit CF beobachtet. Hierzu gehören ein Diabetes Mellitus aufgrund der chronischen Pankreasentzündungen, Osteoporose, Nephrolithiasis und ein erhöhtes Risiko für Tumore des Magendarmtrakts (Lopes-Pacheco 2016).

2.1.2 Pathologische Veränderungen bei Neugeborenen und Säuglingen mit CF

Neben den typischen klinischen Veränderungen bei jugendlichen und erwachsenen CF-PatientInnen finden sich bereits klinische Veränderungen bei Neugeborenen und Säuglingen mit CF. Eines der ersten klinischen Symptome, das bei neugeborenen CF-PatientInnen festgestellt werden kann, ist ein deutlich erhöhter Salzgehalt des Schweißes. Dieser ist ebenfalls auf einen veränderten Ionentransport, in diesem Fall in den Epithelzellen der Schweißdrüsen der Haut, zurückzuführen und stellt auch heute noch ein wichtiges Nachweiskriterium für CF dar (Di Sant'Agnese, Darling et al. 1953; Lopes-Pacheco 2019).

Schon bei vier Wochen alten Säuglingen mit CF treten im unteren Respirationstrakt Tracheomalazien auf, die auch bei Erwachsenen CF-PatientInnen zu finden sind. Diese Säuglinge weisen allerdings keine klinischen Anzeichen einer Lungenentzündung auf, jedoch leiden sie oft unter apnoischen Episoden (Fischer, Singh et al. 2014). Zusätzlich scheint die Tracheomalazie bei der CF für eine Infektion mit CF-typischen Pneumonie-Erregern wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zu prädisponieren. CF-PatientInnen im Säuglings- und Kleinkindalter mit einer Tracheomalazie waren zum Zeitpunkt des ersten Auftretens einer solchen Pneumonie häufig halb so alt wie CF-PatientInnen ohne Tracheomalazie. Das früheste Alter von CF-Säuglingen, bei denen dieser Erreger in der Bronchoalveolären Lavage nachgewiesen werden konnte, lag bei zwei bis acht Monaten (Fischer, Singh et al. 2014).

Die Lunge von neugeborenen CF-PatientInnen weist direkt nach der Geburt noch keine pathologischen Veränderungen auf, jedoch fällt klinisch ein häufiger Hustendrang auf (Lopes-Pacheco 2016). Auch die Lungenfunktion selbst ist teilweise bereits bei Neugeborenen eingeschränkt. So fand sich in verschiedenen Studien bei Neugeborenen und Säuglingen mit CF, die zuvor klinisch unauffällig waren, ein reduziertes forciertes Ausatemvolumen (Ranganathan, Bush et al. 2002; Martinez, Llapur et al. 2005). Martinez und KollegInnen (2005) konnten eine Korrelation der Einschränkungen der Lungenfunktion mit strukturellen Veränderungen der luftführenden Wege innerhalb der Lunge nachweisen. Mittels hochauflösender Computertomografie (CT) wurde bereits bei drei Monate alten CF-Säuglingen eine Wandverdickung der luftführenden Wege bei gleichzeitiger Reduktion des Lumens dieser Luftwege im Vergleich zu gesunden Neugeborenen nachgewiesen. Die AutorInnen vermuten als Ursache der Wandverdickung der Luftwege strukturelle Veränderungen oder Mukusansammlungen. Eine Unterscheidung ist hier mittels CT nicht möglich (Martinez, Llapur et al. 2005). Der eingedickte Mukus verlegt in der Lunge immer wieder kleinere Luftwege, wodurch Lufteinschlüsse in den Alveolen in angrenzenden Lungenabschnitten entstehen, die mittels CT nachgewiesen werden können. Solche Lufteinschlüsse breiten sich mit fortschreitender Erkrankung über die gesamte Lunge aus (Oppenheimer und Esterly 1975; Bedrossian, Greenberg et al. 1976; Martinez, Llapur et al. 2005; Tiddens, Donaldson et al. 2010). Auch wenn sich noch keine klinisch manifesten Lungenentzündungen bei wenige Wochen alten CF-Säuglingen nachweisen lassen und eine Mukusansammlung erst im Laufe des weiteren Lebens auftritt, finden sich doch erste Hinweise auf entzündliche Reaktionen. Beispielsweise konnten bereits bei vier Wochen alten CF-Säuglingen neutrophile Granulozyten und erhöhte Interleukin-8-Werte als frühe Anzeichen einer Entzündung in der Lunge nachgewiesen werden (Sly, Brennan et al. 2009; Fischer, Singh et al. 2014).

Auch im Darm finden sich bereits zum Zeitpunkt der Geburt klinische Veränderungen. Bei bis zu 20 % der Neugeborenen mit CF tritt ein Mekoniumileus auf, der teilweise auch schon bei spätabortierten Feten vorliegt (van der Doef, Kokke et al. 2011; Borowitz und Gelfond 2013; Sathe und Houwen 2017). Diese partielle Obstruktion mit fast vollständiger Undurchlässigkeit des Darmes und fetaler Anschoppung von Mekonium ist nahezu pathognomonisch für CF (Barrett, Alagely et al. 2012). Eine Analyse des Mekoniums von Neugeborenen mit CF zeigte, dass dieses im Vergleich zu Mekonium von gesunden Neugeborenen weniger Wasser enthält und damit zäher ist (Grubb und Boucher 1999).

2.1.3 Strukturelle Veränderungen des unteren Respirationstrakts bei Feten, Neugeborenen und Säuglingen mit CF

Obwohl der untere Respirationstrakt bei CF-PatientInnen bei Geburt i. d. R. klinisch unauffällig ist, können hier häufig zu diesem Zeitpunkt schon strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden.

Meyerholz und KollegInnen (2010) wiesen solche strukturellen Veränderungen in der Trachea bei CF-PatientInnen nach, deren Alter von Feten in der 38. Schwangerschaftswoche (SSW) bis zu 7 Tage postpartum reichte. Bei diesen wies die Trachea im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Feten bzw. Neugeborenen einen geringeren Durchmesser auf (Meyerholz, Stoltz et al. 2010). Auf zellulärer Ebene konnten an den Epithelzellen der Trachea von CF-Feten veränderte oder fehlende Zilien, veränderte *tight junction*-Verbindungen zwischen den Epithelzellen sowie ein veränderter Golgiapparat und veränderte Mitochondrien nachgewiesen werden (Gosden und Gosden 1984; Ornoy, Arnon et al. 1987). Dabei traten die fehlenden Zilien der trachealen Epithelzellen bereits bei CF-Feten im zweiten Trimenon zusammen mit einer Atrophie oder Metaplasie des Tracheaepithels auf (Ornoy, Arnon et al. 1987).

In der Lunge selbst konnten bereits bei 18 Tage alten Neugeborenen verschiedene strukturelle Veränderungen gefunden werden, die ohne klinische Symptome auftraten. Hierzu gehörten Dilatationen von Bronchien, eine Verdickung der Bronchienwand und emphysematöse Einschlüsse, die mittels CT nachgewiesen wurden (Sly, Brennan et al. 2009). Bei diesen CF-Neugeborenen konnten trotz fehlenden klinischen Symptomen erste Entzündungsanzeichen, wie neutrophile Granulozyten und teilweise Pneumonieerreger wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden (Sly, Brennan et al. 2009).

Inwiefern diese strukturellen Veränderungen des Respirationstrakts bei der CF später auch zu klinisch manifesten Veränderungen führen, ist nicht abschließend geklärt. Auch die Ursache dieser strukturellen Veränderungen ist bisher nicht bekannt. Da es sich um einen angeborenen Phänotyp handelt, wird ein Zusammenhang mit einem schon pränatal bestehenden Funktionsverlust des CFTR-Kanals vermutet (Hudak, Killeen et al. 2009; Meyerholz, Stoltz et al. 2010).

2.2 Der Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR

2.2.1 Funktion von CFTR als Ionenkanal

Allen klinischen Veränderungen bei der CF liegt ein gestörter Chloridionentransport zugrunde. Dieser Ionentransport wird bei gesunden Menschen durch den *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Kanal übernommen. Dieser Kanal wird durch das gleichnamige *CFTR*-Gen kodiert, besteht aus 1480 Aminosäuren und ist vor allem in der apikalen Zellmembran von Epithelzellen lokalisiert (Barrett, Alagely et al. 2012). Die Aktivität des Ionentransports im CFTR-Kanal wird u. a. durch zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic adenosinemonophosphate*, cAMP), Proteinkinase A und Adenosintriphosphat (ATP) kontrolliert (Anderson, Gregory et al. 1991; Winter und Welsh 1997; Stoltz, Meyerholz et al. 2015).

Durch den CFTR-Kanal werden in den meisten exokrinen Geweben, wie Lunge, Darm, Pankreas und Leber, Chloridionen aus den Epithelzellen in das Lumen der Organe transportiert. In den Epithelzellen der Schweißdrüsen hingegen vermittelt derselbe Kanal eine Reabsorption von Chloridionen aus dem Lumen in das Zellinnere. Zusätzlich zu dem Chloridionentransport werden über den CFTR-Kanal auch Bikarbonationen transportiert (Borowitz 2015).

2.2.2 Einfluss von CFTR auf andere Ionenkanäle

Die wohl bis heute am besten untersuchte, jedoch noch nicht vollständig verstandene Interaktion von CFTR mit anderen Ionenkanälen ist dessen Interaktion mit dem epithelialen Natriumkanal (engl. *Epithelial sodium (Na) channel*, ENaC). Dieser ist ebenfalls zumeist in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen lokalisiert und transportiert Natriumionen aus dem Lumen in das Zellinnere. Der ENaC-Kanal besteht aus einem heteromultimerischen Protein, das durch die vier verschiedenen Untereinheiten alpha (α), beta (β), gamma (γ) und delta (δ) gebildet wird. Die Untereinheit ENaC-1 α wird durch das Gen *Sodium channel epithelial non voltage gated 1 alpha (SCNN1A)*, die Untereinheit ENaC-1 β durch das Gen *SCNN1B*, die Untereinheit ENaC-1 γ durch das Gen *SCNN1G* und die Untereinheit ENaC-1 δ durch das Gen *SCNN1D* kodiert (Hanukoglu und Hanukoglu 2016; HUGO 2020). In allen bisher untersuchten Säugetieren sind jeweils diese vier Untereinheiten gefunden worden, mit Ausnahme der Maus, in der die Untereinheit *Scnn1d* bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Hanukoglu und Hanukoglu 2016). Über die Funktion der einzelnen Untereinheiten ist bekannt, dass die ENaC-1 α -Untereinheit nötig ist, um die Natriumkanalaktivität zu erhalten. Die höchste Aktivität des Natriumkanals wird jedoch nur erreicht, wenn die drei Untereinheiten alpha, beta und gamma zusammen vorliegen (Canessa, Schild et al. 1994). Der limitie-

rende Faktor für die Natriumreabsorption scheint die ENaC-1 β -Untereinheit zu sein (Mall, Grubb et al. 2004). *SCNN* wird in verschiedenen Organen exprimiert, die nur zum Teil von der CF betroffen sind. Zu den Organen, die *SCNN* exprimieren und bei CF verändert sind, zählen Lunge, Pankreas, Haut, Kolon und Anteile der Geschlechtsorgane (Uterus, Vagina und Prostata) (RIKEN_FANTOM5_project 2020).

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, ob ENaC direkt durch CFTR beeinflusst werden kann. Für die Möglichkeit einer Beeinflussung von ENaC durch CFTR spricht, dass in Zellkulturen von *Xenopus* Oozyten gezeigt werden konnte, dass CFTR kurzzeitig die Aktivität von ENaC hemmt (Kunzelmann, Kiser et al. 1997; Ji, Chalfant et al. 2000). Allerdings wiesen Nagel und KollegInnen (2001) nach, dass der durch ENaC vermittelte Natriumionentransport allgemein durch Chloridionen gehemmt werden kann, unabhängig davon, ob diese durch CFTR oder anderen Chloridionenkanälen vermittelt werden (Nagel, Szellas et al. 2001). Somit bleibt dieser Aspekt auch heute noch ungeklärt.

Neben der Interaktion mit ENaC wird auch bei dem Natriumionen- und Wasserstoffionenaustauscher 3 (NHE3, engl. *Sodium-hydrogen exchanger 3*) eine Regulation durch CFTR vermutet. Dieser Ionenaustauscher ist in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen der Niere und des Darms lokalisiert und transportiert Natriumionen im Austausch mit Wasserstoffionen aus dem Lumen in das Zellinnere (Donowitz und Welsh 1986).

2.2.3 Einfluss des Ionentransports auf den Mukus des Respirationstraktes

Die beiden Ionenkanäle CFTR und ENaC werden in den sekretorischen Epithelzellen der luftführenden Wege exprimiert. Dieser Grenzfläche zum Lumen liegt eine zweischichtige Mukusschicht auf. Die untere, periziliäre, flüssige Solschicht ist etwa 5 μm hoch und sorgt für eine leichte Beweglichkeit der Kinozilien. Die hierauf aufgelagerte Gelschicht ist beim Menschen ein bis wenige Millimeter dick. Eine ihrer Hauptaufgaben ist es, Partikel und Pathogene zu binden (Wanner, Salathe et al. 1996; Choi, Kim et al. 2015). Diese werden zusammen mit dem Mukus durch die Bewegung der Kinozilien retrograd Richtung Kehlkopf transportiert. Dieser Vorgang wird als mukoziliäre Reinigung (MZR) bezeichnet. Seine Effektivität hängt hauptsächlich von der Höhe und Viskosität der Solschicht ab – ist diese zu hoch, zu flach oder zu zähflüssig, ist die MZR eingeschränkt. Die Höhe der Solschicht wiederum hängt hauptsächlich von ihrem Wassergehalt ab, der durch den transepithelialen Ionen- und Wasserstrom des darunterliegenden Epithels gesteuert wird. Die dafür notwendigen Chlorid- und Natriumionen werden hierbei hauptsächlich durch CFTR und ENaC reguliert (Choi, Kim et al. 2015). CFTR schleust dabei Chloridionen aktiv aus dem Zellinneren in das Lumen. Natriumionen und Wasser folgen passiv dem osmotischen Gradienten in das Lumen. ENaC transpor-

tiert Natriumionen aktiv aus dem Lumen in das Zellinnere (Hollenhorst, Richter et al. 2011), kann jedoch in seiner Aktivität durch CFTR gehemmt werden (Guggino 1999).

Des Weiteren finden sich Hinweise darauf, dass neben CFTR auch andere Ionenkanäle, sogenannte *calcium dependent chlorid channels* (CaCC), die Aufgabe des Chloridionentransports in der Lunge ausführen können (Grubb und Boucher 1999; Rock, O'Neal et al. 2009). Welche Proteine genau zu dieser Gruppe kalziumabhängiger Chloridkanäle gehören und wie diese aktiviert werden können, ist nicht abschließend geklärt (Lee, Hong et al. 2019). Ein Protein, das als CaCC agieren kann, ist unter anderem der Anoctamin1- (ANO1-) Chloridkanal (Ousingsawat, Martins et al. 2009; Lee, Hong et al. 2019). Während die CFTR-vermittelte Chloridionensekretion grundsätzlich die Höhe der Mukusschicht bestimmt, scheinen die CaCC vor allem für eine kurzfristige Regulierung der Solschicht zuständig zu sein (Hartzell, Putzier et al. 2005).

2.2.4 Einfluss des Ionentransports auf die Mukusschicht des Dickdarms

Die Wand des Dickdarms weist zur Vergrößerung der Oberfläche Krypten auf. Das auskleidende Epithel besteht aus Mikrovilli-tragenden Saumzellen und schleimproduzierenden Becherzellen. Neben der Absorption von Nährstoffen spielt der Darm eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Für diese sind einerseits die *tight-junctions* zwischen den Epithelzellen und andererseits der sezernierte Mukus, der den Epithelzellen aufliegt, die wichtigsten Faktoren. Die Mukusschicht stellt ähnlich wie in der Lunge eine physische Barriere gegen pathogene Erreger dar, bietet jedoch bei krankhafter Veränderung des Mukus einen idealen Nährboden für diese (Ley, Peterson et al. 2006). Auch hier spielt der Wassergehalt des Mukus eine wichtige Rolle für dessen Viskosität. Der Wassertransport durch das Epithel folgt dem Ionengradienten, der vor allem über die aktive Sekretion von Chloridionen aus dem Zellinneren der Epithelzellen in das Lumen reguliert wird. Dadurch werden Natriumionen und Wasser parazellulär mit dem osmotischen Gefälle in das Lumen gezogen (Taylor und Hardcastle 2006). Während dieses aktiven Chloridionentransports muss die Natriumreabsorption gehemmt sein (Greger, Mall et al. 1996). Die Wasserresorption aus dem Dickdarm wird vor allem über die aktive Aufnahme von Natriumionen realisiert (Lee, Hong et al. 2019).

Analog zur Lunge werden auch im Dickdarm neben CFTR andere Chloridkanäle, vor allem CaCC, exprimiert. So wurde ANO1 als CaCC ebenfalls in der apikalen Membran des Kolons nachgewiesen (Lee, Hong et al. 2019). Inwieweit die CaCC im Dickdarm jedoch bei der Chloridionensekretion eine Rolle spielen, ist noch nicht vollständig untersucht (Hartzell, Putzier et al. 2005; Lee, Hong et al. 2019). Neben der Rolle des CFTR-Kanals in der

Mukussekretion spielt er im Darm auch eine Rolle in der Aktivitätskontrolle der aktiven Natriumionenreabsorption, indem er ENaC hemmt (Kunzelmann, Schreiber et al. 2000).

2.2.5 Expressionsmuster von *CFTR* beim Menschen

Gewebe, in denen *CFTR* beim Menschen nachweislich exprimiert wird, kann in epitheliales und nicht-epitheliales Gewebe eingeteilt werden. Dabei ist die Expressionshöhe von *CFTR* in epithelialen Zellen im Allgemeinen höher als in nicht-epithelialen Zellen (Trezise 2006). In den epithelialen Zellen findet man den *CFTR*-Chloridkanal zumeist in der apikalen Zellmembran (Crawford, Maloney et al. 1991; Marino, Matovcik et al. 1991; Denning, Ostedgaard et al. 1992). Daneben kann man die epithelialen Gewebe, die *CFTR* exprimieren, danach unterscheiden, ob diese bei der CF verändert sind.

Zu den *CFTR*-exprimierenden epithelialen Geweben, die bei CF verändert sind, gehören (Snouwaert, Brigman et al. 1992; Trezise 2006):

- Epithel der Schweißdrüsen der Haut
- Submukosale Drüsen (SMD) und Epithel der luftführenden Wege
- Epithel im Dünn- und Dickdarm, z. B. der Liberkühnschen Drüsen
- azinöses Epithel der Speicheldrüsen
- Epithel des Pankreasausführungsganges
- Epithel der intrahepatischen Gallengänge und der Gallenblase
- Epithel der sich entwickelnden Gänge des Geschlechtsapparats
- Epithel der Zervix und des Uterus

Zu den *CFTR*-exprimierenden epithelialen Geweben, die bei CF nicht verändert sind, gehören (Snouwaert, Brigman et al. 1992; Trezise 2006):

- Epithel der Sammelrohre der Niere
- Epithel der Brunner'schen Drüsen
- Follikuläre Epithelzellen der Schilddrüse

Zusätzlich findet sich *CFTR* in folgenden nicht-epithelialen Zellen und Geweben, bei denen teilweise Veränderungen bei CF auftreten (Snouwaert, Brigman et al. 1992; Trezise 2006):

- Ventrikuläre Kardiomyozyten
- Neuronale Expression im Gehirn
- Cornea
- Endothelzellen von Gefäßen
- Glatte Muskulatur der Aorta
- Lymphozyten

2.2.6 Expressionsmuster von CFTR bei der Organentwicklung des unteren Respirationstraktes und des Darms beim Menschen

Die bereits bei Neugeborenen mit CF vorliegenden strukturellen Veränderungen in den Atemwegen deuten darauf hin, dass CFTR bereits pränatal in der Organbildung und -entwicklung eine Rolle zu spielen scheint. Die fetale Organentwicklung kann zeitabhängig in verschiedene Phasen eingeteilt werden.

2.2.6.1 Organentwicklung der Lunge

Das Lungenparenchym entwickelt sich entlang der entstehenden Luftwege. Deren Aufzweigung geschieht überwiegend nach einem stereotypen Muster, woraus sich die tierartspezifische Lobulierung der Lunge ergibt (Warburton, Bellusci et al. 2005).

Während der fetalen Organentwicklung und -differenzierung stellt die Lunge überwiegend ein ausschließlich sekretorisches Organ dar, das Lungenflüssigkeit produziert und darüber die Entwicklung der Luftwege und Alveolen unterstützt (Brennan, Wilkinson et al. 2016). Diese Lungenflüssigkeit entsteht durch den aktiven Chloridionentransport in den Epithelzellen der Luftwege. Aus diesem Grund ist diese Flüssigkeit besonders reich an Chloridionen und enthält kaum Proteine (Jain und Eaton 2006).

Die fetale Lungenentwicklung ist in fünf Phasen unterteilt: die embryonale, pseudoglanduläre, kanalikuläre, sakkuläre und alveoläre Phase. Dabei entwickeln sich die kranialen Lungenanteile meist zeitlich früher als die kaudalen, so dass es teilweise zum zeitgleichen Auftreten der einzelnen Phasen in der Lunge kommt (Shi, Bellusci et al. 2007; Warburton, El-Hashash et al. 2010).

Am Ende der **embryonalen Phase** (humane Schwangerschaftswoche 0–5) ist die Lunge ein kompaktes Organ, das kaum intraluminales Volumen besitzt.

Während der **pseudoglandulären Phase** (humane Schwangerschaftswoche 5–17) erscheinen die Epithelzellen der sich entwickelnden Luftwege kuboidal (Warburton, Bellusci et al. 2005) und das Lungengewebe ist so kompakt, dass es histologisch einer exokrinen Drüse ähnelt. Ein Gasaustausch ist in dieser Phase nicht möglich.

In der **kanalikulären Phase** (humane Schwangerschaftswoche 16–25) vergrößern die Luftwege ihre Länge und ihren Durchmesser, wobei die Vaskularisierung über Angiogenese stets parallel verläuft (Warburton, El-Hashash et al. 2010). Die terminalen Bronchiolen können nun in respiratorische Bronchiolen mit kuboidalen Epithelzellen und in Alveolargänge mit squamösen Epithelzellen unterschieden werden.

Das Hauptcharakteristikum der terminalen, **sakkulären Phase** (humane Schwangerschaftswoche 24–36) ist eine deutliche Verdünnung des interstitiellen Gewebes, einerseits durch Apoptose, andererseits durch eine weitere Differenzierung des mesenchymalen Gewebes (Hashimoto, Nakano et al. 2002; Lu, Li et al. 2002). Auch die alveolären Epithelzellen entwickeln sich weiter und können in squamöse Pneumozyten Typ I und abgerundete sekretorische Pneumozyten Typ II unterschieden werden. Gegen Ende dieser Entwicklungsphase ist die noch unreife Lunge bereits in der Lage, den Sauerstoffaustausch mit der Luft teilweise durchzuführen.

In der **alveolären Phase** (humane Schwangerschaftswoche 36 bis 7. Lebensjahr) findet die endgültige Ausreifung der Lunge statt, wobei weiteres Alveolarwachstum bis zum Abschluss des Größenwachstums des Menschen mit ca. 21 Jahren stattfindet.

Zum Zeitpunkt der Geburt steigen verschiedene Hormone wie Cortisol, Thyroidhormone und Catecholamine im fetalen Blut stark an (Shi, Bellusci et al. 2007; Hillman, Kallapur et al. 2012). Dadurch wird in der Lunge die aktive, Chloridionen-vermittelte Produktion von Lungenflüssigkeit herabreguliert und die aktive Natriumionenreabsorption der Pneumozyten Typ II wird aktiviert. Natriumionen gelangen aus dem Lumen über die apikale Zellmembran in die Zelle und werden aktiv in das Interstitium gepumpt. Durch den Ionengradienten werden Wasser und andere Ionen passiv aus dem Lumen gezogen und reduzieren so die Flüssigkeit in den Luftwegen (Venkatesh und Katzberg 1997; Jain und Eaton 2006; Shi, Bellusci et al. 2007; Hillman, Kallapur et al. 2012). Erst mit Eliminierung der Flüssigkeit in den luftführenden Wegen wird der Lunge der Sauerstoffaustausch in den Alveolen ermöglicht.

2.2.6.2 Organentwicklung des Intestinaltrakts

Zur fetalen Organentwicklung des Darms beim Menschen gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen. Die meisten Erkenntnisse über die Darmentwicklung stammen aus Untersuchungen von Modelltieren (Chin, Hill et al. 2017). Der Magen-Darm-Trakt ist von Anfang an als ein Schlauchsystem angelegt, wobei die Epithelzellen von mesenchymalen Zellen umgeben sind. Hieraus gehen alle Abschnitte vom Pharynx bis zum Anus hervor. Dabei ist ähnlich wie bei der Organentwicklung der Lunge eine fortschreitende Entwicklung des Darms von kranial nach kaudal erkennbar, so dass verschiedene Entwicklungsstadien parallel vorliegen können (Walton, Mishkind et al. 2018). Bei Mäusen beginnt am 14. Gestationstag (GT), was beim Menschen ca. der 8. SSW entspricht, die Morphogenese der Zotten. Hierbei entstehen durch mesenchymale Gewebeeinlagerungen aus zunächst rein epithelialen

Primordialzotten schließlich Sekundärzotten. Diese Zotten finden sich während der Organentwicklung in allen Darmabschnitten, bilden sich beim Säugetier im Dickdarm jedoch wieder zurück. Hier entstehen durch Epitheleinsprossungen Krypten, die sich durch Spaltungen weiter vermehren (Chin, Hill et al. 2017). Das zylindrische Epithel ordnet sich zunächst mehrschichtig an und füllt damit das Lumen nahezu vollständig aus. Mit fortschreitender Morphogenese der Zotten bilden sich zwischen den Zotten die sogenannte *intervillus domains*. In diesen stark proliferativen Bereichen wird unter Einfluss des *wingless-type Integration site family member 1/ beta-canetin* (Wnt/ β -Canetin) die Proliferation und weitere Differenzierung der Epithelzellen vorangetrieben (Chin, Hill et al. 2017). Diese differenzieren sich so zu dem bleibenden, einschichtigen, hochprismatischen Oberflächenepithel (Lv, Wu et al. 2019).

2.2.6.3 Pränatale Expression von humanem CFTR im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm

Die Expression von humanem *CFTR* (*hCFTR*) ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Das liegt vor allem an der geringen Verfügbarkeit von fetalen Gewebeproben. Zur Untersuchung der *hCFTR*-Expression wurde i. d. R. die Methode der *in situ* Hybridisierung verwendet. Dadurch wurde die Expression nur semiquantitativ ausgewertet.

In der Trachea konnte *hCFTR* mittels *in situ* Hybridisierung im Tracheaepithel zum Ende des ersten Trimenon (10.-12. SSW), im zweiten Trimenon (17.-21. SSW) und dem dritten Trimenon (25.-33. SSW) nachgewiesen werden (Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993). Dabei schien die Menge an mRNA während der gesamten fetalen Entwicklung der Trachea auf einem ähnlichen Niveau zu bleiben (Tizzano, Chitayat et al. 1993).

In den luftführenden Wegen der Lunge konnte *hCFTR* ebenfalls in den Epithelzellen der Bronchien und Bronchioen in allen drei Trimenen nachgewiesen werden (McCray, Wohlford-Lenane et al. 1992; Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993). Die Menge an mRNA schien im zweiten Trimenon leicht höher zu sein als in den anderen beiden Trimenen (Trezise, Chambers et al. 1993). Auffällig ist auch, dass die Menge an *hCFTR*-mRNA in den luftführenden Wegen in Feten größer ist als bei Neugeborenen (Trezise, Chambers et al. 1993) bzw. im zweiten Trimenon höher ist als bei Erwachsenen (McGrath, Basu et al. 1993; Bergougnoux, Rivals et al. 2014).

Mittels *in situ* Hybridisierung konnte beim Menschen ebenfalls eine gleichbleibende, jedoch sehr hohe Expression in den undifferenzierten Epithelzellen des Dickdarms am Ende des ersten Trimenon (10.–12. SSW) und später im zweiten und dritten Trimenon in den Epithelzellen der sich entwickelnden Dickdarmkrypten nachgewiesen werden (Tizzano, Chitayat et

al. 1993). Dabei war die Menge an mRNA während der fetalen Entwicklung des Dickdarms ähnlich hoch wie beim Erwachsenen (Trezise, Chambers et al. 1993), jedoch war die semi-quantitativ bestimmte Menge an mRNA beim Menschen im Darmtrakt deutlicher höher als in anderen Organen, wie der Lunge (Tizzano, Chitayat et al. 1993).

Das hCFTR-Protein konnte von Gaillard und KollegInnen (1994) beim Menschen diffus im Zytoplasma der sich entwickelnden Epithelzellen der Trachea im ersten Trimenon (7. SSW) nachgewiesen werden. Am Übergang vom zweiten zum dritten Trimenon (24.–25. SSW) wurde das Signal dabei hauptsächlich in der apikalen Plasmamembran von zillierten Epithelzellen nachgewiesen, nicht jedoch in den Becherzellen (Gaillard, Ruocco et al. 1994).

In der Lunge fand sich ein schwaches, diffus im Zytoplasma verteiltes hCFTR-Signal in den undifferenzierten Epithelzellen der luftführenden Wege im ersten Trimenon (7. SSW). Am Übergang des zweiten zum dritten Trimenon (24.–25. SSW) wurde das hCFTR-Protein in der apikalen Plasmamembran zillierter Epithelzellen nachgewiesen, nicht jedoch in Becherzellen (Gaillard, Ruocco et al. 1994). In den Bronchien war das Signal von hCFTR diffus im Zytoplasma sowohl der zillierten als auch der noch undifferenzierten Epithelzellen zu finden. Dabei nahm die Signalstärke im Epithel der luftführenden Wege von den kleineren Bronchien zu den distalen respiratorischen Bronchiolen hin ab (Gaillard, Ruocco et al. 1994). Diese Entwicklung von einem zunächst diffusen Signal im Zytoplasma im ersten Trimenon hin zu einem Signal, das ab etwa der Mitte der Schwangerschaft in der apikalen Zellmembran lokalisiert ist, konnte auch durch Marcorelles und KollegInnen (2007) in einer weiteren Untersuchung in Epithelzellen der luftführenden Wege der Lunge bestätigt werden (Marcorelles, Montier et al. 2007).

Im Dickdarm konnte das hCFTR-Protein beim Menschen während aller Phasen der fetalen Entwicklung in ähnlicher Stärke nachgewiesen werden. Dabei wurde das Signal in den unreifen Enterozyten bzw. in den Epithelzellen der im zweiten Trimenon auftretenden Krypten lokalisiert. Zusätzlich fanden sich in den Becherzellen der Krypten im zweiten Trimenon basal liegende Signale von hCFTR (Gaillard, Ruocco et al. 1994). Diese sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auffällige Abnahme der Signalstärke entlang der Krypten-Lumen-Achse könnte mit der Differenzierung der Enterozyten entlang dieser Achse zusammenhängen (Gaillard, Ruocco et al. 1994).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die mRNA von hCFTR während der gesamten, fetalen Entwicklung im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm nachgewiesen werden kann. Dabei ist die semiquantitativ bestimmte Menge an mRNA während der Schwangerschaft auf einem relativ gleichbleibenden Niveau. Eine Ausnahme stellt hier die Lunge dar, in der die Menge an mRNA im zweiten Trimenon größer zu sein scheint als im ersten und drit-

ten Trimenon. Auffällig ist weiterhin, dass die Menge der *hCFTR*-mRNA in den meisten Organen bei Erwachsenen und Feten vergleichbar groß ist. Auch hier stellt die Lunge eine Ausnahme dar. In der Lunge scheint die mRNA-Menge bei Feten größer zu sein als beim Erwachsenen, besonders im zweiten Trimenon (Trezise, Chambers et al. 1993).

2.3 Pathogenese der CF im Zusammenhang mit CFTR und dem epithelialen Natriumkanal ENaC

2.3.1 Mutation des *CFTR*-Gens

Bereits vor mehr als 30 Jahren wurde erstmalig eine Mutation des *CFTR*-Gens als Ursache für die Störung des Chloridionentransports identifiziert, die zur Ausbildung von CF führt (Riordan, Rommens et al. 1989). Seitdem wurden über 2000 verschiedene Mutationen des Gens entdeckt (Rommens 2011). Jedoch wurden bisher bei weitem nicht alle Mutationen hinsichtlich ihrer Folgen für das CFTR-Protein hin untersucht (Lopes-Pacheco 2016). Von den untersuchten Mutationen führen nachweislich ein Großteil zu klinischen Symptomen der CF. Nach einer Datenbank mit knapp 90.000 CF-PatientInnen führen von den 432 dort beschriebenen *CFTR*-Mutationen 352 zu klinischen Symptomen der CF (US CF Foundation 2020).

Alle *CFTR*-Mutationen werden über einen autosomal-rezessiven Erbgang vererbt. Dadurch kann nur dann eine klinisch manifeste CF-Erkrankung auftreten, wenn jeweils beide Elternteile ein mutiertes Allel vererben, das CF verursacht. Statistisch gesehen ist etwa jeder fünf- und zwanzigste Deutsche Träger einer Mutation in dem entsprechenden *CFTR*-Allel (World Health Organization 2020).

Das CFTR-Protein hat die primäre Funktion, Chloridionen aus dem Zellinneren in das Lumen zu transportieren. Die *CFTR*-Mutationen können, abhängig davon, wie sie die Funktionalität des CFTR-Proteins verändern, in sechs Klassen eingeteilt werden (Rowntree und Harris 2003; Borowitz und Gelfond 2013; Lopes-Pacheco 2019):

- Klasse I: Aufgrund einer fehlerhaften Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger-ribonucleic acid*, mRNA), die verkürzt ist oder verfrüht abgebaut wird, fehlt das CFTR-Protein vollständig.
- Klasse II: Die Prozessierung des CFTR-Proteins ist gestört, wodurch auch der Transport zur finalen Lokalisation in der apikalen Zellmembran gestört wird. Das Protein wird von der Zelle als fehlgefaltet erkannt und abgebaut, bevor es die apikale Zellmembran erreicht. In diese Kategorie fällt die häufigste Deletion p.Phe508del (früher

$\Delta F508$), bei der an der Stelle 508 des CFTR-Proteins durch eine Deletion von drei Nukleotiden die Aminosäure Phenylalanin fehlt.

- Klasse III: Das CFTR-Protein weist eine verringerte Ansprechbarkeit durch ATP auf, wodurch die Aktivität des Chloridkanals reduziert ist. Die Proteinproduktion und die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran sind normal, es findet jedoch kein Ionentransport statt.
- Klasse IV: Der Ionentransport durch den Kanal ist gestört, es kann z. B. die Dauer, in der der Kanal geöffnet ist, reduziert sein.
- Klasse V: Das korrekte Ablesen der Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA) vor der Transkription ist gestört. Es werden z. B. einzelne Proteinkodierende Abschnitte eines Gens (Exon, engl. *expressed region*) übersprungen oder Nonsense-Sequenzen eingefügt. Dadurch ist die absolute Menge der mRNA-Kopien reduziert, was zu einer reduzierten Anzahl von CFTR-Kanälen in der Plasmamembran führt.
- Klasse VI: Der CFTR-Kanal weist eine reduzierte Proteinstabilität auf und wird deswegen verfrüht abgebaut.

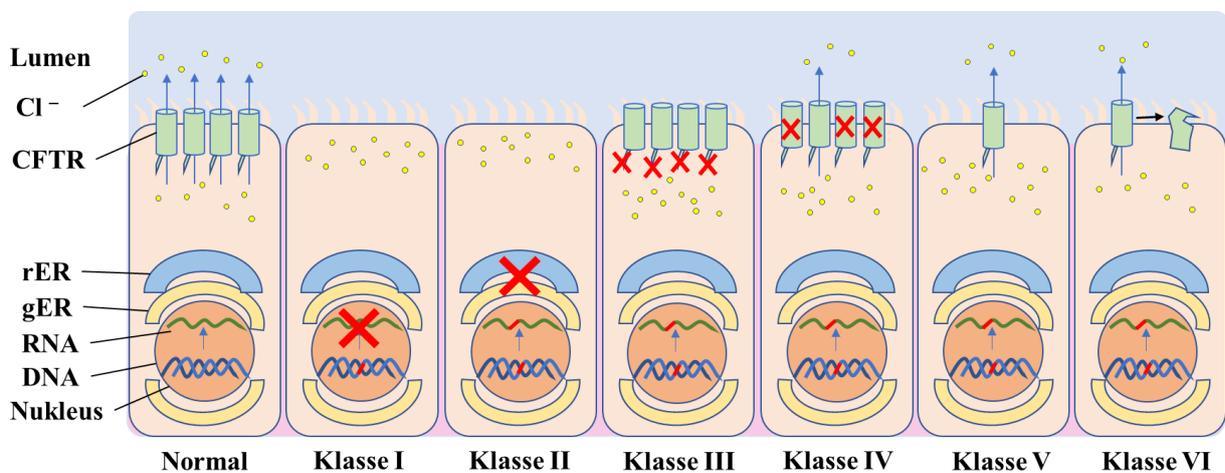


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mutationsklassen von CFTR und ihrer Art des Funktionsverlustes im Vergleich zum intakten CFTR-Protein.

Normal: Der CFTR-Kanal transportiert Chloridionen aus dem Zellinneren in das Lumen.

Klasse I: Das CFTR-Protein fehlt aufgrund der fehlerhaften RNA vollständig.

Klasse II: Das CFTR-Protein fehlt aufgrund der fehlerhaften Prozessierung vollständig.

Klasse III: Der Ionentransport findet aufgrund fehlender Aktivierung des CFTR-Kanals nicht statt.

Klasse IV: Durch eine mangelnde Transportfähigkeit findet nur ein deutlich reduzierter Chloridionentransport statt.

Klasse V: Es wird nur eine geringe Menge CFTR-Protein gebildet.

Klasse VI:

Das CFTR-Protein ist sehr instabil in der Plasmamembran. Cl⁻: Chloridionen; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; rER: raues Endoplasmatisches Retikulum; gER: glattes Endoplasmatisches Retikulum; RNA: Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid); DNA: Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid). Eigene Grafik in Anlehnung an Lopes-Pacheco 2019, S. 7.

2.3.2 Auswirkung der CFTR-Mutation auf die Klinik der CF

Bei einer Mutationen der Klasse I und II weisen die CFTR-Kanäle überwiegend keine, in manchen Fällen jedoch eine minimale Restaktivität auf. Solche Mutationen gehen deswegen i. d. R. mit einem schweren CF-Phänotyp einher (Lopes-Pacheco 2019) und werden deswegen auch als schwere Mutation bezeichnet. Die Mutationen der Klasse IV–VI führen zur Ausbildung von CFTR-Kanälen mit einer deutlich höheren Restaktivität. Solche Mutationen gehen zumeist mit einem milden CF-Phänotyp einher (Lopes-Pacheco 2019) und werden deswegen auch milde Mutation genannt.

Durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Mutationen können sich die Funktionseinschränkungen und die damit einhergehende klinische Symptomatik stark von CF-PatientInnen zu CF-PatientInnen unterscheiden (Kerem und Kerem 1996). Die Beeinflussung der Schwere der CF-Symptome durch die einzelnen Mutationen bzw. deren Kombination ist dabei äußerst komplex. Ein direktes Ableiten des Grads der Symptome aus der Schwere der vorliegenden Mutationen ist dabei nicht immer möglich. So können bei gleichzeitigem Vorliegen einer milden und einer schweren Mutationsklasse in den *CFTR*-Allelen die auftretenden klinischen Symptome milder sein als bei gleichzeitigem Vorliegen von zwei schweren Mutationen (Salvatore, Scudiero et al. 2002). Auch CF-PatientInnen mit denselben Mutationen in den *CFTR*-Allelen können unterschiedlich stark ausgeprägte klinische Symptome aufweisen (Kerem und Kerem 1996). Dabei scheinen einzelne klinische Veränderungen mit bestimmten Genotypen zu korrelieren. So tritt z. B. eine Pankreasinsuffizienz bei nahezu allen homozygoten p.Phe508del-PatientInnen auf (Borgo, Mastella et al. 1990). In der Lunge wird jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen klinischen Symptomen und Genotyp kontrovers diskutiert. So treten einerseits Lungensymptome in milderer Form auf, wenn gleichzeitig eine milde *CFTR*-Mutation und eine Pankreasinsuffizienz vorliegen. Andererseits treten bei verschiedenen homozygoten p.Phe508del-PatientInnen Lungenveränderungen in stark unterschiedlichen Schweregraden auf (Salvatore, Scudiero et al. 2002).

2.3.3 Pathophysiologie der CF in den luftführenden Wegen

Bei CF tritt durch reduzierten oder vollständig fehlenden Chloridionentransport und dem geminderten Bikarbonattransport bei gleichzeitigem Fehlen einer kompensierenden Natriumhyperabsorption ein Ungleichgewicht der Ionen der Solschicht auf, wodurch der Wassergehalt der Solschicht und dadurch ihre Höhe reduziert wird (Chen, Stoltz et al. 2010; Choi, Kim et al. 2015; Stoltz, Meyerholz et al. 2015). Der eingedickte Mukus wird dann nur noch ineffektiv durch die mukoziliare Reinigung (MZR) entfernt.

Es gibt zwei Theorien dazu, wie der veränderte Ionentransport durch CFTR und ENaC die Eigenschaften der Solschicht beeinflusst und so zu den typischen Pneumonien bei CF führt. Die Zusammensetzungshypothese stellt die Salzkonzentration in der Solschicht und deren Einfluss auf antimikrobielle Peptide in den Vordergrund. Durch CFTR werden bei gesunden Menschen Chloridionen aus dem Lumen in die Zelle transportiert. Gleichzeitig werden Natriumionen über ENaC in das Zellinnere transportiert. Dadurch entsteht eine niedrigere Salzkonzentration in der Solschicht, wodurch wiederum antimikrobielle Peptide aktiviert werden (Smith, Travis et al. 1996). Bei CF-PatientInnen ist die Salzkonzentration in der Solschicht jedoch stark erhöht. Das inaktiviert die antimikrobiellen Peptide und begünstigt so chronische Entzündungen (Smith, Travis et al. 1996; Zabner, Smith et al. 1998). So konnte In CF-Zellkulturen von humanem Tracheaepithel, die keine Immunzellabwehr aufweisen, im Vergleich zu gesunden Zellkulturen ein Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt werden. Nach Applikation von rekombinantem Adenovirus, welches die CFTR-Funktionalität in den CF-Epithelzellen wiederherstellte, wurden die Bakterien inaktiviert (Smith, Travis et al. 1996).

Dagegen stellt die Volumenreduktionshypothese allein die Reduktion der Solschichthöhe durch den gestörten Ionentransport und die dadurch reduzierte MZR in den Vordergrund. Der Ionentransport durch CFTR und ENaC optimiert in gesunden Menschen das Volumen der Solschicht und damit auch die MZR. Im Gegensatz dazu ist bei CF-PatientInnen die Absorption von Natrium und Wasser erhöht, was zu einer Reduktion der Solschichthöhe sowie zu einer Störung der MZR führt (Matsui, Grubb et al. 1998; Zabner, Smith et al. 1998; Knowles und Boucher 2002). Durch die reduzierte MZR werden dann Infektionen mit Pneumonieerregern begünstigt.

Weitere Hypothesen stellen die Funktion von CFTR als Ionenkanal in den Hintergrund und vermuten, dass die Pathogenese in der Lunge von CF hauptsächlich auf eine abnormale Funktionsweise der submukosalen Drüsen (SMD) (Jayaraman, Joo et al. 2001; Verkman, Song et al. 2003) oder auf eine fehlerhafte Modulation der epithelialen Entzündungsreaktion zurückzuführen sein könnte (Heeckeren, Walenga et al. 1997).

2.3.4 Pathophysiologie der CF im Darm

Während bereits verschiedene Theorien zur Pathogenese der CF in der Lunge existieren, wird der Pathomechanismus der CF im Darm bisher nur unvollständig verstanden. Bekannt ist, dass die CFTR-Störung im Dickdarm sowohl mit dem Verlust bzw. der deutlichen Reduktion des Chloridionentransportes als auch mit einer Störung des Bikarbonattransportes einher geht (Borowitz 2015). Diese Ionentransportstörungen führen zu einer Eintrocknung des Darminhalts. Bei Vorliegen einer Pankreasinsuffizienz, wie sie bei nahezu allen jugendlichen und erwachsenen CF-PatientInnen vorliegt, wird die Eintrocknung des Darminhaltes zusätzlich verstärkt (Clarke und Harline 1998; Clarke, Stien et al. 2001; Garcia, Yang et al. 2009). Ob zusätzlich die Amilorid-sensitive Natriumabsorption durch ENaC im Epithel des Dickdarms eine Rolle bei CF spielt, wird kontrovers diskutiert. Einige Studien finden eine Erhöhung des Amilorid-sensitiven Natriumtransports im Kolon von CF PatientInnen (Orlando, Powell et al. 1989; Goldstein, Shapiro et al. 1991), andere konnten keine signifikanten Unterschiede in Proben des Rektums nachweisen (Goldstein, Nash et al. 1988; Hardcastle, Hardcastle et al. 1991).

2.3.5 ENaC und CF – eine kontroverse Diskussion

Auch nach knapp 40 Jahren intensiver Forschung wird die Rolle von ENaC in der CF immer noch kontrovers diskutiert. Bereits 2004 entwickelten Mall und KollegInnen ein Mäusemodell, um diese Zusammenhänge zu untersuchen. In Mäusen, die *Scnn1b* spezifisch in der Lunge überexprimieren, bei denen CFTR jedoch in normaler Form vorliegt, wurde in den luftführenden Wegen eine reduzierte Höhe der Solschicht und eine erhöhte Konzentration an Feststoffen im Mukus nachgewiesen. Letztere waren in Mukusansammlungen, die die distalen Luftwege verlegt haben, am größten und konnten sowohl bei neonatalen als auch adulten Mäusen mit einer Überexpression von *Scnn1b* nachgewiesen werden (Mall, Grubb et al. 2004). Zusätzlich konnte mittels Mikrodialyse beobachtet werden, dass die MZR mit einer verringerten Geschwindigkeit Fremdstoffe entfernt. Auf histologischer Ebene wurden neben den Mukusansammlungen auch Metaplasien der Becherzellen gefunden (Mall, Grubb et al. 2004). Aufgrund der spezifischen Überexpression von *Scnn1b* in der Lunge beschränken sich die Veränderungen dieser Mauslinie auf die Lunge, Veränderungen im Darm finden sich in diesem Modell nicht (Mall, Grubb et al. 2004). Die auftretenden Lungenentzündungen waren dominiert von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Mall, Grubb et al. 2004), was zu den Beobachtungen beim Menschen passt (Zuelzer und Newton 1949). Bei diesem Mausmodell konnten im Gegensatz zum Menschen allerdings keine Bakterien in den Lungen nachgewiesen werden (Mall, Grubb et al. 2004). Im Vergleich dazu konnten bei Mäusen, die

Scnn1a und *Scnn1c* überexprimieren, keine erhöhten Natriumtransportraten und keine Lungenerkrankungen festgestellt werden (Mall, Grubb et al. 2004). Dieses Mausmodell mit einer Überexpression von *Scnn1b* gibt wichtige Einblicke in die Pathogenese der CF und der Rolle von ENaC bei dieser Erkrankung.

Um die Rolle von ENaC in der Pathogenese von CF weiter zu untersuchen, versuchten Grubb und KollegInnen 2012 mittels einer zusätzlichen Überexpression von humanem CFTR die Lungenpathologie von transgenen Mäusen, die *Scnn1b* überexprimieren, zu korrigieren. Dieses gelang jedoch nicht (Grubb, O'Neal et al. 2012). Sie schränken jedoch ein, dass das humane CFTR eventuell nicht in denselben Zellen wie das murine *Scnn1b* in dem Mäusemodell mit einer *Scnn1b*-Überexpression exprimiert sein könnte. Ein anderer Grund könnte sein, dass sich die beiden Gene, die aus unterschiedlichen Tierarten stammen, nur eingeschränkt gegenseitig beeinflussen können (Grubb, O'Neal et al. 2012).

Andererseits finden sich Hinweise darauf, dass der Verlust von CFTR nicht immer zu einer Dysregulation von ENaC in der Lunge führt (Chen, Stoltz et al. 2010; Itani, Chen et al. 2011). In Untersuchungen an CFTR^{-/-}-Schweinen konnte zwar ein stark eingeschränkter Chloridiontransport nachgewiesen werden, aber keine Erhöhung in der Natrium- und Wasserabsorption (Chen, Stoltz et al. 2010). Auch in humanen Trachealzellen wurde kein erhöhter Natriumtransport nachgewiesen (Itani, Chen et al. 2011). Jedoch weisen die AutorInnen selbst darauf hin, dass Einschränkungen im Versuchsaufbau vorliegen, so dass eine Rolle von ENaC-1 β in der Pathogenese der CF nicht ausgeschlossen werden kann (Itani, Chen et al. 2011). Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um die Rolle von ENaC in der CF zu verstehen.

2.4 Therapieansätze der CF

Durch die systematische CF-Forschung der letzten Jahrzehnte sind eine frühere Diagnose der CF und immer weiter verbesserte Behandlungsmethoden möglich geworden. Verstarben die meisten CF PatientInnen in den 1960er Jahren noch im Säuglings- oder Kleinkindalter, liegt die Lebenserwartung bei CF derzeit bei 40–50 Jahren (Lopes-Pacheco 2019). Bis heute ist CF jedoch nicht heilbar, lediglich eine symptomatische Behandlung ist möglich. Der Hauptfokus liegt dabei auf einer Verlangsamung der progressiven Lungenentzündungen (Cohen-Cymbarknoh, Shoseyov et al. 2011), da diese unbehandelt zu einem frühen Versterben schon im Kindesalter führen.

2.4.1 Mutationsunabhängige, symptomatische Behandlung der Lungenerkrankungen bei CF

Um den zähen Mukus in den Lungen von CF-PatientInnen flüssiger zu machen und damit die mukoziliare Reinigung (MZR) zu verbessern, werden Mukolytika und Hydratoren, wie Mannitol und hypertone Salzlösungen genutzt (Lopes-Pacheco 2016). Die Lungenentzündungen werden mit antiinflammatorischen Medikamenten und Antibiotika behandelt, wobei immer häufiger multiresistente Keime die Behandlung erschweren (Cohen-Cymbarkon, Shoseyov et al. 2011; Lopes-Pacheco 2016; Castellani, Duff et al. 2018). In der Endphase der CF-Lungenerkrankung sind die PatientInnen auf eine dauerhafte Sauerstoffgabe angewiesen. Die letzte Option ist dann eine Lungentransplantation, die jedoch bei CF-PatientInnen ein erhöhtes Risiko der Organabstoßung birgt (Adler, Aurora et al. 2009; Calabrese, Lunardi et al. 2015; Ramos, Smith et al. 2019). Solche symptomatischen Basistherapien können die klinischen Symptome zwar teilweise lindern, den Krankheitsprozess der CF jedoch nicht dauerhaft aufhalten.

2.4.2 Mutationsspezifische Behandlung der Lungenerkrankungen bei CF durch CFTR-Modulatoren

Heutzutage wird der symptomatische, mutationsunabhängige Behandlungsansatz durch individualisierte Behandlungsschemata ergänzt, die nur bei bestimmten Mutationen wirksam sind. Hierzu werden z. B. CFTR-Modulatoren eingesetzt, die die Leitfähigkeit des CFTR-Kanals verbessern oder sogar vollständig wiederherstellen. Diese Medikamente wirken nur bei bestimmten *CFTR*-Mutationen und werden vor allem zur Reduzierung der Entzündungen in der Lunge eingesetzt. Je nach Wirkeffekt werden die CFTR-Modulatoren in fünf Gruppen eingeteilt: Potentioren, Korrektoren, Stabilisatoren, Verstärker und sogenannte *read-through* Präparate.

Bei eingeschränkter Öffnung des CFTR-Kanals, wie sie vor allem bei den Mutationsklassen III und IV vorkommen (siehe 2.1.1.), können Potentioren die Funktionalität des CFTR-Kanals wiederherstellen oder sogar über das normale Niveau hinaus steigern (Lopes-Pacheco 2016). Getestet wurden Medikamente, die die Öffnungszeit des CFTR-Kanals über ATP-Analoga oder intrazellulärer Steigerung von cAMP erhöhen (Illek und Fischer 1998; Zhou, Wang et al. 2005). Da diese beiden Moleküle jedoch auch in zahlreichen anderen zellulären Prozessen eine Rolle spielen, kann es bei Einsatz solcher Mittel zu starken unerwünschten Nebenwirkungen in anderen Organen als dem Zielorgan kommen. Daher ist es notwendig, Wirkstoffe zu nutzen, deren Wirkung sich größtenteils auf das Zielorgan beschränkt. Ein zugelassenes Medikament basiert auf dem Wirkstoff Ivacaftor, der für CF-

PatientInnen älter als sechs Jahre zugelassen ist (Ramsey, Davies et al. 2011). Bei CF-PatientInnen verbessert dieser die MZR und verringert die Anzahl der Episoden von Lungenentzündungen. Hierdurch kann die fortschreitende Einschränkung der Lungenfunktion verlangsamt, jedoch nicht gänzlich aufgehalten werden. (Lopes-Pacheco 2019). Sun und KollegInnen führten 2019 erste Untersuchungen mit Ivacaftor an Frettchenfeten durch, die die *CFTR*-Mutation G551D/G551D aufweisen. Bei diesen treten typische CF-Symptome, wie ein Mekoniumileus, Obstruktionen des Darms oder Lungeninfektionen auf. Die intrauterine Darreichung von Ivacaftor führte zu einer nahezu normalen Funktionalität von *CFTR*. Die neugeborenen CF-Frettchen wiesen so lange keine klinischen CF-Veränderungen auf, wie sie das Medikament auch nach der Geburt bekamen. Nach dem Absetzen des Medikaments traten diese jedoch wieder auf und führten zum Versterben der Tiere. Makroskopisch wiesen die Lungen der behandelten und nach Absetzen von Ivacaftor verstorbenen CF-Frettchen Atelektasen und Emphyseme sowie eine Akkumulation von Mukus in den Luftwegen auf. Histologisch war die Mukusakkumulation in den großen Luftwegen und dem Lumen der submukosalen Drüsen (SMD) nachweisbar. Jedoch trat auch trotz Medikamentengabe ein fataler Mekoniumileus auf, je nach Modelllinie zu einem stark schwankenden Prozentsatz von 4–78 % (Sun, Yi et al. 2019). Auf Grund des Wiederherstellens der Funktionalität von *CFTR* bei neugeborenen Frettchen wird Ivacaftor als ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung auch neugeborener CF-PatientInnen angesehen, da es bei diesen das Auftreten der ersten Lungenpathologien deutlich hinauszögern könnte.

CFTR-Mutationen der Klasse II, zu der die häufigste Mutation p.Phe508del gehört, gehen mit einem nahezu vollständigen Fehlen des *CFTR*-Kanals in der Plasmamembran einher (siehe 2.1.1.). Korrektoren können die Fehlprozessierung des *CFTR*-Proteins, wie sie dieser Mutationsklasse zugrunde liegen, verhindern (Lopes-Pacheco 2016). Zu diesen *CFTR*-Modulatoren gehören pharmakologische Chaperone, die direkt an die fehlerhafte *CFTR*-Proteine binden, und Proteostase-Regulatoren, die die Interaktion mit den intrazellulären Kontrollmechanismen modulieren. Beide ermöglichen die Passage des *CFTR*-Proteins durch das endoplasmatische Retikulum (ER), das u. a. der Kontrolle der neu gebildeten Proteine dient (Lukacs und Verkman 2012). Ein Beispiel für einen *CFTR*-Korrektor ist Lumacaftor, durch das mehr *CFTR*-Proteine trotz Fehlfaltung die Prozessierung durchlaufen und somit die Anzahl an membranständigen *CFTR*-Kanälen in p.Phe508del-Zelllinien erhöht wird (Van Goor, Hadida et al. 2011). In klinischen Studien erwies sich Lumacaftor jedoch nur in Kombination mit Ivacaftor als wirksam (Boyle, Bell et al. 2014) und wurde für CF-PatientInnen älter als zwei Jahre mit einer homozygoten p.Phe508del-Mutation zugelassen (McNamara, McColley et al. 2019). Die kombinierte Behandlung führte auch bei diesen PatientInnen, die

aufgrund dieser Mutation in der Regel schwere, klinische Lungenveränderungen aufweisen, zu einer reduzierten Häufigkeit von Lungenentzündungen (McColley, Konstan et al. 2019).

CFTR-Kanäle der Mutationsklasse VI, weisen in der Plasmamembran eine reduzierte Haltbarkeit auf und werden im Vergleich zu normalen CFTR-Kanälen verfrüht abgebaut (Haardt, Benharouga et al. 1999). CFTR-Modulierer der Gruppe der Stabilisatoren greifen hier an und verankern den CFTR-Kanal in der Plasmamembran, um dadurch ihren Abbau durch Lysosomen zu verzögern (Fukuda und Okiyonedo 2018). Ein Beispiel für einen solchen Stabilisator ist der *hepatocyte growth factor*, der in Kombination mit Lumacaftor die Prozessierung und Stabilität des CFTR-Kanals in p.Phe508del-exprimierenden Zellen deutlich verbessert. Der Wirkstoff Cavosonstat konnte zwar die Chloridionenkonzentration im Schweiß reduzieren, zeigte darüber hinaus aber keine weiteren positiven Effekte in Bezug auf andere CF-Symptome. Bisher konnte noch kein Wirkstoff dieser Gruppe der CFTR-Modulatoren gefunden werden, der es zur Marktreife geschafft hätte (Lopes-Pacheco 2019).

CFTR-Mutationen der Klasse V führen zu einer reduzierten Synthese oder Prozessierung des CFTR-Proteins (Siehe 2.1.1.). CFTR-Modulatoren der Gruppe der Verstärker erhöhen die Expression von CFTR-mRNA und damit auch die Menge an CFTR-Protein (Giuliano, Wachi et al. 2018). Ein vielversprechender Kandidat dieser Gruppe ist Nesolicaftor. Dieser Wirkstoff erhöht die Proteinmenge von CFTR in heterozygoten p.Phe508del-Zellen, wenn es mit Lumacaftor und Ivacaftor zusammen verabreicht wird (Molinski, Ahmadi et al. 2017).

CFTR-Mutationen der Klasse I weisen eine gestörte Proteinsynthese auf, da die gebildete mRNA aufgrund von fehlenden oder zusätzlich eingefügten Sequenzen fehlerhaft ist (siehe 2.1.1.). Wenn in der mRNA eine bestimmte fehlerhafte Sequenz, ein sogenanntes *premature termination*-Kodon, eingefügt wurde, kann diese Sequenz durch *read through*-Präparate überschrieben werden. Die dadurch korrigierte Sequenz der CFTR-mRNA kann so zu einem normalen CFTR-Protein prozessiert werden (Pranke, Bidou et al. 2018). Bis jetzt hat es jedoch noch kein Wirkstoff dieser Gruppe zur Marktreife geschafft (Lopes-Pacheco 2019).

Mit CFTR-Modulatoren wurden einige wenige Wirkstoffe entdeckt, die heute schon eingesetzt werden. Diese Wirkstoffe wirken vor allem bei CF-PatientInnen, die eine Restaktivität des CFTR-Kanals aufweisen. Diese machen jedoch lediglich einen sehr geringen Anteil der CF-PatientInnen aus, so dass weitere Anstrengungen unternommen werden, mit neuen CFTR-Modulatoren vor allem die schweren Mutationen der Klasse I und II anzusprechen.

2.4.3 Gentherapie der CF

Ein anderer Ansatz für die Behandlung von CF-PatientInnen mit Mutationen der Klasse I und II stellt die Gentherapie dar. Das Ziel ist hierbei, dass normale *CFTR*-Gensequenzen in den Zellkern der Epithelzellen des CF-PatientInnen eingeschleust werden. Im Zellkern sollen diese die Translation von normalem CFTR übernehmen und so die normale CFTR-Funktionalität in der Plasmamembran wiederherstellen. In der Regel werden hierfür Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und nicht-virale Liposome genutzt. Postnatal stellen allerdings die Mukusschicht, die MZR und die Immunreaktion der Lunge Abwehrmechanismen dar, die ein Eindringen von Erregern und damit auch von den für diesen therapeutischen Ansatz notwendigen Viren verhindern. Auch die Zellkernmembran selbst stellt vor allem für nicht-virale Träger wie Liposomen eine Hürde dar (Xia, Munegowda et al. 2014). Weil Viren aber durchaus Oberflächenproteine besitzen, um einige dieser Hürden zu überwinden, eignen sie sich als Grundträger für die zu übertragenden Gensequenzen (Griesenbach, Davies et al. 2016). Jedoch konnten bisher weder Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren, die mit humaner *CFTR*-komplementärer-DNA (cDNA; engl. *complementary desoxyribonucleic acid*) bestückt waren, noch Liposomen einen positiven Effekt in erwachsenen CF-PatientInnen zeigen (Xia, Munegowda et al. 2014). Erste vielversprechende Erfolge konnten mittlerweile bei Versuchen an neugeborenen CF-Schweinen erreicht werden. Bei diesen konnte die *CFTR*-Funktionalität in der Nase und der Lunge mittels eines Lentivirus, das *CFTR* in die Epithelzellen einschleust, teilweise wiederhergestellt werden (Cooney, Abou Alaiwa et al. 2016).

Eine *in utero* Gentherapie, die auf die beginnende pränatale Expression von *CFTR* abgestimmt ist, könnte ein vielversprechender Ansatz sein. Dadurch könnten möglicherweise auch Nebenwirkungen wie onkogenetische Effekte, die bei einer Gentherapie bei Erwachsenen auftreten können, verhindert werden (Larson und Cohen 2005). Hierzu muss jedoch das pränatale Expressionsmuster von *CFTR* inklusive des exprimierenden Zelltyps bekannt sein, um einen geeigneten Zeitpunkt zum Beginn einer solche Therapie zu bestimmen.

2.4.4 Weitere Therapieansätze

Ein weiterer Ansatz, die *CFTR*-Dysfunktion zu beheben, ist es, andere Ionenkanäle anzusprechen. Hierzu gehört der Natriumkanal ENaC, der schon in der Pathophysiologie der CF eine Rolle zu spielen scheint (siehe 2.3.3 und 2.3.5). ENaC wird neben Lunge und Darm auch in großer Menge in der Niere exprimiert. Therapeutika, die auf ENaC basieren, sollten daher selektiv in der Lunge wirken, um unerwünschte Nebenwirkungen im Bereich der Nieren zu reduzieren. Bisher sind zwar verschiedene Moleküle, die die gesteigerte Natriumreabsorption in der Lunge blockieren, getestet worden, jedoch hat keines davon bisher Markt-

reife erlangt (Moore und Tarran 2018). Am vielversprechendsten sind hier Antisense Oligonukleotide (ASO) – chemisch modifizierte RNA-ähnliche Moleküle. Diese werden in den Zellkern geschleust und binden dort an die entsprechende mRNA, in diesem Fall ENaC. Dadurch wird aus der normalerweise einzelsträngigen mRNA ein Doppelstrang, der nicht weiter prozessiert werden kann. In CF-Mäusen konnten solche ASO die ENaC-Expression reduzieren und somit auch den CF-Phänotyp der Mäuse signifikant verbessern (Crosby, Zhao et al. 2017; Christopher Boyd, Guo et al. 2020).

2.4.5 Soziale Aspekte bei der Therapie der CF

Um eine gute Kooperation des CF-PatientInnen bei der Behandlung zu erreichen, spielen auch psychosoziale und ökonomische Hürden eine große Rolle. Aufgrund der lebenslangen Behandlung, die regelmäßig überprüft und angepasst werden muss, wirken sich Faktoren wie hohe Behandlungskosten, häufige Klinikaufenthalte und zunehmend schlechtere Lebensqualität durch die progressiven Lungenveränderungen dabei negativ auf die Kooperationsbereitschaft aus (Sawicki, Ren et al. 2013). Dabei konnten Salvatore und KollegInnen 2002 zeigen, dass die Schwere der CF-Lungenveränderungen auch von Faktoren wie dem Alter der PatientInnen zu Therapiebeginn, den angewandten Behandlungsschemata und der Kooperation der PatientInnen bei der Behandlung abhängen (Salvatore, Scudiero et al. 2002).

Um die Lebensqualität langfristig deutlich zu verbessern, sollte eine Therapie mit Medikamenten, die die Funktionalität von CFTR wiederherstellen, so früh wie möglich begonnen werden. So können pathologische Veränderungen in den betroffenen Organen eventuell verhindert bzw. auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden (Lopes-Pacheco 2019). Dafür werden, wie oben beschrieben, verschiedene Therapieansätze, wie eine intrauterin wirksame Medikamentengabe oder das Einschleusen modifizierter Viren in CF-Tierfeten verfolgt, um die Funktionalität von CFTR im Gewebe wiederherzustellen. Um den besten Zeitpunkt für eine solche intrauterine Therapie zu finden, sind genaue Kenntnisse der zeitspezifischen Expression von *CFTR* notwendig. Da diese beim Menschen jedoch nur punktuell vorliegen, muss für eine systematische Forschung auf Modelltiere zurückgegriffen werden. Modelltiere bieten die Möglichkeit, durch gentechnische Modifikationen auch CF-Mutationen abzubilden, die nur sehr selten beim Menschen vorkommen. Solche seltenen CF-Mutationen werden bei der heutigen Suche nach neuen Therapeutika bislang kaum beachtet (Lopes-Pacheco 2019).

2.5 Tiermodelle für CF

Tiermodelle sind neben Zellkultursystemen ein unerlässlicher Teil sowohl der CF-Grundlagenforschung als auch der Testung von neuartigen Therapieansätzen zur Behandlung der CF. Wenn es um Fragestellungen geht, die komplexe Organe und zelluläre Interaktionen betreffen, wie der Organentwicklung, sind Tiermodelle Zellkultursystemen vorzuziehen.

Der Begriff Tiermodell bezieht sich dabei auf Zuchtlinien von Tieren, die spontan oder durch eine gezielte Behandlung genetisch so verändert wurden, dass sie die zu untersuchenden Erkrankungen ausprägen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, CF-Tiermodelle zu entwickeln. Eine besteht darin, das *CFTR*-Gen durch einen Ersatz der Gensequenz vollständig auszuschalten, wodurch sogenannte *CFTR-knockout*-Tiere (*CFTR*^{-/-}) entstehen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch Einfügen weiterer Sequenzen Modelltiere mit einer drastisch reduzierten Menge aktiver *CFTR*-mRNA zu generieren (Davidson und Dorin 2001; Scholte, Davidson et al. 2004). Außerdem lassen sich Tiermodelle designen, die bestimmte Mutationen des *CFTR*-Gens aufweisen, die so beim Menschen ebenfalls vorkommen (Delaney, Alton et al. 1996). Als neueste Methode für die Erzeugung von CF-Tiermodellen wird das CRISPR/Cas9-Verfahren genutzt (Fan, Perisse et al. 2018; McHugh, Steele et al. 2018), das im Gegensatz zu den früheren Methoden eine deutlich kürzere Zeit benötigt, um eine Tiergruppe zu generieren.

Als CF-Modelltiere wurden bisher vor allem Mäuse, aber auch Ratten, Frettchen, Schafe und Schweine eingesetzt. Bei der folgenden Betrachtung verschiedener CF-Modelltiere wird auf die Maus, als häufigstes genutztes Modelltier, sowie auf das Schwein eingegangen, das als großrahmiges Tier vor allem für die Etablierung von Behandlungsmethoden Vorteile bietet.

Verschiedene CF-Modelltierarten und CF-Zuchtlinien entwickeln teilweise schwächere oder stärkere klinische Symptome im Vergleich zum Menschen. Damit sich ein Modelltier für die Erforschung der CF eignet, müssen sowohl anatomische Gegebenheiten, klinische Veränderungen als auch die Expressionsmuster von *CFTR* in den betroffenen Organen weitestgehend mit denen des Menschen übereinstimmen. Im Folgenden wird bei diesem Vergleich auf die beiden Organsysteme eingegangen, die die schwerwiegendsten Veränderungen beim Menschen ausmachen – der untere Respirationstrakt, bestehend aus Trachea und Lunge, sowie der Dickdarm.

2.5.1 CF-Mausmodelle

Die Maus stellt das klassische Modelltier dar, das für die Erforschung einer Vielzahl an Erkrankungen genutzt wird, so auch die CF. Seit der ersten Generierung eines CF-Mausmodells bereits drei Jahre nach Entdeckung des *CFTR*-Gens wurde bis heute eine Vielzahl an CF-Mausmodellen generiert. Es besteht eine etwa 78%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des murinen *Cftr*-Proteins (mCftr) im Vergleich zum Menschen (Lavelle, White et al. 2016). CF-Mäuse weisen im Respirationstrakt eine CF-typische Hyperabsorption von Natriumionen sowie eine Reduktion bzw. ein Fehlen einer cAMP-vermittelten Chloridionensekretion auf (Knowles, Stutts et al. 1983). Trotzdem treten bei keiner dieser CF-Mäuselinien spontane Lungenentzündungen auf, wie sie typisch für die CF des Menschen sind (Dorin, Dickinson et al. 1992; Snouwaert, Brigman et al. 1992; Ratcliff, Evans et al. 1993; Hasty, O'Neal et al. 1995; van Doorninck, French et al. 1995; Delaney, Alton et al. 1996; Kent, Oliver et al. 1996). CF-typische Lungenentzündungen in CF-Mäusen konnten ausschließlich durch wiederholte Exposition der Mäuse mit z.B. *Staphylococcus aureus* hervorgerufen werden. In diesen sogenannten *challenge*-Studien konnten auch bei CF-Mäusen einige CF-typische Veränderungen hervorgerufen werden, wie eine verringerte MZR, eine Hyperinflation von Alveoli, parenchymatöse Verbreiterung des Interstitiums mit Nachweis von Fibrose und Häufung von Immunzellen, Becherzell-Hyperplasie, Mukusstau und Bronchiolitis (Davidson, Dorin et al. 1995; Kent, Iles et al. 1997; Guilbault, Martin et al. 2005; Guilbault, Novak et al. 2006). Eine Ursache für das Fehlen spontaner Lungenentzündungen bei CF-Mäusen ist wahrscheinlich die zusätzliche Expression von CaCC. Diese scheinen den fehlenden CFTR-vermittelten Chloridionentransport in einem hinreichenden Maße auszugleichen (Grubb und Boucher 1999; Ousingsawat, Martins et al. 2009; Rock, O'Neal et al. 2009). Hierfür spricht, dass in einem CF-Mausmodell, in dem CaCC fehlte, auch spontan Lungenentzündungen auftreten können, auch wenn die Tiere in spezieller, pathogenfreier Umgebung gehalten wurden (Clarke, Grubb et al. 1994).

In einem anderen Mausmodell wiesen Mäuse, die die β -Untereinheit von ENaC überexprimierten, ebenfalls CF-typische Veränderungen auf. Diese Mäuse spiegelten die bei CF-PatientInnen typische gesteigerte Na^+ -Absorption in den luftführenden Wegen wider. Die dadurch reduzierte Höhe der Solschicht des Mukus führte auch in diesen Mäusen, ähnlich wie bei Menschen mit CF, zu einer reduzierten MZR, Obstruktionen durch Mukus, Hyperplasie von Becherzellen und chronischen Lungenentzündungen (Mall, Grubb et al. 2004; Zhou, Duerr et al. 2011).

Der gastrointestinale Phänotyp scheint das Hauptsymptom bei den Tieren der meisten CF-Mausmodelle zu sein (Snouwaert, Brigman et al. 1992; Guilbault, Saeed et al. 2007). In den meisten CF-Mausmodellen können eine Akkumulation von Mukus in den Lieberkühnschen

Krypten und deren Dilatation, eine Hyperplasie von Becherzellen und eine Hyperplasie der Epithelien nachgewiesen werden, die in Summe zu einer Obstruktion bis hin zur Ruptur des Darms führen können (Snouwaert, Brigman et al. 1992; Hasty, O'Neal et al. 1995; van Doorninck, French et al. 1995; Delaney, Alton et al. 1996). Die pathologischen Veränderungen finden sich im gesamten Darmtrakt, scheinen jedoch in Richtung distal zuzunehmen. Das zeigt sich auch darin, dass bei den CF-Mäusen die Abschnitte ab dem Ileum am häufigsten von intestinalen Obstruktionen und Rupturen betroffen sind (Grubb und Boucher 1999). Die klinischen Symptome sind häufig so schwerwiegend, dass viele CF-Mäuse innerhalb der ersten fünf Lebensstage versterben (Ratcliff, Evans et al. 1993). Eine Verbesserung der Überlebensrate von CF-Mäusen und damit die Möglichkeit der Beobachtung der Langzeiteffekte der CF-Lungenveränderungen wurde durch die spezifische Expression von humaner *CFTR*-cDNA im Darmtrakt der Mäuse erreicht (Zhou, Dey et al. 1994; De Lisle und Borowitz 2013). Auch der Ionentransport durch die Darmschleimhaut ist bei den CF-Mäusen in ähnlicher Weise wie beim Menschen verändert. Das betrifft vor allem den gestörten cAMP-vermittelten Chloridionentransport (Grubb und Boucher 1999).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Veränderungen fanden sich bei fünf Monate alten CF-Mäusen auch strukturelle Veränderungen der Trachea, die ähnlich denen beim Menschen sind. Diese Mäuse wiesen dabei eine Einengung der kranialen Tracheaabschnitte auf, die mit diskontinuierlichen Knorpelspangen assoziiert waren. Bei dieser CF-Mauslinie traten jedoch kaum Veränderungen in der Lunge auf (Bonvin, Le Rouzic et al. 2008).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei CF-Mäusen der gastrointestinale Phänotyp dominiert. Hier sind die Veränderungen häufig so schwer, dass die Cf-Mäuse innerhalb der ersten Lebensstage versterben. Das prädisponiert die Maus für die Erforschung CF-typischer Darmpathologien, schränkt jedoch deren Nutzung für die Erforschung der CF-typischen progressiven Lungenentzündungen deutlich ein. Zusätzlich entwickeln CF-Mäuse mit Mutationen im *Cftr*-Gen keine spontanen Lungenentzündungen.

2.5.2 CF-Schweinemodelle

Ein vielversprechendes Modelltier zur Untersuchung der CF-typischen Lungenveränderungen stellt das Schwein dar. Schweine weisen eine 92%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von pCFTR mit hCFTR des Menschen auf (Ostedgaard, Meyerholz et al. 2011). Wie beim Menschen mit CF tritt bei CF-Schweinen eine Hyperabsorption von Natrium sowie eine Reduktion bzw. ein Fehlen einer cAMP-vermittelten Chloridionensekretion im Respirationsstrakt auf (Knowles, Stutts et al. 1983).

Wenige Monate alte CFTR^{-/-}-Schweine entwickelten Lungenveränderungen, wie Obstruktionen der Luftwege, aufgrund von Mukusakkumulationen und Lungenentzündungen. Die Schwere dieser Lungenentzündungen schwankte dabei zwischen den einzelnen CFTR^{-/-}-Schweinen und waren teilweise schwerer als die Lungenentzündungen bei Menschen mit CF (Stoltz, Meyerholz et al. 2010; Wine 2010). Histologisch fanden sich in den entzündeten Lungenbereichen, wie beim Menschen mit CF, vor allem neutrophile Granulozyten und multifokale, mit Mukus obstruierte Lungenabschnitte (Stoltz, Meyerholz et al. 2010; Stoltz, Rokhlina et al. 2013). Ähnliche Lungenveränderungen wurden auch bei CF-Schweinen gefunden, die noch eine geringe Restaktivität von CFTR von ca. 6 % im Vergleich zu den Wildtyp (WT)-Schweinen hatten. Eine so geringe Restaktivität scheint demnach nicht die Entwicklung von Lungeninfekten zu verhindern (Ostedgaard, Meyerholz et al. 2011). Auch in Bereichen der Lunge, die keine Entzündungsreaktionen aufweisen, finden sich bei CFTR^{-/-}-Schweinen Ansammlungen von Mukus. Die Menge der Mukusansammlungen reicht dabei von einer dünnen Schicht, die wie eine zusätzliche Membran die Luftwege auskleidet, bis zum vollständigen Verlegen von Luftwegen mit konsekutiver Atelektase des angrenzenden Lungengewebes (Stoltz, Rokhlina et al. 2013). In größeren Luftwegen weist das Epithel, ähnlich wie bei CF-PatientInnen, multifokale Hyperplasien der Becherzellen und mukusgefüllte Gänge der SMD auf (Stoltz, Rokhlina et al. 2013).

Bei neugeborenen CFTR^{-/-}-Schweinen fanden sich hingegen keine pathologischen Veränderungen der Lunge. Jedoch konnten mittels bronchioalveolärer Lavage bereits eine Vielzahl an verschiedenen Bakterien, unter anderem *Staphylococcus aureus*, in den Luftwegen nachgewiesen werden (Rogers, Stoltz et al. 2008; Stoltz, Meyerholz et al. 2010). Zusätzlich lagen Obstruktionen der luftführenden Wege bei neugeborenen CF-Schweinen vor (Adam, Michalski et al. 2013). Hoegger und KollegInnen untersuchten 2014 mittels CT die MZR bei neugeborenen CF-Schweinen. Die Tiere wiesen einen deutlich langsameren Transport von Partikeln in den luftführenden Wegen auf, was auf die zähe Viskosität des Mukus bei CF zurückgeführt wurde (Hoegger, Awadalla et al. 2014).

Alle neugeborenen CFTR^{-/-}-Schweine entwickeln einen Mekoniumileus, ähnlich wie bei neugeborenen Menschen mit CF (Rogers, Stoltz et al. 2008; Welsh, Rogers et al. 2009; Meyerholz, Stoltz et al. 2010; Stoltz, Meyerholz et al. 2010; Klymiuk, Mundhenk et al. 2012; Olivier, Gibson-Corley et al. 2015). Dieser schränkte die Nutzbarkeit dieses Modelltieres deutlich ein. Obwohl die Überlebensrate bei CF-Schweinen durch Ileostomie oder Zäkostomie, die den Mekoniumileus beheben, deutlich verbessert wurde, mussten 60 % dieser Ferkel aufgrund von Ulzerationen in einem Alter von 2–4 Monaten euthanasiert werden (Stoltz, Meyerholz et al. 2010; Wine 2010; Olivier, Gibson-Corley et al. 2015). Stoltz und KollegInnen entwickelten daraufhin 2013 ein Darm-korrigiertes CFTR^{-/-}-Schwein, das porzines CFTR-

Protein selektiv im Darm exprimiert. Bei diesem CF-Modelltier scheinen ca. 20 % Restaktivität von CFTR hinreichend zu sein, um den Mekoniumileus zu verhindern. Diese Tiere entwickeln dann CF-typische Symptome in anderen Geweben, wie Pankreas, Leber und Lunge, und sind in ihrer körperlichen Entwicklung häufig reduziert (Stoltz, Rokhlina et al. 2013).

Zusätzlich fanden sich bei neugeborenen CF-Schweinen ebenfalls strukturelle Veränderungen der Trachea. Diese wies einen verengten proximalen Anteil und abnormal ausgerichtete, verdickte Stränge der glatten Trachealmuskulatur auf. Die veränderten Muskelstränge zogen sich bis in die Bronchien. Daneben fanden sich Defekte der Knorpelspangen, die häufig unterbrochen waren und der Knorpel selbst schien verdickt (Meyerholz, Stoltz et al. 2010; Klymiuk, Mundhenk et al. 2012; Stoltz, Rokhlina et al. 2013). Mittels CT wurden bei neugeborenen CF-Schweinen Verdickungen der Luftwege in den Lungen nachgewiesen. Diese schienen histologisch mit der verdickten glatten Muskulatur der Trachea assoziiert zu sein (Meyerholz, Stoltz et al. 2010).

Die Möglichkeit der operativen oder genetischen Korrektur des Mekoniumileus verbesserte die Eignung des Schweins als CF-Modelltier in einem hohen Maße. Darmkorrigierte CF-Schweine weisen strukturelle Lungenentzündungen wenige Monate nach der Geburt auf und entwickeln spontane Lungenentzündungen, die denen von CF-PatientInnen gleichen. Damit sind CF-Schweinemodelle für die weitere Erforschung vor allem der CF-typischen Lungenveränderungen besonders geeignet.

2.6 CFTR und seine mögliche Rolle in der Organentwicklung des Respirationstrakts

Die Ergebnisse der CFTR-Forschung geben immer wieder Hinweise darauf, dass CFTR direkt oder indirekt eine Rolle in der Organogenese spielen könnte. Die zeitabhängige Expression von *hCFTR* mit einer deutlich höheren Expression in der fetalen Lunge im Vergleich zur Lunge von Erwachsenen und einer erhöhten Expression in der fetalen Lunge im zweiten Trimenon, geben Hinweise auf einen Mehrbedarf an CFTR und damit einer Rolle in der Organentwicklung zu spezifischen Zeitpunkten (McGrath, Basu et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Bergougnoux, Rivals et al. 2014).

Daneben geben auch verschiedene Tiermodelle Hinweise darauf, dass CFTR bestimmte Aspekte der Organentwicklung beeinflusst. Für Studien an WT-Tieren wird häufig der *in utero* Transfer von *CFTR*-Sequenzen mittels Adenoviren genutzt, um eine Überexpression von *CFTR* herbeizuführen und dessen Auswirkung zu untersuchen. In solchen Versuchen konnte in Lungen von WT-Rattenfeteten nach einer solchen Applikation eine höhere Resistenz gegenüber Pneumonieerregern in denselben Ratten bis drei Monate nach der Geburt nachge-

wiesen werden. Dies kann auf eine länger anhaltende funktionale Änderung bei den Epithelzellen der Lunge hinweisen (Morrow, Larson et al. 1998). Morphologische Veränderungen der Epithelzellen der Lunge wie Epithelzellproliferationen konnte in WT-Mäusefeteten durch die *in utero* Applikation von *Cftr* ausgelöst werden. Dabei schienen die Epithelzellen weiter differenziert zu sein als bei gleichalten WT-Mäusefeteten der Kontrollgruppe (Larson, Delcarpio et al. 2000). Einen ähnlichen Effekt konnten Larson und KollegInnen 2000 bei Feteten von Rhesusaffen nachweisen. Dabei waren die Alveoli von *in utero* *CFTR*-behandelten Rhesusaffenfeteten am 140. GT deutlich weiter ausgereift als bei den gleichalten Kontrolltieren (Larson, Morrow et al. 2000). Warum das Fehlen von CFTR in der CF im Umkehrschluss nicht zu einer weniger ausgereiften Lunge führt, ist nicht vollständig untersucht (Larson, Delcarpio et al. 2000).

Die bereits beschriebenen strukturellen Veränderungen bei neugeborenen Menschen und Säuglingen mit CF, die mit kaum oder gar keinen klinischen Symptomen einher gehen (siehe 2.1.2 und 2.1.3), sind dabei ein weiterer Hinweis darauf, dass CFTR möglicherweise eine Rolle in der Organentwicklung spielt. Diese strukturellen Veränderungen finden sich vor allem im unteren Respirationstrakt und führen hier z. B. zu einem geringeren Durchmesser der Trachea (Meyerholz, Stoltz et al. 2010). In den luftführenden Wegen der Lunge konnte eine Wandverdickung nachgewiesen werden, die mit teils klinisch apparenten Symptomen, wie einer reduzierten Lungenfunktion, teils klinisch inapparenten Symptomen, wie ersten Entzündungsreaktionen, einhergehen (Sly, Brennan et al. 2009). Dass diese strukturellen Veränderungen bereits in der Organentwicklung entstehen und nicht sekundär aufgrund von Entzündungsreaktionen, erscheint wahrscheinlich. Dass Tracheomalazien zusammen mit schweren Mutationsformen der CF auftreten, bei denen nahezu keine Restaktivität des CFTR-Proteins vorliegt, spricht zusätzlich dafür, dass solche strukturellen Veränderungen auf das Fehlen von CFTR zurückzuführen sein könnten (Fischer, Singh et al. 2014). Die Theorie, dass strukturelle Veränderungen auch für klinische Symptome prädisponieren, wird zusätzlich durch den Nachweis von Pneumonieerregern in der Trachea vor dem Auftreten klinischer Entzündungssymptome unterstützt. Wenn sich diese Theorien bestätigt, besteht die Hoffnung, dass sich durch eine Korrektur der strukturellen Veränderungen, z. B. durch eine *in utero* Gentherapie, die klinischen Veränderungen abmildern oder zumindest das Auftreten dieser Veränderungen zeitlich verzögern lassen.

3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsaufbau

Bei der Zystischen Fibrose sind progressive Lungenentzündungen die bekannteste und bedeutsamste Manifestationsform sowie die häufigste Todesursache. Auch mehr als 30 Jahre nach der Entdeckung, dass Mutationen im *CFTR*-Gen die Ursache dieser vererbaren Erkrankung sind, sind viele Aspekte dieser multisystemischen Erkrankung nicht vollständig verstanden. Zum Beispiel ist der Einfluss der Mutationen des *CFTR*-Gens auf die fetale Organentwicklung bisher ungeklärt. Bei Neugeborenen mit CF treten bereits strukturelle Veränderungen und funktionelle Einschränkungen im Atmungstrakt auf, bevor es zu den charakteristischen Entzündungen kommt. Es wird vermutet, dass diese angeborenen Veränderungen ebenfalls auf Mutationen im *CFTR*-Gen zurückzuführen sind und das Protein pränatal seiner möglichen Funktion bei der Entwicklung von Organen nicht nachkommen kann. Erste Untersuchungen beim Menschen weisen darauf hin, dass CFTR ein typisches pränatales Expressionsprofil im Atmungstrakt zeigt, was auf die Bedeutung des Proteins *in utero* untermauert und ein mögliches Ziel für alternative Therapieansätze darstellt.

CF-Schweine scheinen sich von den bisher untersuchten Modelltieren am besten für den Vergleich mit dem Menschen zu eignen, da sie u. a. die typischen Pathologien im Atmungstrakt schon bei der Geburt aufweisen und später ebenfalls progressive Lungenentzündungen entwickeln. Um das Schwein auch bei der Erforschung der Rolle von CFTR bei der Organogenese nutzen zu können, ist es in einem ersten Schritt notwendig, die Expression von pCFTR bei Wildtyp-Schweinen in der fetalen Phase zu charakterisieren und für translationale Aspekte mit der Expression von hCFTR bei gesunden menschlichen Feten zu vergleichen. Hierzu fehlen jedoch systematische Untersuchungen bei Feten von WT-Schweinen, aus denen sich detaillierte Aussagen über den Verlauf der fetalen *pCFTR*-Expression mit Vergleichen zum Menschen ableiten lassen.

Arbeitshypothese: Die porzine *CFTR*-Expression weist in der pränatalen Entwicklung von Trachea, Lunge und Darm von Wildtyp-Schweinen stadien- und gewebespezifische Veränderungen auf.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Primersysteme für eine Reverse Transkriptase Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR, engl. *reverse transkriptase quantitative-polymerase chain reaction*) etabliert, die die mRNA-Expression von porzinem *CFTR* während der porzinen Organentwicklung des Respirationstrakts und des Dickdarmes nachweisen soll. Ergänzend dazu wurde die Expression von porzinem *SCNN1B*, welches eine Rolle in der

Pathogenese der CF zu spielen scheint, sowie des *porzine chloride channel regulator, calcium-activated-1* (pCLCA1) als Marker für Becherzellen (Plog, Mundhenk et al. 2009) und des *pCLCA4a* als Marker für respiratorische und intestinale Epithelzellen, die keine Becherzellen sind (Plog, Grotzsch et al. 2012), auf dieselbe Weise untersucht. Um eine Identifikation der exprimierenden Zelltypen zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung für pCFTR und pSCNN1B etabliert. Für diese systematischen Untersuchungen wurden jeweils mehrere WT-Schweinefeten zu definierten Zeitpunkten der Trächtigkeit (37., 45., 56., 64., 71., 85. und 98. Gestationstag) sowie neugeborene WT-Ferkel und adulte WT-Sauen untersucht.

Durch diese Untersuchungen sollte ein besseres Verständnis der fetalen *CFTR*-Expression und dessen möglichen Zusammenhang mit wichtigen Entwicklungsstufen der Organentwicklung von Trachea, Lunge und Darm in Wildtyp-Schweinen ermöglicht werden. Anhand des Vergleichs mit bekannten Daten zur fetalen Expression von *hCFTR* beim Menschen sollte außerdem die Eignung des Schweins als Modelltier auch für die systematische Erforschung von CFTR in fetalen Geweben überprüft werden.

4 Material und Methoden

Die Untersuchungen der Sauen und deren Nachkommen nach dem Töten zum wissenschaftlichen Zwecke wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, Berlin durchgeführt (Genehmigungsnummer: T0344/11). Die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe, Chemikalien, Verbrauchsgegenstände und Geräte finden sich unter Angabe des Herstellers im Anhang (siehe 12.2).

4.1 Studiendesign und Tiere

Wie bereits beschrieben, weist die Lunge des Menschen einige Besonderheiten in der Expression von *CFTR* auf. So ist sie das einzige Organ, in dem die *CFTR*-Expression beim Menschen während der fetalen Entwicklung schwankt. Es findet sich eine steigende *CFTR*-Expression im zweiten Trimenon, die am Ende des zweiten Trimenons in der 24. SSW ihren Höhepunkt hat und bis zur Geburt wieder abfällt. Um diesen Expressionsverlauf auch für das Schwein zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die ersten Feten zum Ende des ersten Trimenons untersucht, gefolgt von weiteren Probenzeitpunkten alle ein bis zwei Wochen über das gesamte zweite und dritte Trimenon hinweg. Zusätzlich zeigte sich in der Lunge des Menschen eine geringere Expressionshöhe bei Erwachsenen als bei Feten. Bei den meisten anderen Organen ist dies umgekehrt, hier findet sich eine höhere Expression bei Erwachsenen im Vergleich zu Feten. Um zu untersuchen, ob dieser Sachverhalt auch beim Schwein beobachtet werden kann, wurden zusätzlich zu den fetalen Entwicklungsstadien auch neugeborene Ferkel und adulte Sauen untersucht.

Acht Sauen mit gleichem genetischen Hintergrund (Hybrid x Deutsche Landrasse) wurden im Alter von 14 Monaten synchron fertilisiert. Am 37., 45., 56., 64., 71., 85. und 98. GT wurden sieben dieser Sauen durch die Mitarbeiter der Klauentierklinik der Freien Universität Berlin zunächst anästhesiert (je 8 ml Azaperon und 30 ml Ketamin pro Tier) und anschließend durch intravenöse Applikation von Phenobarbital (30 ml pro Tier) euthanasiert. Diese Medikation ermöglicht eine zuverlässige und stressfreie Euthanasie auch der Feten *in utero* (Kietzmann 2003). Die Ferkel der achten Sau wurden auf natürlichem Wege geboren und 24 Stunden postnatal ebenfalls durch die Mitarbeiter der Klauentierklinik der Freien Universität Berlin mittels intravenöser Applikation von 0,1 ml Azaperon und 0,5 ml Ketamin pro Tier zunächst anästhesiert und anschließend mittels Applikation von Embutramid (1 ml pro Tier)

euthanasiert. Die achte Sau selbst verblieb im Bestand der Klautierklinik der Freien Universität Berlin.

Nach dem Eröffnen des Uterus wurden die Feten der Sauen eins bis sieben mit ihren Fruchthüllen entnommen. Die Fruchthüllen wurden entfernt, die Scheitelsteißlänge (SSL) der Feten, von der Scheitelkrone bis zum Ende des Steißes reichend, gemessen und ihr Gewicht bestimmt. Die Feten wurden für zwei verschiedene Konservierungsmethoden, Kryokonservierung und Formalinfixierung, vorgesehen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass eine ausgewogene Geschlechterverteilung vorlag. Es wurden jeweils mindestens zwei weibliche und zwei männliche Tiere pro Zeitpunkt für die Formalinfixierung bzw. Kryokonservierung weiterbearbeitet. Anschließend wurden die Körperhöhlen der Feten eröffnet, um die benötigten Proben zu entnehmen. Die auf natürlichem Wege geborenen Ferkel der achten Sau wurden nach der Euthanasie eröffnet und die benötigten Proben entnommen. Hier stammten die Proben für die beiden Konservierungsmethoden jeweils aus demselben Tier. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Sauen, neugeborenen Ferkeln und Feten mit deren SSL und Gewichten finden sich im Anhang (**Tabelle 21**).

Folgende Proben wurden von allen untersuchten Tieren entnommen und für die vorliegende Arbeit genutzt: Anteile der kranialen Trachea, kaudalen Trachea, bronchusreiche Anteile des Spitzenlappens, alveolarreiche Anteile des Hauptlappens (siehe **Abbildung 2**) und Anteile des Kolons der Schweinefeten (n=56), neugeborenen Ferkel (n=4) und Sauen (n=7). Diese Gewebeprobe wurden entweder in 4 % gepuffertem Formaldehyd für 24 Stunden fixiert oder in flüssigem Stickstoff schnellgefroren. Die schnellgefrorenen Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

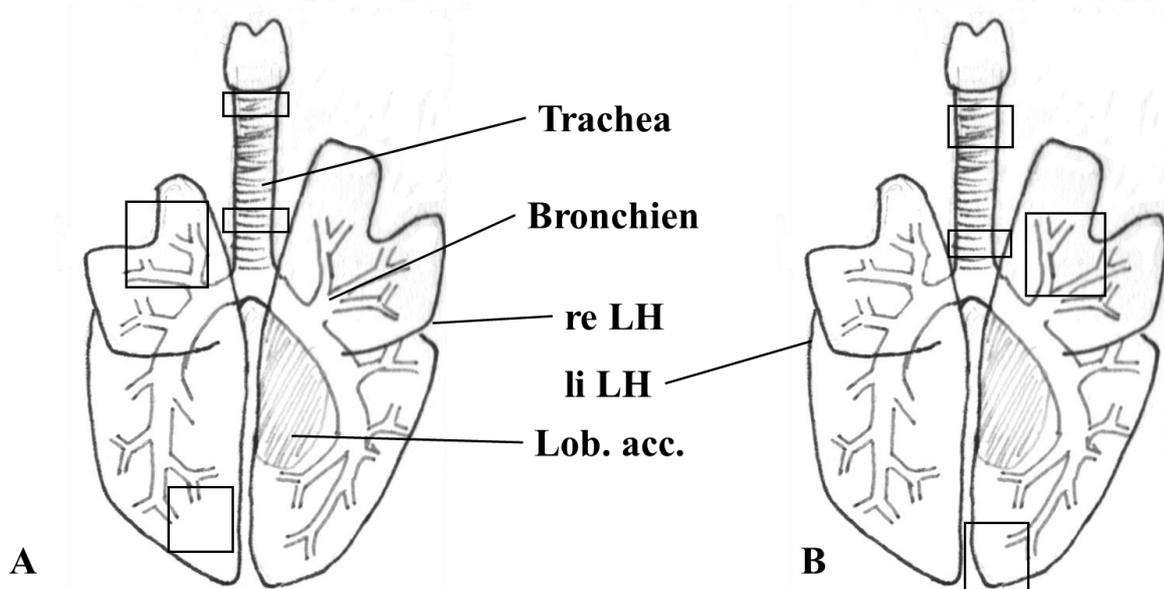


Abbildung 2: Schema der Probennahme an Trachea und Lunge.

A) Proben für Formalinfixierung für histologische und immunhistologische Untersuchungen.
 B) Proben für Kryokonservierung für RT-qPCR. re LH: rechte Lungenhälfte. li LH: linke Lungenhälfte. Lob. acc.: Lobus accessorius.

4.2 Eigenschaften der RNA und Extraktion der totalRNA

Die RNA dient der Zelle zur Übertragung von genetischen Informationen. Dazu wird sie als Einzelstrang von dem entsprechenden Genabschnitt transkribiert und kann, z. B. als Boten-RNA (mRNA, engl. *messenger RNA*), zur Proteinsynthese genutzt werden oder übernimmt als nichtkodierende RNA (non-coding RNA, ncRNA) in der Zelle unterschiedliche, meist regulative Aufgaben. Die Gesamtheit der RNA wird als totalRNA (*total ribonucleinacids*) bezeichnet. Die ncRNAs machen den größten Teil der totalRNA aus – z. B. 98 % beim Menschen (Mattick 2001). Im Gegensatz zur DNA beinhaltet mRNA keine Introns, ist in der Regel einzelsträngig und hat Uracil anstelle der Base Thymin.

Die totalRNA wurde aus den Gewebeproben mittels des NucleoSpin® RNA II Kit in Anlehnung an die Herstellerangaben extrahiert (Materialien, Geräte und Hersteller sind im Anhang in **Tabelle 23** angegeben). Das RNA-Extraktionsprotokoll ist in **Tabelle 1** detailliert aufgeführt. Die Gewebeproben wurden unter Einhaltung der Kühlkette so schnell wie möglich verarbeitet. Von diesen tiefgefrorenen Gewebeproben wurden jeweils 100 mg mittels einer Skalpellklinge „Figur 15“ gewonnen und grob zerkleinert. Die mechanische Homogenisierung erfolgte in Lysing Matrix D Tubes, die mit einigen Keramikugeln mit einem Durchmesser

von 1,4 mm gefüllt sind, mittels des PreCellys24 Homogenisators. Abweichend von den Herstellerangaben wurde eine erste Auftrennung von Gewebebestandteilen und der enthaltenen DNA und RNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durchgeführt (siehe **Tabelle 1** Schritt 3). Dadurch wurde eine höhere Ausbeute an DNA und RNA erreicht und das Extraktionsergebnis verbessert. In den nachfolgenden RNA-Aufreinigungsschritten wurden einzelne Mengenangaben im Vergleich zum Herstellerprotokoll in den Waschschrritten erhöht (siehe **Tabelle 1**, Schritt 8). Die so gewonnene, in RNase-freiem Wasser gelöste totalRNA wurde bis zur weiteren Nutzung in eindeutig beschrifteten Eppendorf Tubes (1,5 ml) bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 1: Protokoll der Extraktion der totalRNA. Angelehnt an das Protokoll des NucleoSpin® RNA II Kit.

Ziel des Schrittes	Durchführung des Schrittes
1. Lysieren I	100 mg Probe mit 700 µl RA1-Puffer des Kits und 7 µl β-ME in Lysing Matrix D Tubes (2 ml) geben 10 Minuten auf Eis kühlen
2. Homogenisieren	30 Sekunden bei 6800 rpm homogenisieren (PreCellys24) 10 Minuten auf Eis kühlen 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren (Heraeus Fresco21 centrifuge) Überstand ohne Gewebe in neues 2 ml Tube überführen
3. Herauslösen von DNA und RNA	700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugeben Gut Mischen 10 Minuten bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugieren 500 µl der oberen wässrigen Phase auf die Filter Säule des Kits geben 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren
4. Lysieren II und RNA-Bindung verbessern	200 µl RA1-Puffer des Kits, 2 µl β-ME und 700 µl 70%iges Ethanol des Kits zum Überstand geben und mischen
5. RNA binden	Gemisch in zwei Schritten auf die RNA II Säule des Kits geben Jeweils 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugieren
6. Silica-Membran entsalzen	700 µl MDB-Puffer des Kits auf die Säule geben 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren
7. DNA auflösen	90 µl DNase rxn Puffer des Kits und 10 µl MN DNase des Kits 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

Fortsetzung Tabelle 1: Protokoll der Extraktion der totalRNA. Angelehnt an das Protokoll des NucleoSpin® RNA II Kit

Ziel des Schrittes	Durchführung des Schrittes
8. Waschen und trocknen der Membran	200 µl RA2-Puffer des Kits auf die Säule geben 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugieren 600 µl RA3-Puffer des Kits auf die Säule geben 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugieren 600 µl RA3-Puffer des Kits auf die Säule geben 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugieren 250 µl RA3-Puffer des Kits auf die Säule geben 3 Minuten bei 13.000 x g zentrifugieren Flüssigkeit verwerfen 3 Minuten bei 13.000 x g zentrifugieren
9. RNA eluieren	Die Säule in ein neues 1,5 ml Tube stellen 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben 1 Minute inkubieren 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren

Die totalRNA befindet sich nun in der Flüssigkeit. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

β-ME: β-Mercaptoethanol

4.3 Konzentrationsmessung der totalRNA

Die Konzentration der aufgereinigten totalRNA wurde direkt nach der Extraktion mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer quantifiziert (Materialien, Geräte und Hersteller sind im Anhang in **Tabelle 24** angegeben). Das Gerät misst das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen von 220–350 nm. Um zwischen dem verwendeten Lösungsmittel, in dem die totalRNA gelöst ist, und der extrahierten totalRNA zu unterscheiden, wurde vor jeder Messung ein Nullpunkt (*blank measurement*) festgelegt. Hierfür wurde das Gerät mittels 2 µl RNase-freien Wassers kalibriert. Im Anschluss wurden jeweils 2 µl der zu untersuchenden Proben auf den Probenhalter pipettiert und gemessen. Neben der Konzentration (ng/µl) wurden auch zwei Quotienten bei definierten Wellenlängen (A260/280 und A260/230) ermittelt. Diese beiden Quotienten erlauben eine einfache Kontrolle auf Verunreinigungen mit Phenol (A260/280) und organischen Substanzen (A260/230). Dabei wird bei einem A260/280-Quotienten um 2,0 und einem A260/230-Quotienten zwischen 2,0 und 2,2 von einer sehr reinen RNA-Lösung ausgegangen, die nur minimale Verunreinigungen durch Proteine ent-

hält. Bei den Proben in dieser Arbeit lag der A260/280-Quotient zwischen 1,9 und 2,2 und der A260/230-Quotient zwischen 1,81 und 2,27.

4.4 Qualitative Kontrolle der totalRNA

Zusätzlich zur einfachen Qualitätskontrolle durch das NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer wurden repräsentative Proben zusätzlich durch die Ermittlung der *RNA integrity number* (RIN) qualitätskontrolliert (Materialien, Geräte und Hersteller sind im Anhang in **Tabelle 24** angegeben). Diese Messung wurde durch Frau Jana Enders aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Hierfür wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer des Instituts für Veterinärphysiologie der Freien Universität Berlin und das zugehörige RNA 6000-Nano-LabChip-Kits genutzt. Der Bioanalyzer arbeitet mit dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, wobei in einem elektrischen Feld die zu untersuchenden Proben über Mikrokanäle in eine Trennkapillare geleitet werden. In der Trennkapillare erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Probenkomponenten nach ihrer Fragmentgröße. Die RNA-Fragmente sind hierbei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die so ermittelte RIN liegt zwischen 1 und 10, wobei Proben mit einer RIN von 1 komplett degradiert sind und Proben mit einer RIN von 10 keine Degradierungen aufweisen. RIN-Werte über 5 werden als gute Qualität für eine RT-qPCR angesehen (Fleige und Pfaffl 2006). Die hier untersuchten Proben wiesen eine RIN zwischen 6,2 und 9,5 auf.

4.5 Reverse Transkription der totalRNA zu cDNA

Bei der reversen Transkription wird die totalRNA zu einer cDNA umgeschrieben. Bei hohen Temperaturen wird die Sekundärstruktur der totalRNA aufgelöst. Kurze Primersequenzen lagern sich an die RNA-Stränge an und dienen als Startpunkt für das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses lagert jeweils die komplementären Nukleotide an die RNA-Stränge an, wobei Arginin dabei an Uracil angelagert wird. Die so erhaltene, doppelsträngige cDNA kann als Probe in einer PCR oder RT-qPCR eingesetzt werden.

Grundlage für die Synthetisierung der cDNA ist die Konzentration der totalRNA. Da die Menge an Nukleotiden, Primern und Enzymen in den Reagenzien festgelegt ist, kann nur eine bestimmte Menge totalRNA in der Probe umgeschrieben werden. Die maximale Menge, die mit einem Kit-System in einem Reaktionsvolumen umgeschrieben werden kann, wird jeweils vom Hersteller angegeben. Bei dem hier verwendeten iScript cDNA Synthesis Kit sind das bis zu 1 µg in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, wobei die zu analysierende Produktgröße unter 1000 bp liegen sollte (Materialien, Geräte und Hersteller sind im Anhang in **Tabelle 24**

angegeben). In dieser Arbeit wurden jeweils 2 µg totalRNA jeder Probe in einem Reaktionsvolumen von 40 µl nach Herstellerangaben zu cDNA transkribiert. Der Ansatz mit 40 µl stellt dabei einen doppelten Ansatz dar, um genug Ausgangsmaterial für die anschließende RT-qPCR zur Verfügung zu haben. Die Zusammensetzung des doppelten Ansatzes findet sich in **Tabelle 2**. Die Proben wurden mittels des T3000 Thermocycler umgeschrieben. Das Temperaturprotokoll für die Synthetisierung der cDNA ist in **Tabelle 3** dargestellt. Die transkribierte cDNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2 Reagenzienmix zum Umschreiben der totalRNA mittels iScript cDNA Synthesis Kit.

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
5x iScript <i>reaction mix</i>	8 µl
iScript <i>reverse transcriptase</i>	2 µl
Nuclease-freies Wasser	Menge je nach Volumen der eingesetzten Probe
Probe totalRNA (2 µg)	Abhängig von Konzentration der totalRNA
Gesamtvolumen pro Probe	40 µl

Tabelle 3 Temperaturprotokoll für das Umschreiben von totalRNA zu cDNA mittels iScript.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Anlagerung der Primer	5 Minuten	25 °C
2. Transkription	30 Minuten	42 °C
3. Enzymaktivierung	5 Minuten	85 °C
4. Kühlung bis zur Entnahme	∞	4 °C

4.6 Funktionsweise der PCR und RT-qPCR

Die Reverse Transkriptase Quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) stellt eine Erweiterung der normalen PCR dar und läuft prinzipiell genauso wie diese ab. Als zu untersuchende Probe wird DNA benötigt, wobei in der vorliegenden Arbeit cDNA verwendet wurde. Die RT-qPCR ist wie die PCR in die Arbeitsschritte Denaturierung, Annealing und

Elongation unterteilt. Während des Denaturierungsschrittes werden die Doppelstränge der cDNA durch starkes Erhitzen auf 95 °C denaturiert und so voneinander getrennt (Schadendorf und Czarnetzki 1991). Die im Überschuss im Mastermix enthaltenen Primer können nach dem Abkühlen auf eine Primer-abhängige Temperatur an die komplementären Stränge anhaften (Annealing). Die angelagerten Primer dienen als Startpunkt für die thermostabile *Thermus aquaticus*-Polymerase (*Taq*-Polymerase). Durch Erhöhung auf die optimale Temperatur der *Taq*-Polymerase von 72 °C werden die Primer während der Elongation verlängert. Auf diese Weise werden mit jedem Zyklus (*Cycle*) von Erhitzen und Abkühlen die enthaltenen Kopien des gesuchten cDNA-Abschnittes verdoppelt. Nach einer vorgegebenen Anzahl von Zyklen endet das Programm (Schadendorf und Czarnetzki 1991).

Im Gegensatz zu der einfachen PCR, bei der das Produkt lediglich nachgewiesen und die Größe des Produkts geschätzt werden kann, ist bei einer RT-qPCR zusätzlich eine Quantifizierung des vorliegenden Produkts möglich. Hierfür wird ein messbarer Fluoreszenzfarbstoff in die gebildete cDNA eingebunden, der während jedes Zyklus die gemessene relative Leuchtkraft (in RFU, engl. *relative fluorescence unit*) der Probe erhöht. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann spezifisch für die gesuchte DNA-Sequenz sein oder sich unspezifisch in jede vorhandene Doppelhelix einlagern (VanGuilder, Vrana et al. 2008).

Ein Beispiel für einen unspezifisch bindenden Fluoreszenzfarbstoff ist der in dieser Arbeit genutzte SYBR-Green Farbstoff, ein Cyanin-Farbstoff. Dieser lagert sich in jeder Doppelhelix von cDNA in der Probe an und kann dadurch auch unspezifische Reaktionsprodukte nachweisen. Das Vermehren von cDNA und ggf. vorhandener unspezifischer Reaktionsprodukte durch die RT-qPCR wird durch einen Anstieg der Leuchtkraft angezeigt. Die SYBR-Green RT-qPCR wurde in dieser Arbeit für eine erste Funktionsprüfung neu generierter Primersysteme verwendet.

Ein Beispiel für einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff ist z. B. die in dieser Arbeit genutzte Taqman-Sonde. Diese besteht aus einer Nukleotid-Sequenz, die an die nachzuweisende DNA-Sequenz bindet und die zwischen den beiden Primern auf dem gesuchten cDNA-Abschnitt liegt. An die Sonde ist ein Fluoreszenzfarbstoff-System gekoppelt, bestehend aus einem *reporter* und einem *quencher*. Dabei sitzt der *reporter*-Farbstoff am 5'-Ende und der *quencher*-Farbstoff am 3'-Ende der Sonde. Das Emissionsspektrum des *reporters* entspricht dabei genau dem Anregungsspektrum des *quenchers*. Ist die Sonde noch nicht an die cDNA gebunden und somit *reporter* und *quencher* nah beieinander, können nur geringe Lichtmengen des *reporters* gemessen werden. Bindet Primer und Sonde an ihre spezifische cDNA-Sequenz, wird bei der Verlängerung der angelagerten Primersequenzen durch die *taq*-Polymerase die Sonde gespalten. Die Spaltung der Sonde trennt einerseits den *reporter*-

Farbstoff von der Sonde und andererseits die Sonde selbst von der cDNA. Die Sonde liegt nun wieder frei, jedoch ohne *reporter*-Farbstoff in der Reaktionslösung vor. Das Emissionsspektrum des nun frei vorliegenden *reporter*-Farbstoffes wird nicht mehr durch die räumliche Nähe zum *quencher*-Farbstoff absorbiert und die Leuchtkraft der Probe steigt (VanGuilder, Vrana et al. 2008). Die Taqman RT-qPCR wurde in dieser Arbeit für den spezifischen Nachweis der untersuchten Gene und der verwendeten *housekeeping* Gene (HK, Referenzgene) in den untersuchten Proben verwendet.

Ein typischer Verlauf einer auf die eine oder andere Art gemessenen Leuchtkurve der RT-qPCR hat zunächst eine Phase der Anreicherung, in der nur wenig Produkt vorhanden ist. Es folgt eine Phase des exponentiellen Anstiegs der Leuchtkraft, in der das Verhältnis von Ausgangsmaterial und Produkt ideal ist. Wenn die Ausgangsmaterialien nahezu verbraucht sind und die Wahrscheinlichkeit immer höher wird, dass sich die getrennten Doppelstränge wieder aneinander anlagern, folgt abschließend eine Plateau-Phase, in der die Leuchtkraft nicht weiter zunimmt (VanGuilder, Vrana et al. 2008).

4.7 Primer Design

Für die vorliegende Arbeit wurden Primerpaare und Sonden für die nachzuweisenden Gene (*genes of interest, GOI*) *porcine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (pCFTR)*, *porcine sodium channel epithelial (non voltage gated) 1 beta (pSCNN1B)*, *porcine chloride channel regulator, calcium-activated 1 (pCLCA1)* und *4a (pCLCA4a)* sowie die HK *porcine beta-2-microglobulin (p β 2M)*, *porcine succinate dehydrogenase complex, subunit D (pSDHD)* and *porcine tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta - polypeptide (pYWHAZ)* designt. Um die Primer designen zu können, muss die Sequenz des nachzuweisenden Gens bekannt sein. Dazu kann man sich einschlägiger Datenbanken bedienen, wie z. B. der hier genutzten online-Datenbank Ensemble (Ensemble 2011), in der die Gen- und Proteinsequenzen frei verfügbar sind. Ist die Gensequenz bekannt, können mit diversen Programmen automatisch Primerpaare und passende Sonden designt werden. Für die neu generierten GOI's *pCFTR*, *pSCNN1B*, *pCLCA1* und *pCLCA4a* wurde die online Plattform Primer3web-Version 4.0.0 (Koressaar und Remm 2007; Untergasser, Cutcutache et al. 2012; Primer3web-Version_4.0.0 2016) genutzt. Anhand der entsprechenden Gensequenzen wurden geeignete Primerpaare sowie dazu passende Sonden mit den Standardeinstellungen automatisch erstellt. Die verwendeten HK wurden durch Banafshe Gholamhoseini aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin mittels der Beacon designer 3.0 Software (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA)

generiert. Die entsprechenden Ensemble Transkript-Nummern, die Sequenzen und weitere Informationen aller in dieser Arbeit genutzten Gene sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Alle Primerpaare wurden *in silico* mit Hilfe der bekannten Gensequenz daraufhin überprüft, ob sie exonübergreifend sind. Das soll bei einer RT-qPCR einen fehlerhaften Nachweis von genomischer DNA verhindern, die eventuell als Kontamination in der Probe vorliegt. Die genomische DNA besteht aus Exonen und zwischen diesen liegenden nicht-kodierende Genabschnitte, die Introns (engl. *intragenic region*). Bei der Transkription eines Gens, also der Herstellung einer mRNA, werden die Introns aus der Nukleotidsequenz entfernt (Lin, Taggart et al. 2016). Die mRNA besteht demnach aus aneinandergereihten Exonen. Exonübergreifend bedeutet, dass sich die beiden Primersequenzen jeweils auf einem benachbarten Exon befinden. Dadurch kann die Nukleotidsequenz durch eine Polymerase nur vervielfältigt werden, wenn das zwischen diesen beiden Exonen liegende Intron fehlt, also eine mRNA vorliegt. Bei vorhandener DNA im Reaktionsmix könnten die Primer zwar an ihre spezifischen Sequenzen binden, durch das mehrere hundert bis mehrere tausend Basenpaare lange Intron zwischen den beiden Exonen, jedoch nicht in der Kürze der Reaktionszeit durch die Polymerase verlängert werden.

Zusätzlich wurden alle Primersequenzen mit Hilfe der NCBI nucleotide BLAST Suche (BLAST 2020) *in silico* auf ihre Spezifität hin untersucht. Alle Primer mussten dafür 100 % Übereinstimmung ausschließlich mit ihrem nachzuweisenden Gen aufweisen, um auch hier Kreuzreaktionen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Hierfür wurde anhand der Datenbankeinträge zu den Primersequenzen überprüft, welche Anteile der DNA im Schwein durch diese nachgewiesen werden können. Die vielversprechendsten Primerpaare und Sonden wurden anschließend von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) produziert und einer Testung der Verwendbarkeit unterzogen.

Tabelle 4: Ensemble Transkriptnummern, Primer- und Sonden-Sequenzen, Größe des Amplifikats, Exone, die durch das Primersystem überspannt werden sowie die dazwischen liegende Intronlänge der Gene, die in der RT-qPCR genutzt wurden.

Gencode	Ensemble Transkriptnummer	Sequenz (5' → 3')	Amplikongröße (bp)	Überspannte Exone (bp)	Intronlänge zwischen den Exonen (bp)
<i>pCFTR</i>	ENSSSCT 00000018101	Forward-Primer: ACTACGCTGGTTCCAAATGC Reverse-Primer: ACAACAGGGGAAGGAGAAGG Taqman Sonde: FAM-TGCCGTTACCTTCATTTCCA-TAMRA	96	20–21	2.693
<i>pSCNN1B</i>	ENSSSCT 00000029056	Forward-Primer: CCACCCGGATTATGGCAACT Reverse-Primer: GCTGAGTTTGGCCTGAAGTTG Taqman Sonde: FAM-CTTCAACTGGGGCATGAAGGAGAAG-TAMRA	97	4–5	972
<i>pCLCA1</i>	ENSSSCT 00000007595	Forward-Primer: CCTCGGGAGGAACGTCCATC Reverse-Primer: CCGTCGGTCGGGTATTTCTTC Taqman Sonde: FAM- ATCACAGTAAATGCGGAGCGAAGCCCC -TAMRA	76	7–8	2.865
<i>pCLCA4a</i>	ENSSSCT 00000007594	Forward-Primer: GGGCGTGTGGATGAGTACAATG Reverse-Primer: AATACCTGTTGAGCACCTTGTCG Taqman Sonde: FAM- ACGAGCCTTTCTACAGCGCGAAGTCAA -TAMRA	88	4–5	1.212

Fortsetzung Tabelle 4: Ensemble Transkriptnummern, Primer- und Sonden-Sequenzen, Größe des Amplifikats, Exone, die durch das Primersystem überspannt werden sowie die dazwischen liegende Intronlänge der Gene, die in der RT-qPCR genutzt wurden.

Genname	Ensemble Transkript- nummer	Sequenz (5' → 3')	Amplikon- größe (bp)	Überspannte Exone (bp)	Intronlänge zwischen den Exonen (bp)
<i>pβ2M</i>	ENSSSCT 00000005170	Forward-Primer: TAGCGATGGCTCCCCTCGTG Reverse-Primer: CGAAGGTTTCAGGTTTACTCACGC Taqman Sonde: FAM-CTTGGTCCTGCTCGGGCTGCTCTCAC-TAMRA	101	1–2	3.701
<i>pSDHD</i>	ENSSSCT 00000016399	Forward-Primer: GCCTACTTCCAGCCGCTTATTTG Reverse-Primer: GGCATTGGACAAGTCGTTACTGA Taqman Sonde: FAM-TTGCTCTGCGATGGACTACTCCCTGGC-TAMRA	106	3–4	6.555
<i>pYWHAZ</i>	ENSSSCT 00000006651	Forward-Primer: TCACAAGCAGAGAGCAAAGTCTTC Reverse-Primer: GAAGGGGATTGTGGATCAGTCAC Taqman Sonde: FAM-CCGTTACTTGGCTGAGGTTGCTGCTGG-TAMRA	109	3–4	1.755

pCFTR: porcine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *pSCNN1B*: porcine sodium channel epithelial (non voltage gated) 1 beta. *pCLCA1*: porcine chloride channel regulator, calcium-activated 1. *pCLCA4a*: porcine chloride channel regulator, calcium-activated 4a. *pβ2M*: porcine beta-2-microglobulin. *pSDHD*: porcine succinate dehydrogenase complex, subunit D. *pYWHAZ*: porcine tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta - polypeptide. bp: Basenpaare.

4.8 Etablierung der Primersysteme

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss jedes Primersystem etabliert werden. Dazu wurden die Primerpaare ohne Sonde zunächst mit Hilfe des SYBR-Green Farbstoffs in einem standardisierten RT-qPCR-Protokoll darauf hin überprüft, dass sie ein Produkt liefern und anschließend die Korrektheit des Produktes mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Primersystem zusammen mit der dazugehörigen Sonde daraufhin untersucht, ob es eine Leuchtkurve entwickelt und das Protokoll mittels eines Standardkurvenexperiments auf seine Effektivität und Reproduzierbarkeit hin überprüft (Dietert, Reppe et al. 2014).

4.8.1 Schmelzkurvenanalyse mittels SYBR-Green RT-qPCR

In einem ersten Schritt der Etablierung wurde eine SYBR-Green RT-pPCR mit einem Standardprotokoll mit einer Organprobe, die das gesuchte Produkt enthält, durchgeführt (Materialien, Geräte und Hersteller sind im Anhang in **Tabelle 25** angegeben). Das SYBR-Green System hat den Vorteil, dass zusätzlich zu dem Nachweis der gesuchten cDNA-Sequenz eine Schmelzkurvenanalyse auf Primerdimere durchgeführt werden kann. Primerdimere würden zu einem falsch positiven Ergebnis führen bzw. die gemessenen Werte fälschlicherweise erhöhen. Für die SYBRTM-Green RT-qPCR wurden pro Probe ein Reaktionsmix wie in **Tabelle 5** angegeben vorbereitet und in eine 96-Well Platte pipettiert. Dabei wurden die Proben als Triplets mit zusätzlichen drei Negativkontrollen pipettiert und anschließend mit einer Folie verschlossen. Als Negativkontrolle diente der Reaktionsmix ohne Probe. Dadurch konnte eine Kontamination, die zu falsch positiven Signalen führen könnte, ausgeschlossen werden. Zur Durchführung der RT-qPCR wurden die 96-Well Platten in das BioRad CFX96 Realtime System eingesetzt und mit einem Standard-Temperaturprotokoll untersucht (siehe **Tabelle 6**). In dem Fall, dass das untersuchte Gewebe ein spezifisches Signal für das untersuchte Gen aufwies, wurde das RT-qPCR Produkt in einem nächsten Schritt aufgereinigt.

Tabelle 5 Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine SYBRTM-Green RT-qPCR

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
Maxima TM SYBR TM Green/ROX	7,8 µl
qPCR Master Mix (2X)	
Primer forward, 20 pmol/µl	0,3 µl
Primer reverse, 20 pmol/µl	0,3 µl
DEPC-Wasser	2,6 µl
Probe	5 µl
Gesamtvolumen pro Probe	16 µl

Tabelle 6 Temperaturprotokoll für eine SYBR-Green RT-qPCR

	Programmschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1.	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1 x
2.	Zyklische Denaturierung	95 °C	15 s	Schritte 2-4 werden 40 Mal wiederholt
3.	Anlagerung der Primer	58 °C	60 s	
4.	Elongation	72 °C	30 s	
5.	Finales Erhitzen	95 °C	1 min	1 x
6.	Temperaturgradient für Schmelzkurve in 0,5 °C Schritten	58-95 °C	Je 5 s	1 x

min: Minuten. s: Sekunden

4.8.2 Aufreinigung des RT-qPCR Produktes

Die Aufreinigung des RT-qPCR Produktes wurde mittels des NucleoSpin Extract II Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (Chemikalien, Geräte und Hersteller im Anhang in **Tabelle 25**). Die Produkte eines Primersystems aus mehreren Wells der 96-Well Platte wurden gepoolt und falls nötig auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit dem NT-Puffer des Kits aufgefüllt. Die in der Flüssigkeit vorliegende große Menge cDNA des Produkts wurde an eine Membran gebunden und durch Waschschriffe von den übrigen Substanzen des Reaktions-

mixes der RT-qPCR gereinigt. Das Protokoll für die Aufreinigung findet sich in **Tabelle 7**. Das aufgereinigte Produkt wurde anschließend für die Sequenzierung vorbereitet.

Tabelle 7 Protokoll der Produkt-Aufreinigung aus der RT-qPCR mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit

Ziel des Schrittes	Durchführung des Schrittes
1. Poolen des RT-qPCR Produktes	Produkte eines Gens in einem Tube sammeln Gesamtvolumen ggf. mit NT-Buffer des Kits auf 100 µl auffüllen
2. Bindungskonditionen anpassen	200 µl NT-Puffer des Kits hinzugeben 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren
3. Membran waschen und trocknen	700 µl NT3-Puffer des Kits hinzugeben 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren Flüssigkeit verwerfen 2 Minuten bei 13.000 x g zentrifugieren Säule des Kits in neues 1,5 ml Tube setzen
4. cDNA eluieren	15 µl Ne-Puffer des Kits hinzugeben 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren 1 Minute bei 13.000 x g zentrifugieren

4.8.3 Sequenzierung des RT-qPCR Produktes

Die aufgereinigten Produkte wurden von SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland) sequenziert. Die so ermittelte Sequenz des RT-qPCR-Produktes des genutzten Primersystems wurde erneut *in silico* mit Hilfe der NCBI nucleotide BLAST Suche auf seine Spezifität hin untersucht. Die hier genutzten Primersysteme erzeugten Produkte, die 100 % Übereinstimmung mit ihrem nachzuweisenden Gen aufwiesen. Somit wurde die Spezifität des Primersystems nachgewiesen.

4.8.4 Funktionstest der Sonden und Ausschluss von Kreuzreaktion mit genomischer DNA

Die Primerpaare wurden nun zusammen mit ihren Sonden mit einem Taqman Standardprotokoll in einem Gewebe, das das gesuchte Gen voraussichtlich enthält, getestet. Dafür wurde

pro Probe ein Reagenzienmix, wie in **Tabelle 8** angegeben, vorbereitet. Die zu testenden Primersysteme wurden jeweils in Triplets mit den jeweiligen Negativkontrollen (Reagenzienmix ohne Probe) in eine 96-Well Platte pipettiert und die Platte anschließend mit einer Folie abgedeckt. Die 96-Well Platte wurde in das BioRad CFX96 realtime system verbracht und mit dem Temperaturprotokoll wie in **Tabelle 9** angegeben bearbeitet. Wurde ein Signal nachgewiesen, wurde aus dem Produkt eine Verdünnungsreihe erstellt.

Zusätzlich wurden alle Primersysteme mit aufgereinigter genomischer DNA vom Schwein als Probe in einer Taqman-RT-qPCR mit dem oben angegebenen Reagenzienmix und Temperaturprotokoll getestet. Dadurch werden Kreuzreaktionen mit genomischer DNA nachgewiesen, die bei einer RT-qPCR sowohl zu falsch positiven Ergebnissen führen als auch die nachgewiesene Expressionshöhe künstlich steigern können. Die in dieser Arbeit verwendeten Primersysteme zeigten hier kein Signal.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine Taqman-RT-qPCR

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x)	7,8 µl
Primer forward (0,4 pmol/µl)	0,3 µl
Primer reverse (0,4 pmol/µl)	0,3 µl
Taq-man Sonde (0,3 pmol/µl)	0,05 µl
Nuclease-freies Wasser	5,55 µl
Probe	1 µl
Gesamtmenge	14 µl

Tabelle 9: Temperaturprotokoll für die Etablierung eines Primersystems einer Taqman-RT-qPCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1 x
2. Zyklische Denaturierung	95 °C	10 s	Schritte 2 und 3 werden 40 Mal wiederholt
3. Annealing/Elongation	61,4 °C	30 s	

min: Minuten. s: Sekunden

4.8.5 Erstellen einer cDNA-Verdünnungsreihe

Sofern das Primer- und Sondensystem in dem Taqman-Standardprotokoll ein Signal erbrachte, wurden die Triplets des jeweiligen Primersystems mittels des NucleoSpin Extract II Kit, wie in **4.8.2** beschrieben, aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der enthaltenen cDNA mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen (siehe **4.3**). Aus diesem aufgereinigten Produkt wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 200 ng/ μ l aus Produkt und Diethylpyrokarbonat behandeltem, Nulease-freien Wasser (DEPC-Wasser, engl. *diethylpyrocarbonat*) hergestellt. Anschließend wurden 100 μ l der Stammlösung in 900 μ l DEPC-Wasser verdünnt und gründlich vermischt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe wurden wiederum 100 μ l entnommen und in 900 μ l DEPC-Wasser verdünnt und gründlich vermischt. Diese Schritte wurden, wie in **Abbildung 3** dargestellt, bis zur neunten Verdünnungsstufe wiederholt. Die so erstellte Verdünnungsreihe besitzt eine definierte Menge cDNA in jeder Stufe.

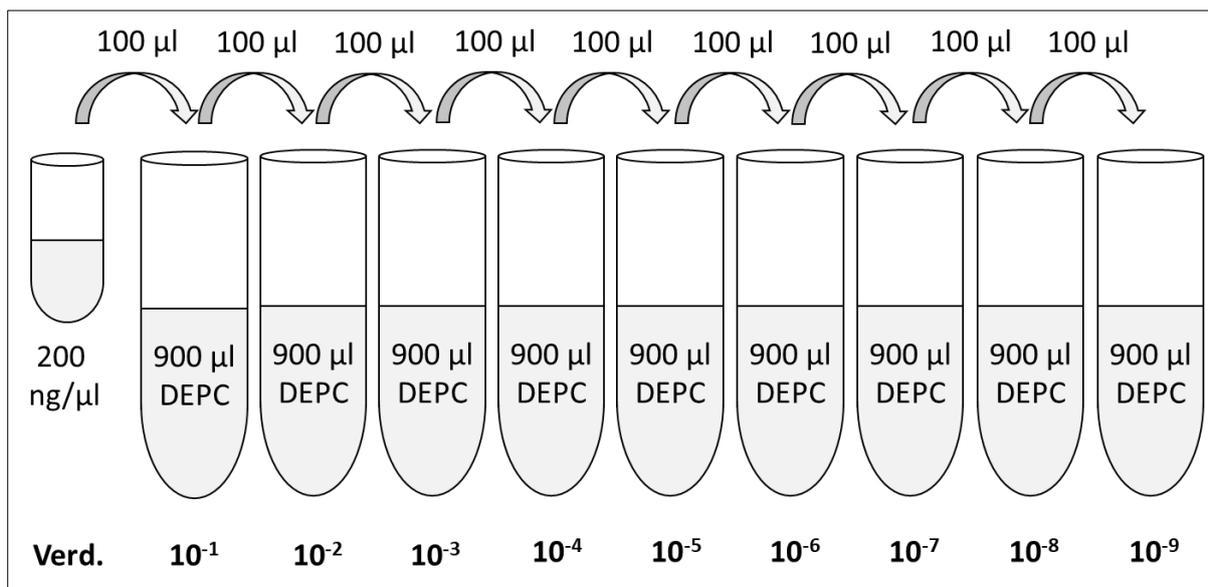


Abbildung 3 Erstellen einer Verdünnungsreihe aus einer Stammlösung mit definierter cDNA-Konzentration.

Aus der Stammlösung mit definierter Konzentration werden 100 μ l in 900 μ l DEPC-Wasser gegeben und gut vermischt. Für die nächsten Verdünnungsstufen werden wiederum 100 μ l in 900 μ l DEPC-Wasser gegeben und gut vermischt, bis eine Verdünnung von 10^{-9} erreicht ist. Verd.: Verdünnungsstufe. DEPC: Diethylpyrokarbonat behandeltes, Nulease-freies Wasser.

4.8.6 Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur

Für jedes Primersystem kann eine andere Annealing-Temperatur optimal sein. In der Regel liegt diese zwischen 55 °C und 65 °C. Als Probe wurde hierfür die jeweilige Verdünnungsreihe des Primersystems genutzt. Dadurch kann in einem Temperaturgradientenprotokoll sowohl die optimale Annealing-Temperatur ermittelt als auch ein erster Eindruck der Effizienz der RT-qPCR (siehe 4.8.7) gewonnen werden. Pro Probe wurde ein Reagenzienmix, wie bereits in **Tabelle 8** (siehe 4.8.4) beschrieben, angesetzt und die Proben sowie die entsprechenden Negativkontrollen (Reaktionsmix ohne Probe) als Duplikate in eine 96-Well Platte pipettiert (beispielhaftes Schema siehe **Tabelle 10**). Nachdem die Platte mit einer Folie abgedeckt wurde, wurde diese in das BioRad CFX96 real time System verbracht und mit einem Temperaturprotokoll, wie in **Tabelle 11** angegeben, bearbeitet.

Nach Abschluss des Protokolls wurden die Leuchtkurven mit der BioRad CFX96 Manager Software bei den unterschiedlichen Annealingtemperaturen analysiert. Die RFU sollte so hoch wie möglich sein, optimal über 1000 RFU. Die in dieser Arbeit verwendeten Primersysteme wiesen eine gute Leuchtkraft bei einer Annealing-Temperatur von 61,4 °C auf.

Tabelle 10: Pipettierschema für eine Taqman-RT-qPCR mit einem Temperaturgradienten zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur

	1	2	3	4	5	6	7	Temperatur
A	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	65 °C
B	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	64,5 °C
C	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	63,3 °C
D	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	61,4 °C
E	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	59,0 °C
F	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	57,0 °C
G	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	55,7 °C
H	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	NTC	55 °C

Tabelle 11: Temperaturprotokoll für ein Temperaturgradienten Experiment mittels Taqman-RT-qPCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1. Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1 x
2. Zyklische Denaturierung	95 °C	15 s	Schritte 2 und 3 werden zyklisch 40 Mal wiederholt
3. Annealing/Elongation mit Temperaturgradient	55-65 °C	30 s	

min: Minuten. s: Sekunden

4.8.7 Test auf Effizienz der RT-qPCR mittels Taqman-RT-qPCR mit Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe des jeweiligen Primersystems wurde nun als Proben in einer Taqman-qRT-PCR eingesetzt, die bei der ermittelten, optimalen Annealing-Temperatur durchgeführt wurde. Hierzu wurde pro Probe ein Reagenzienmix, wie bereits in **Tabelle 8** (siehe 4.8.4) beschrieben, angesetzt und die Proben sowie die entsprechenden Negativkontrollen (Reaktionsmix ohne Probe) als Duplikate in eine 96-Well Platte pipettiert. Nachdem die Platte mit einer Folie abgedeckt wurde, wurde diese in das BioRad CFX96 real time System verbracht und mit einem Temperaturprotokoll, wie bereits in **Tabelle 9** (siehe 4.8.4) angegeben, bearbeitet.

Nach Abschluss des Protokolls wurden die Leuchtkurven mit der BioRad CFX96 Manager Software analysiert. Um die Effizienz der RT-qPCR-Reaktion zu berechnen, ist es notwendig einen sogenannten *threshold* (manuell festgelegter Schwellenwert für die Leuchtstärke) festzulegen, ab dem das Signal als spezifisch angesehen wird. Dieser muss bei einer Signalstärke der Leuchtkraft liegen, bei der sich alle Leuchtkurven eines Primersystems in der exponentiellen Phase befinden. Zusätzlich sollte dieser *Threshold* bei einem mindestens dreimal so hohen RFU-Wert liegen, wie der höchste irrelevante Ausschlag des Hintergrundleuchtens. Zumeist liegt der *threshold* zwischen 50 und 200 RFU. Der Punkt, an dem die Leuchtkurve den festgelegten *threshold* schneidet, wird *cycle threshold* (Ct) genannt. Jede Probe weist einen bestimmten Ct-Wert auf. Dieser wird ausgelesen und für weitere Berechnungen verwendet. Die Ct-Werte der Duplikate sollten sich, da es sich um dieselbe Probe im selben Reaktionsmix handelt, maximal um 0,5 Zyklen unterscheiden. Ein größerer Unterschied zwischen gleichen Proben spricht für eine Ungenauigkeit beim Pipettieren.

Je höher die Startkonzentration an der gesuchten cDNA-Sequenz in der untersuchten Probe ist, desto früher beginnt das exponentielle Wachstum der Leuchtkurve und desto kleiner ist

der Ct-Wert. Umgekehrt wird der Ct-Wert größer, wenn die Startkonzentration in der untersuchten Probe geringer war. Da es sich bei diesem Versuchsaufbau um eine gleichmäßige Verdünnung einer bekannten Konzentration handelt, sollten die Abstände zwischen den Verdünnungsstufen sehr gleichmäßig sein. Idealerweise betragen die Abstände zwischen den Ct-Werten der Verdünnungsstufen 3,3 Zyklen. Je gleichmäßiger diese Abstände sind, desto größer ist die Effizienz der Reaktion. Eine Effizienz zwischen 95 und 105 % wird im Allgemeinen als akzeptabel angesehen. In diesem Bereich kann man von einer effektiven Verdopplung der Proben mit jedem Zyklus ausgehen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primersystemen wurde eine solche Effizienz bei einem *threshold* bei 100 RFU in mindestens drei, zeitlich voneinander unabhängigen Experimenten nachgewiesen.

4.9 Messung des gewebespezifischen Expressionslevels von *pCFTR* und *pSCNN1B*

Alle RT-qPCR Messungen wurden in einer 96-well Platte mit Duplikaten der zu untersuchenden Proben, cDNA von den Standardkurvenexperimenten (Positiv-Kontrolle) und des Reagenzienmixes ohne Probe (Negativ-Kontrolle, *non-template control*, NTC) für die verschiedenen GOI und HK ausgeführt. Die Proben wurden so angeordnet, dass nach Möglichkeit alle Genmessungen einer Gewebeprobe auf einer Platte lagen. Alle Gene wurden dabei in derselben Charge cDNA gemessen, um Schwankungen bei der reversen Transkription auszuschließen. Pro Probe wurde ein Reagenzienmix, wie in **Tabelle 8** (siehe **4.8.4**), angegeben vorbereitet. Nach dem Pipettieren wurde die 96-Well Platte in das BioRad CFX96 Realtime System verbracht und mit dem Temperaturprotokoll, wie in **Tabelle 9** angegeben, bearbeitet. Nach Abschluss des Protokolls wurden zunächst die NTCs kontrolliert. Nur wenn sich hier keine Signale fanden, die auf eine Kontamination des Reagenzienmixes hindeuten, wurden die Daten ausgelesen und weiterverarbeitet.

Die Roh-Ct-Werte bei einem Threshold von 100 RFU wurden aus dem BioRad CFX Manager 2.0 nach Microsoft® Excel exportiert, um die stabilsten HK-Gene zu ermitteln und weitere Analysen durchzuführen. Auch hier wurden nur Duplikate einer Probe akzeptiert und verwendet, deren Ct weniger als 0,5 Zyklen auseinanderlagen.

4.10 Ermittlung der stabilsten *housekeeping* Gene mittels GeNorm

Um die Stabilität der Expression der einzelnen HK zu überprüfen, müssen die Abstände aller für diesen HK gemessenen Ct-Werte bewertet werden. Hierfür wurde die Software GeNorm Software Version 3.4 (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Vandesompele, De Preter et al.

2002; Mestdagh, Van Vlierberghe et al. 2009) verwendet. Je weniger die Ct-Werte voneinander abweichen, desto stabiler ist das Gen exprimiert.

Die Stabilität der einzelnen HK-Gene wurde in zwei Ansätzen geprüft. Zum einen wurden die Ct-Werte eines HK-Gens über alle Gewebeproben hinweg untersucht. Zum anderen wurden die Ct-Werte eines HK-Gens in jeder Gewebeprobe einzeln überprüft. Dabei zeigten die HK-Gene im letzteren Fall eine stabilere Expression, wobei sich die jeweils stabilsten Gene in den unterschiedlichen Gewebeproben unterschieden (siehe **Tabelle 12**).

Tabelle 12: Stabilste Housekeeping Gene laut GeNorm

Gewebe	Stabilste HK laut GeNorm
Kraniale Tracheaanteile	<i>pSDHD</i> und <i>pYWHAZ</i>
Kaudale Tracheaanteile	<i>pSDHD</i>
Bronchusreicher Lungenspitzenlappen	<i>pSDHD</i> und <i>pYWHAZ</i>
Alveolarreicher Lungenhauptlappen	<i>pβ2M</i>
Dickdarm	<i>pSDHD</i>

HK: Referenzgen, engl. housekeeping gene. pβ2M: porcine beta-2-microglobulin. pSDHD: porcine Succinate dehydrogenase complex subunit D. pYWHAZ: porcine tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta – polypeptide

4.11 Statistische Auswertung der mRNA-Expression

Die Ct-Werte aller Gene wurden einer *interrun*-Kalibrierung (IRC) unterzogen, um plattennormalisierte Ct-Werte zu erhalten. Die hierfür genutzte Methode nach Hellemans et al. (Hellemans, Mortier et al. 2007) berechnet mit Hilfe einer Referenzprobe, die bei jedem Lauf mitgeführt wurde, einen Faktor, der auf die Ct-Werte aller untersuchten Gene angewendet wird. Als Referenzprobe wurde hier die cDNA aus den Standardkurvenexperimenten des jeweiligen Gens genutzt. Dadurch werden systematische Fehler, die aufgrund leichter technischer Schwankungen im BioRad CFX96 entstehen, ausgeglichen.

Nach der IRC wurden die Ct-Werte der GOI gegen die stabilsten HK normalisiert und das Vielfache des Delta Delta Ct (*fold change*) nach Pfaffl ermittelt (Pfaffl 2001). Die Berechnungen hierfür wurden mittels Microsoft® Excel wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden die Mittelwerte der Ct-Werte der stabilsten HK pro Probe von dem entsprechenden Ct-Wert des GOI subtrahiert. Die so erhaltenen Delta-Ct-Werte eines GOI pro Probe wurden zu Mittelwer-

ten pro Altersgruppe zusammengefasst. Anschließend wurden die Mittelwerte der Kontrollgruppe (in der vorliegenden Arbeit jeweils der 37. GT pro Gewebeprobe) von den Mittelwerten der anderen Zeitpunkte der jeweiligen Gewebeprobe subtrahiert. Der so erhaltene Delta Delta Ct wurde als negativer Exponent zur Basis 2 eingesetzt.

Die anschließende statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS[®] Statistics (Version 22, IBM[®]) durchgeführt. Um das Expressionsmuster über die verschiedenen Trächtigkeitsstadien hinweg in den einzelnen Organproben zu untersuchen, wurde die relative Expression für jede Gewebeprobe einzeln untersucht. Dabei wurde der jeweilige 37. GT als Referenzpunkt gewählt, auf den sich die Expressionen der darauffolgenden Zeitpunkte beziehen. Jeder Datenpunkt beschreibt hierbei die Veränderung der Expression im Vergleich zu dem frühesten untersuchten Zeitpunkt am 37. GT des untersuchten Gewebes. Um statistische Signifikanzen in der relativen Expression der GOI in den jeweiligen Geweben zu ermitteln, wurde der Kruskal-Wallis-Test, als Test für nicht normalverteilte Werte mit mehr als 2 Stichproben, angewendet. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Säulendiagramme (siehe Kapitel 5).

4.12 Anfertigung von Paraffinblöcken aus den formalinfixierten Gewebeproben

Die entnommenen Gewebeproben wurden in einem Verhältnis von mind. 1 zu 10 in neutral gepuffertem Formalin (4 % und pH 7,0) für 24 Stunden fixiert (die verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind unter Angabe des Herstellers im Anhang in **Tabelle 26** zu finden). Danach wurden die Proben mittels einer Skalpellklinge „Form 10“ zugeschnitten und in eindeutig beschriftete Einbettkassetten verbracht. Die anschließende Entwässerung und Überführung in Paraffin erfolgte vollautomatisch im Tissue-Tek[®] Einbettautomat mit dem in **Tabelle 13** aufgeführten Protokoll. An der Cryoconsole Ausgießstation werden die Einbettkassetten bei 60 °C zwischengelagert, anschließend auf einer 60 °C warmen Arbeitsplatte in metallene Ausgießformen eingegossen und diese anschließend auf einer -9 °C kalten Kühlplatte für fünf bis zehn Minuten heruntergekühlt. Die vollständig ausgehärteten Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Nutzung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 13: *Protokoll der Entwässerung und Überführung der Gewebeproben in Paraffin im Tissue-Tek® Einbettautomat*

	Reagenz	Zeit (Minuten)	Temperatur
1.	Formalin 4 %	50	37 °C
2.	Wasser	50	37 °C
3.	Ethanol 70 %	50	37 °C
4.	Ethanol 70 %	50	37 °C
5.	Ethanol 90 %	50	37 °C
6.	Ethanol 90 %	50	37 °C
7.	Isopropanol 100 %	50	37 °C
8.	Isopropanol 100 %	50	37 °C
9.	Xylol	50	37 °C
10.	Xylol	50	37 °C
11.	Paraffin	50	60 °C
12.	Paraffin	50	60 °C
13.	Paraffin	60	60 °C
14.	Paraffin	60	60 °C

4.13 Anfertigung von Leerschnittpräparaten

Für die Anfertigung der Leerschnitte (ungefärbte Paraffinschnitte) wurden die Paraffinblöcke wenige Minuten bei -18 °C heruntergekühlt. Am Rotationsmikrotom HM 325 wurden die Paraffinblöcke mit der Schnittfläche nach unten auf der auf -4 °C gekühlten Platte zwischengelagert (die verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind unter Angabe des Herstellers im Anhang in **Tabelle 26** zu finden). Mittels einer Mikrotomklinge wurde die oberste Schicht der Paraffinblöcke am Rotationsmikrotom zunächst so angeschnitten, dass das eingebettete Gewebe in der Anschnittsfläche sichtbar wurde. Nach einem Klängenwechsel wurden jeweils 1–2 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt, die kurzfristig in einer Schüssel mit Wasser bei Raumtemperatur gelagert und hier auf beschichteten SuperFrost® Objektträger aufgenommen wurden. Anschließend wurde die Paraffinschnitte in einem auf 60 °C aufgeheizten Wasserbad für 1 Sekunde gestreckt und so auf dem Objektträger angeheftet. Anschließend wurden die fertigen Schnitte über Nacht bei 35 °C getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

4.14 Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte

Um die korrekte Lagerung und Tiefe des Anschnittes der Gewebeproben zu überprüfen, wurde eine vollautomatische Hämalaun-Eosin (HE-) Färbung im Leica CV 5030 Färbe- und Eindeckautomaten durchgeführt (die verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind unter Angabe des Herstellers im Anhang in **Tabelle 26** zu finden). In diesem wird nach einer Entparaffinierung mittels Xylol und einer Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe mit Hämalaun nach Meyer und Eosin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit Deckgläsern eingedeckt. Das Protokoll zur Rehydrierung, Färbung und Dehydrierung findet sich in **Tabelle 14**.

Tabelle 14 Protokoll für die Rehydrierung, HE-Färbung und Dehydrierung der Gewebeschnitte im Leica CV 5030 Färbe- und Eindeckautomaten

	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.	Wasser	1 min	1 x
7.	Hämalaun nach Mayer	8 min	1 x
8.	Wasser	5 min	1 x
9.	Eosin 1 %	20 s	1 x
10.	Wasser	10 s	1 x
11.	Ethanol 70 %	10 s	1 x
12.	Ethanol 80 %	1 min	1 x
13.	Ethanol 96 %	1 min	1 x
14.	Ethanol 100 %	1 min	2 x
15.	Xylol	2 min	4 x

min: Minute. s: Sekunde.

4.15 Funktionsweise der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem die zu untersuchenden Proteine durch eine Antigen-Antikörperbindung mit anschließender Farbstoffreaktion in einem histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden. Dadurch gelingt eine direkte Zuordnung von einem Protein zu seiner exprimierenden Zelle. Die gebundenen Antikörper werden dabei durch einen Farbstoff (Chromogen) im Gewebe enzymatisch sichtbar gemacht, der entweder direkt an den Antikörper oder an mehrere weitere Antikörper gebunden ist. Letzteres führt zu einer sensitiveren Reaktion, da an einen nachweisenden (Primär-)Antikörper mehr Enzym über weitere (Sekundär- oder Tertiär-)Antikörper gebunden werden können (Ramos-Vara und Miller 2014).

Für diese Form des Nachweises kann kryo- oder chemisch-fixiertes Gewebe genutzt werden. Die Kryokonservierung erhält die natürliche Proteinstruktur und Integrität der Zellen sehr gut. Letzteres ist jedoch von Nachteil, wenn intrazelluläre Proteine nachgewiesen werden sollen, da die Fähigkeit von Antikörpern, Gewebe und Zellen zu infiltrieren, stark eingeschränkt ist. Ein weiterer Nachteil ist eine nur mäßige Erhaltung der zellulären Zusammenhänge, so dass die Möglichkeit der histologischen Beurteilung eingeschränkt sein kann. Eine chemische Fixierung wird routinemäßig z. B. mit Formalin durchgeführt. Dabei werden die Proteine im Gewebe denaturiert und quervernetzt. Als Nebeneffekt wird hierbei auch die Zellmembranpermeabilität erhöht. Die Fixierung kann für viele Antikörper ein Problem darstellen, da ihre Antigene durch die Quervernetzung maskiert und damit nicht mehr für die Antikörper zugänglich sein können (Ramos-Vara und Miller 2014).

Histologische Schnitte werden bei Kryogewebe direkt, bei Formalin-fixiertem Gewebe nach Entwässerung, Entfettung und Paraffin-Einbettung, möglichst dünn (1 µm) geschnitten und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Je nach Vorbereitung der Gewebe müssen anschließend verschiedene Vorbehandlungen durchgeführt werden, um zum Beispiel den Schnitt zu entparaffinisieren, Antigene zu demaskieren (durch Hitze oder Enzyme) oder im zu untersuchenden Gewebe vorliegende Enzyme, wie die endogene Peroxidase zu blockieren (Ramos-Vara und Miller 2014).

Für die Immundetektion ist es wichtig, sowohl die zu untersuchende Tierart als auch die Tierart, in der der Antikörper hergestellt wurde, zu beachten. In dieser Arbeit war die zu untersuchende Tierart Schwein, die Primärantikörper wurden im Kaninchen (Plog, Mundhenk et al. 2010), die Sekundärantikörper in der Ziege erzeugt. Für eine optimale und spezifische Bindung der Antikörper werden die Gewebe zunächst mit einem Ziegen-Normal-Serum inkubiert, das eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers verhindert. Daran anschließend wird der Primärantikörper inkubiert. Die Antikörper Bindungsreaktion kann dabei bei

Raumtemperatur oder stark verzögert bei +4 °C stattfinden. Anschließend wird der Sekundärantikörper mit an ihn gebundenem Partikel (in dieser Arbeit das Vitamin Biotin) inkubiert und lagert sich an den Primärantikörper an. Mittels der starken Avidin-Biotin Bindung bei der Avidin-Biotin-Komplex Methode kann nun ein Chromogen an den Sekundärantikörper angelagert werden und es kommt durch eine enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag im Gewebe im Bereich des Primärantikörpers (Ramos-Vara und Miller 2014).

Um die Orientierung beim Mikroskopieren zu erleichtern, kann das Gewebe mit gängigen Farbstoffen (hier Hämatoxylin nach Mayer) gegengefärbt werden. Anschließend werden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe, gefolgt von einem Xylol-Bad entwässert und können mit einem geeigneten Eindeck-Medium konserviert werden.

Die notwendigen Schritte sind spezifisch für das verwendete Chromogen und müssen bei Verwendung anderer Chromogene entsprechend modifiziert werden.

4.16 Immunhistologische Färbung

Für die immunhistologische Untersuchung jeder Gewebeprobe wurde je ein Leerschnitt für das nachzuweisende pCFTR-Protein und eine Negativkontrolle mit Präimmunserum verwendet. Zusätzlich wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle für das untersuchte Organ aus einer Sau verwendet, um die erfolgreiche Färbung zu überprüfen. Die Antikörper-Inkubation für immunhistologische Färbungen erfolgte in einer feuchten Kammer. Dabei handelt es sich um eine Kunststoffbox mit Deckel, in die Objektträger waagrecht eingelegt werden können. Alle anderen Schritte wurden in Färbekästen und Gestellen aus Natron-Kalk-Glas (z. B. Marienfeld Superior™) durchgeführt (die verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind unter Angabe des Herstellers im Anhang in **Tabelle 26** zu finden).

In dieser Arbeit wurde das im Kaninchen hergestellte polyklonale Antikörperserum pCFTR-N1 und das zugehörige Präimmunserum verwendet. Die Spezifität dieses Antikörperserums wurde bereits durch Plog und KollegInnen gezeigt (Plog, Mundhenk et al. 2010). Das Präimmunserum enthält die Antikörper, die bei dem Kaninchen, in dem der Primärantikörper hergestellt wurde, schon vor Gabe des pCFTR-Epitops für die Antikörperproduktion vorhanden waren. Auf diese Weise können unspezifische Bindungen von spezifischen Bindungen des pCFTR-N1 Serums unterschieden werden. In Vorversuchen wurden für das pCFTR-N1 Serum eine optimale Verdünnung von 1:3000 für fetales Gewebe bzw. 1:5000 für die Gewebe der Sauen ermittelt. Das Präimmunserum wurde jeweils in der gleichen Konzentration aufgetragen. Die drei Antikörper gegen das humane β -ENaC (HPA015612 von Sigma Aldrich, Steinheim, Germany; sc-25354 von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA;

NBP1-84844 von Novus biologicals, Littleton, CO, USA) erbrachten in verschiedenen Testreihen keine spezifischen Signale beim Schwein, wobei in den mitgeführten Proben vom Dünndarm vom Menschen, die als Positivkontrollen dienten, spezifische Signale sichtbar waren.

Die Schnitte wurden zunächst mit Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (siehe **Tabelle 15**). Anschließend wurde die endogene Peroxidase in einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Methanol Lösung (für einen Glasfärbekasten 180 ml Methanol und 20 ml 30%iges Wasserstoffperoxid) unter konstantem, leichten Rühren auf einem Magnetrührer für 30 Minuten inaktiviert. Zur Demaskierung der Epitope wurde die sogenannte *heat induced epitope retrieval* Methode mittels Citratpuffer (10mM Citronensäure, pH 6,0) genutzt. Hierfür wurden 15 ml Stammlösungen A (0,1 M Citronensäure), 60 ml Stammlösung B (0,1 M Natriumcitrat; Rezept siehe **Tabelle 16**) und 7,5 ml Triton X-100 (5 %) mit destilliertem Wasser (*Aqua dest.*, lat. *aqua destillata*) auf 750 ml aufgefüllt. Die Schnitte wurden in die 4 Minuten lang in einer Mikrowelle bei 700 Watt vorgewärmten Citratpufferlösung gegeben und für 15 Minuten in der Mikrowelle bei 700 Watt erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte in einem Glasfärbekasten mit Phosphatgepufferter Salz-Lösung (PBS, 1 PBS-Tabletten pro 1 l *Aqua dest.*, pH 7,2) für 10 Minuten bei Raumtemperatur schonend abgekühlt.

Tabelle 15: *Protokoll der Rehydrierung der immunhistologischen Schnitte*

	Reagenz	Zeit
1.	Xylol 96 %	10 min
2.	Xylol 96 %	10 min
3.	Ethanol 100 %	3 min
4.	Ethanol 100 %	3 min
5.	Ethanol 96 %	3 min
6.	Ethanol 96 %	3 min
7.	Ethanol 70 %	3 min
8.	<i>Aqua dest.</i>	3 min

min: Minuten

Tabelle 16: Rezepte zur Herstellung der Stammlösungen A und B für den Citratpuffer

	Reagenz	Menge
Lösung A	Aqua dest.	500 ml
	Citronensäure	10,5 g
Lösung B	Aqua dest.	1 l
	Natriumcitrat	29,41 g

Nach dieser Abkühlungsphase wurden die Schnitte in eine Feuchte Kammer (6 Schnitte pro Kammer) verbracht. Um eine konstante Luftfeuchte in der geschlossenen Kammer zu erreichen, wurde in diese ein Papiertuch gelegt, das mit ca. 2 ml PBS-Lösung angefeuchtet wurde. Zum Einlegen wurden die Schnitte einzeln aus dem Glasgestell genommen und der Objektträger um das Gewebe herum und auf der Rückseite mit einem Papiertuch getrocknet.

Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörper zu reduzieren, wurden Antigene, die mit unspezifischen Ziegen-Antikörpern kreuzreagieren könnten, in einer 10:1 Mischung aus PBS mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) und Rotiblock, die 20 % Ziegen-Normalserum (GNS, *goat normal serum*) enthält, blockiert (Zusammensetzung siehe **Tabelle 17**). Jeweils 190 µl dieser Lösung wurden auf jeden Schnitt aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit je 1 ml PBS gespült und mit Papiertüchern um das Gewebe herum getrocknet. Das pCftr-N1 Serum und das Präimmenserum wurden mit einer 2%igen BSA/PBS-Lösung in der entsprechenden Stärke verdünnt. Von dieser Mischung wurden jeweils 190 µl pro Schnitt aufgetragen und über Nacht bei +4 °C inkubiert.

Tabelle 17 Zusammensetzung der Lösung zum Blocken unspezifischer Antikörper

Reagenz	Eingesetztes Volumen für 29 Schnitte
PBS/2 % BSA	4176 µl
Rotiblock	464 µl
GNS	1160 µl

PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung. BSA: bovines Serumalbumin. GNS: Ziegennormalserum

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend drei Mal mit einer Lösung bestehend aus einer 0,05 % Triton X-100 Lösung/PBS gespült. Auf diese Weise wurden die Kaninchen-Antikörper, die nicht an Schweine-Antigene im Gewebe gebunden waren, abgespült. Um die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit einem mit Biotin konjugierten Zweitantikörper, der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet ist und in der Ziege hergestellt wurde, gekoppelt (*goat anti-rabbit* igG (biotin)). Dieser Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung mit PBS von 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Lösung bestehend aus einer 0,05 % Triton X-100 Lösung/PBS gespült.

An den Zweitantikörper wurde mittels der *avidin-biotin-peroxidase complex solution* (VECTASTAIN® Elite ABC kit) ein Farbstoff gekoppelt. Hierfür wurden nach Herstellerangaben je nach benötigter Menge Lösung A und B mit PBS miteinander verrührt, z. B. je 100 µl der Lösung A und B in 5 ml PBS. Diese Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 190 µl auf einen Schnitt pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, in Glasgestellen in Glasfärbekästen verbracht und hier noch einmal gespült. Die Farbreaktion wurde mit Diaminobenzidine (DAB) nach Herstellerangaben ausgelöst, wodurch ein in Alkohol unlöslicher brauner Farbstoff gebildet wird. Je nach benötigter Menge wurde eine DAB-Tablette in 50 ml Aqua dest. unter Rühren aufgelöst und die Lösung anschließend durch einen Filter in einen Glasfärbekasten gegeben. Durch Zugabe von 50 µl einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung wurde die Reaktion ausgelöst. Die Schnitte wurden in einem Glasgestell in das Gefäß gestellt und für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zwei Mal in Aqua dest. gewaschen und 9 Minuten in Aqua dest. ruhen gelassen.

Um die Zellstrukturen besser unter dem Mikroskop beurteilen zu können, wurden die Schnitte für eine Minute mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt und die Schnitte in Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar blieb. Anschließend ruhten die Schnitte für 10 Minuten zum Bläuen in Leitungswasser. Nach einer Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in Xylol (siehe **Tabelle 18**) wurden die Schnitte mit Roti® Histokit und Deckgläsern eingedeckt.

Tabelle 18: *Protokoll der Dehydration der immunhistologischen Schnitte*

	Reagenz	Zeit
1.	Aqua dest.	3 min
2.	Ethanol 70 %	3 min
3.	Ethanol 96 %	3 min
4.	Ethanol 96 %	3 min
5.	Ethanol 100 %	3 min
6.	Ethanol 100 %	3 min
7.	Xylol 96 %	3 min
8.	Xylol 96 %	3 min

4.17 Auswertung der immunhistologischen Schnittpräparate

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte mittels eines Olympus BX41 Mikroskops. Dabei wurde für jede Charge an immunhistologisch gefärbten Schnitten zunächst eine Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der Färbung durchgeführt. Dazu wurden die mitgeführten Positivkontrollen auf die Sichtbarkeit der für das jeweilige Gewebe typischen, bräunlichen Signale hin untersucht. Erst wenn diese vorlagen, wurden die zu untersuchenden Schnitte auf sichtbare Signale hin untersucht. Wurden entsprechende Signale gefunden, erfolgte eine Kontrolle der ähnlichen Region in der zugehörigen Negativkontrolle. Nur wenn in der Negativkontrolle keine sichtbare Färbung zu sehen war, wurde das Signal als spezifisch angesehen. Die Beurteilung der Signalstärke erfolgte subjektiv und wurde in gering, mittel und stark eingeteilt, je nach Häufigkeit der Signale innerhalb einer Zelle und Häufigkeit von Zellen mit positiven Signalen im untersuchten Gewebe.

5 Untersuchungsergebnisse

5.1 Ct-Werte der einzelnen Gene in den untersuchten Proben

Die mRNA von den GOI *pCFTR*, *pSCNN1B*, *pCLCA1* und *pCLCA4a* konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt im untersuchten Material des Respirationstraktes und Dickdarms nachgewiesen werden. Dabei spricht ein höherer Ct-Wert im Allgemeinen für eine geringere Kopienzahl des Gens in der untersuchten Probe. Die plattennormalisierten Ct-Werte pro 50 ng cDNA (IRC siehe 4.11) für die vier GOI und die der in den jeweiligen Geweben am stabilsten exprimierten HK sind in **Abbildung 4** bis **Abbildung 8** abgebildet. Diese Ct-Werte lagen für *pCFTR* zwischen 28,12–31,51 (Trachea), 27,87–31,52 (Lunge) bzw. 26,68–27,99 (Dickdarm). Dabei war im bronchusreichen Lungenspitzenlappen ein niedrigerer Ct-Wert sowohl am 56. GT als auch bei den adulten Sauen besonders auffällig. Bei *pSCNN1B* lagen die plattennormalisierten Ct-Werte zwischen 29,94–32,30 (Trachea), 28,27–33,78 (Lunge) bzw. 29,88–35,81 (Dickdarm). Dabei waren in beiden Lungenanteilen deutlich niedrigere Ct-Werte im dritten Trimenon und im Dickdarm deutlich niedrigere Ct-Werte in der postnatalen Phase auffällig. Für *pCLCA1* lagen die plattennormalisierten Ct-Werte zwischen 22,69–31,21 (Trachea), 27,94–32,55 (Lunge) bzw. 23,21–35,22 (Dickdarm). Dabei fielen niedrigere Ct-Werte in beiden Lungenanteilen am Beginn des zweiten Trimenon sowie im Dickdarm im dritten Trimenon und der postnatalen Phase auf. In beiden Tracheaanteilen waren am 37. GT deutlich höhere Ct-Werte als an den übrigen Zeitpunkten sichtbar. Für *pCLCA4a* lagen die plattennormalisierten Ct-Werte zwischen 31,99–37,10 (Trachea), 30,87–37,31 (Lunge) bzw. 22,20–35,22 (Dickdarm). Dabei fielen vor allem im Dickdarm im zweiten und dritten Trimenon deutlich niedrigere Ct-Werte auf. Im alveolarreichen Lungenhauptlappen war *pCLCA4a* im zweiten Trimenon nicht bei allen Feten am jeweiligen Zeitpunkt nachweisbar, weswegen für diese Zeitpunkte keine statistische Auswertung für *pCLCA4a* durchgeführt wurde.

Auch für einzelne HK zeigte sich eine leichte Schwankung der plattennormalisierten Ct-Werte. So fiel für *pSDHD* und *pYWHAZ* im bronchusreichen Lungenspitzenlappen und der kranialen Tracheaanteile ein leicht höherer Ct-Wert im zweiten Trimenon (64. bzw. 56. GT) und postnatal auf. Im alveolarreichen Lungenhauptlappen fielen für *pβ2M* leicht niedrigere Ct-Werte im dritten Trimenon und postnatal auf. Diese leichten Schwankungen der plattennormalisierten Ct-Werte der HK unterstreicht die Wichtigkeit, die Stabilität der HK-Expression zu überprüfen (siehe 4.10 für GeNorm-Analyse und 6.4 für Methodenkritik).

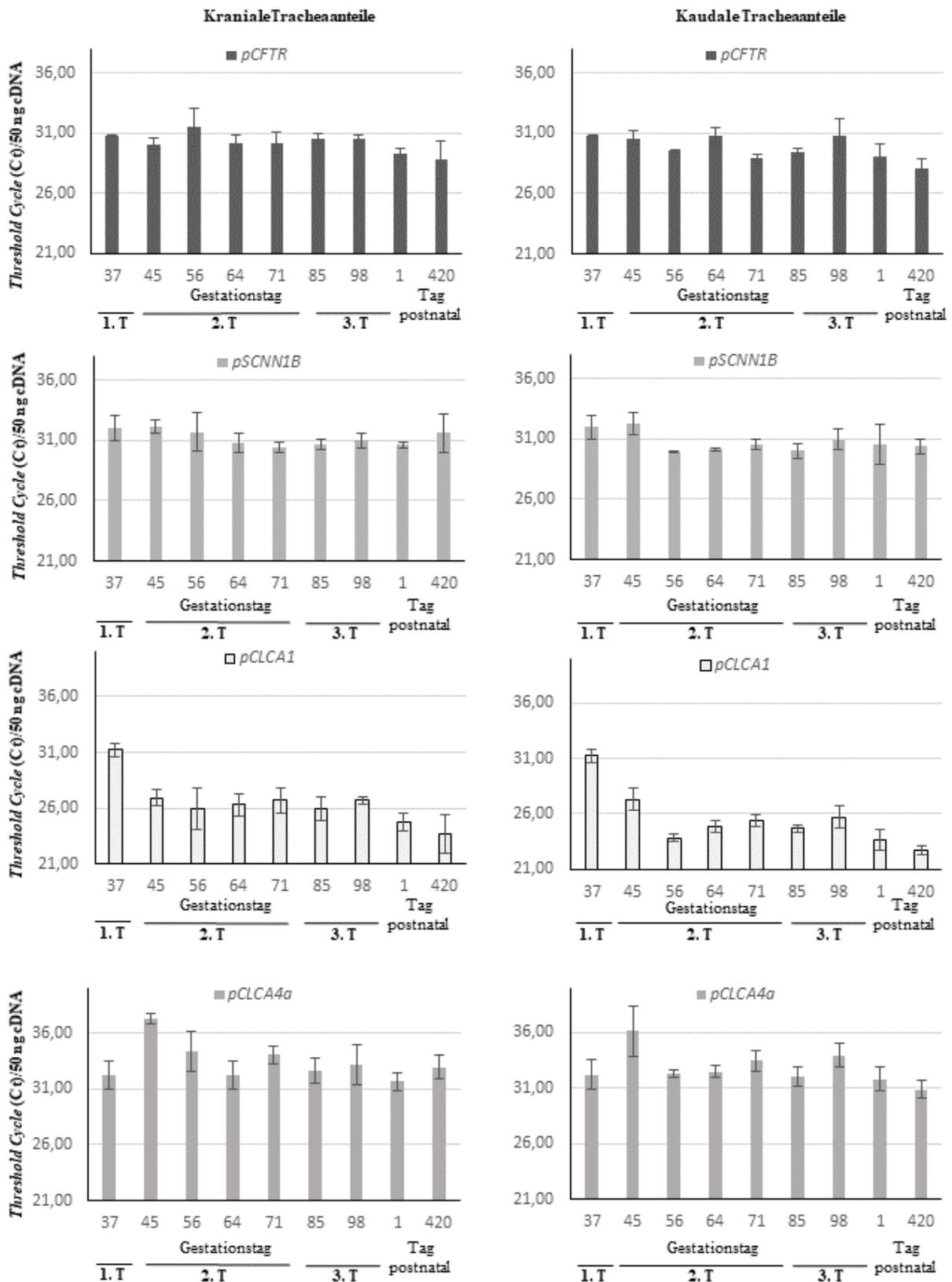


Abbildung 4: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a in den kranialen und kaudalen Tracheaabschnitten.

Für alle untersuchten Gene zeigten sich schwankende Ct Werte. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte in dem jeweiligen Gen und Zeitpunkt dar. $n = 3-7$. T = Trimenon.

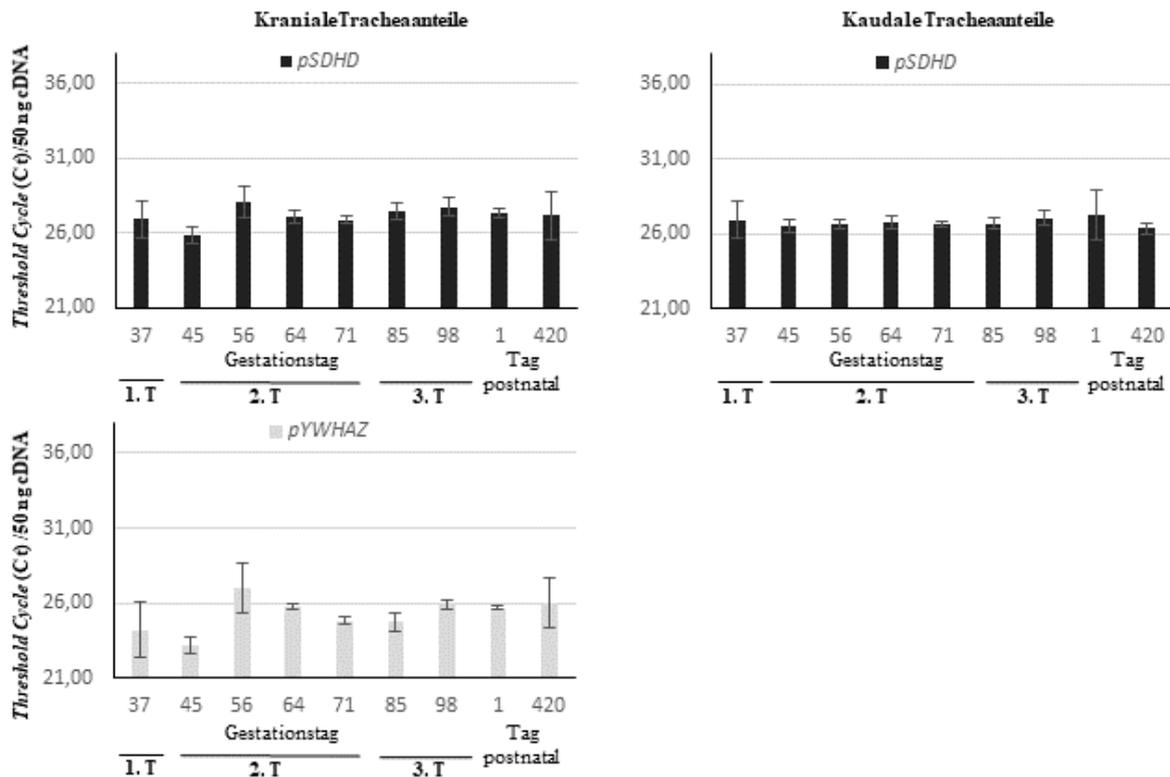


Abbildung 5: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der in den kranialen und kaudalen Tracheaabschnitten stabilsten Housekeeping Gene *pSDHD* und *pYWHAZ*.

Für alle untersuchten Gene zeigten sich schwankende Ct Werte. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte in dem jeweiligen Gen und Zeitpunkt dar. $n = 3-7$. T = Trimenon.

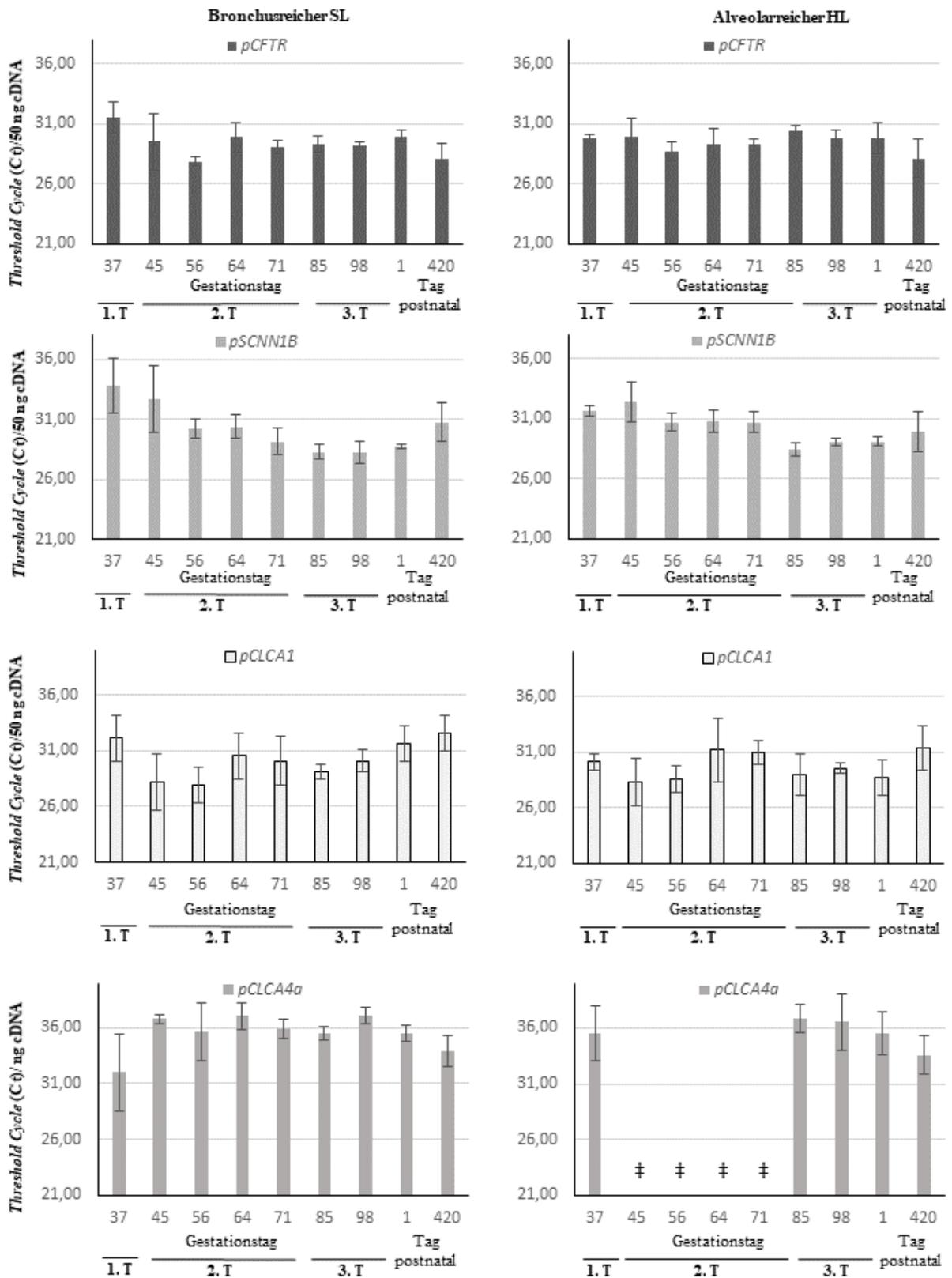


Abbildung 6: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a in den bronchusreichen und alveolarreichen Lungenanteilen.

Für alle untersuchten Gene zeigten sich schwankende Ct Werte. Im zweiten Trimenon konnte pCLCA4a nur bei einzelnen Tieren nachgewiesen werden. ‡: Ein Zeitpunkt mit weniger als 3 Tieren, bei denen eine Expression nachweisbar war, wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte in dem jeweiligen Gen und Zeitpunkt dar. n = 3-7. HL = Hauptlappen. SL = Spitzenlappen. T = Trimenon.

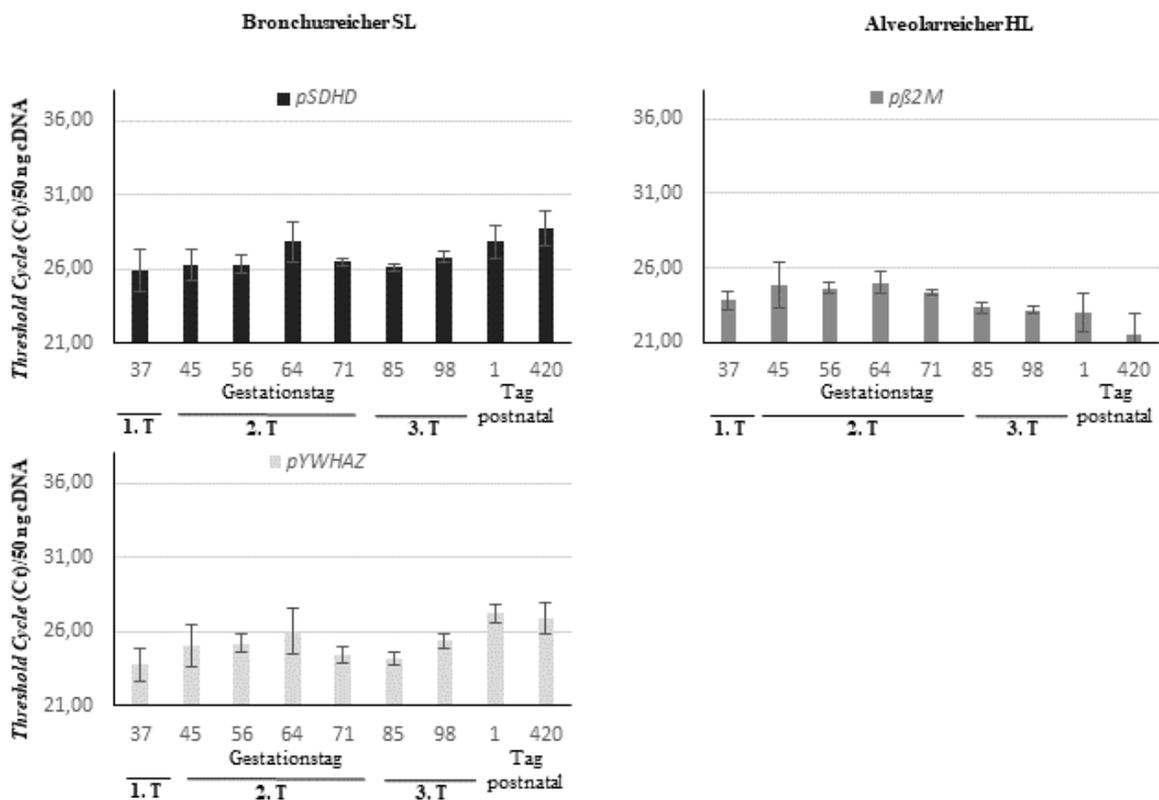


Abbildung 7: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der in den bronchusreichen und den alveolarreichen Lungenanteilen stabilsten Housekeeping Gene pSDHD, pβ2M und pYWHAZ.

Für die untersuchten HK zeigten sich leicht schwankende Ct Werte. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte in dem jeweiligen Gen und Zeitpunkt dar. n = 3-7. T = Trimenon.

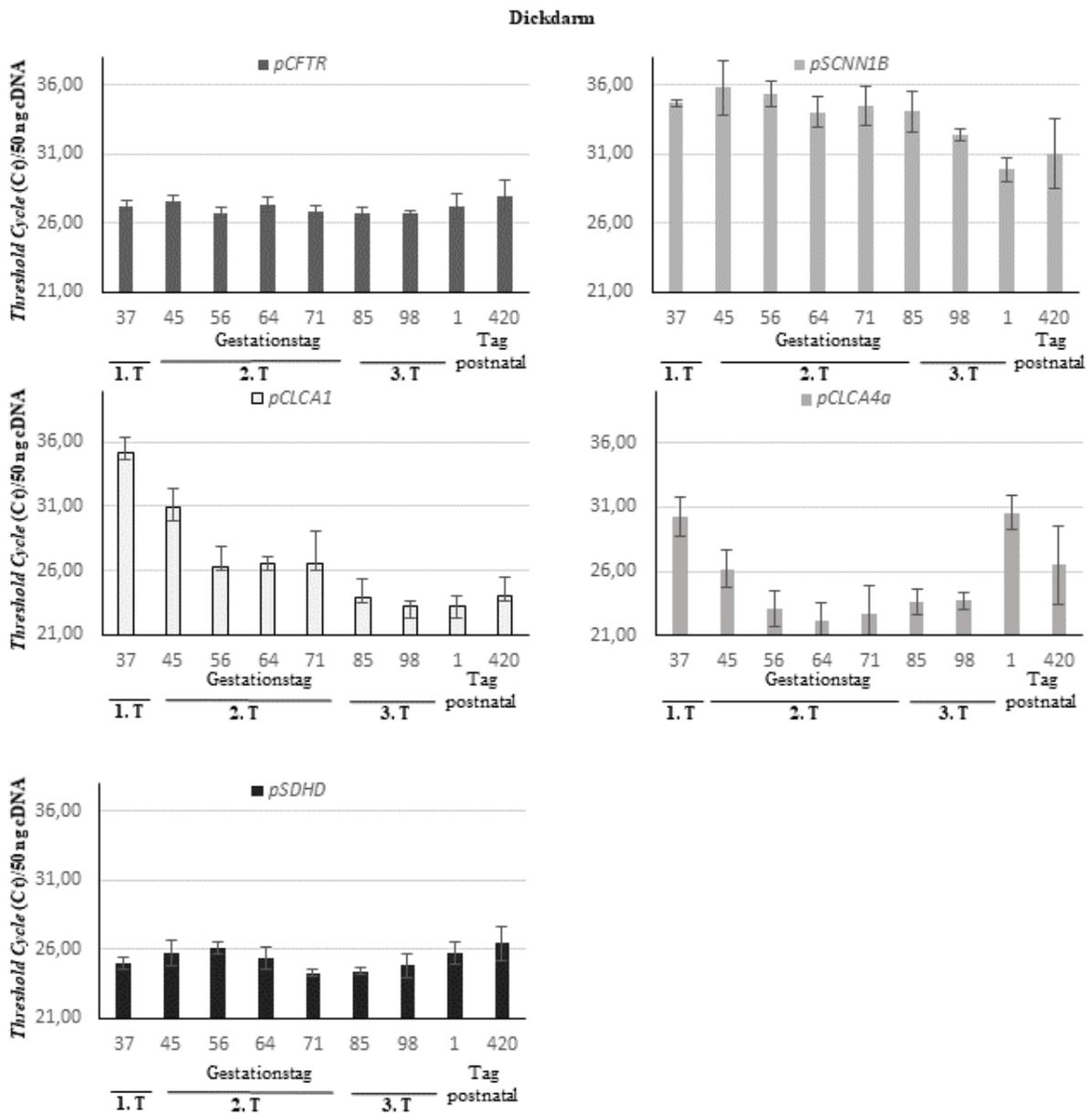


Abbildung 8: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene *pCFTR*, *pSCNN1B*, *pCLCA1* und *pCLCA4a* im Dickdarm und des hier stabilsten Housekeeping Gens *pSDHD*.

Es zeigten sich schwankende Ct Werte. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Einzelwerte in dem jeweiligen Gen und Zeitpunkt dar. $n = 3-7$. T = Trimenon.

5.2 Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene in der Trachea

Die relative Expression von *pCFTR*, also die *pCFTR*-Expression im Verhältnis zu den jeweils stabilsten HK, verlief in der kranialen Trachea in einer doppelten Wellenform, wobei die Spitzen der Expression im zweiten Trimenon und im postnatalen Zeitfenster lagen. Insgesamt war die erhöhte Expression gering bis mäßig ausgeprägt. Im Detail betrachtet stieg die Expression in der kranialen Trachea vom 37. GT ausgehend konstant bis zu einem ersten Höhepunkt am 64. GT (5-fach, $p < 0,05$) an (**Abbildung 9**). Von hier aus sank die relative Expression bis zum Anfang des dritten Trimenon ab und stieg zur Geburt hin wieder an. Die Expression bei neugeborenen und adulten Tieren lag merklich über der der Feten mit der höchsten relativen Expression in den Sauen (15-fach, $p < 0,001$). In der kaudalen Trachea war die doppelte Wellenform ebenfalls sichtbar, jedoch deutlich geringer ausgeprägt als in der kranialen Trachea. Die beiden Spitzen der Wellen lagen in der kaudalen Trachea ebenfalls im zweiten Trimenon und im postnatalen Zeitfenster. Ab dem 37. GT stieg die relative Expression von *pCFTR* bis zum 56. GT leicht an, sank danach wieder und erreichte den ersten, statistisch signifikanten Höhepunkt am 71. GT (5-fach, $p < 0,05$). Hiernach sank die Expression zur Geburt hin ab. Das Expressionsniveau lag bei den neugeborenen und adulten Tiere auf gleichem Niveau und bei beiden leicht über dem der Feten (Sauen 7-fach, $p < 0,001$).

Die relative Expression von *pSCNN1B* verlief in beiden Abschnitten der Trachea während der fetalen Entwicklung ähnlich, wobei sich ab dem 45. GT ein Plateau abzeichnete. Die relative Expression war insgesamt nur gering erhöht. Im Detail war die relative Expression am 37. und 45. GT auf einem Niveau und stieg dann sprunghaft zum 56. GT an (**Abbildung 9**). Ab hier blieb die Expressionshöhe auf einem konstanten, erhöhtem Niveau bei den folgenden fetalen Zeitpunkten, den neugeborenen und adulten Tieren. Die höchste, relative Expression fand sich in den neugeborenen Ferkeln (kranialer Abschnitt 9-fach, $p < 0,01$ bzw. kaudaler Abschnitt 5-fach, $p < 0,05$).

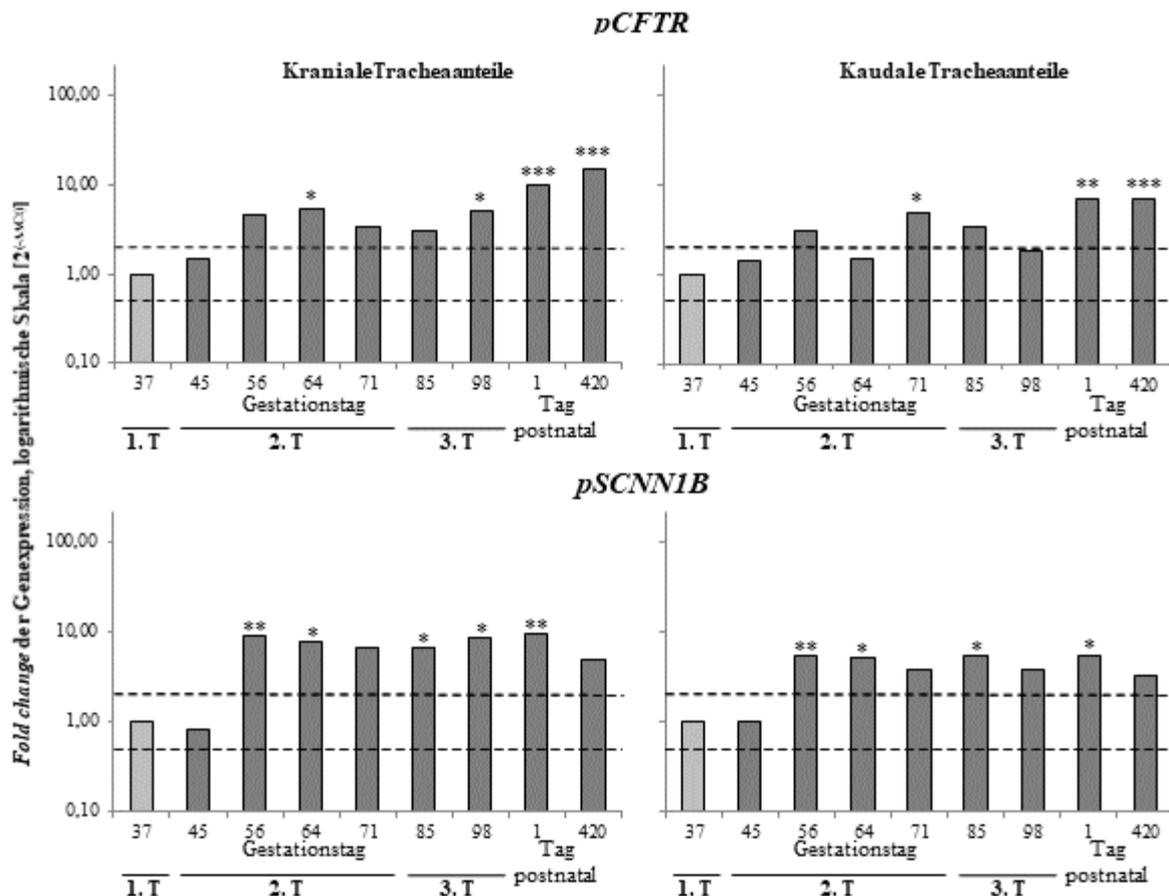


Abbildung 9: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCFTR und pSCNN1B in der Trachea.

Die pCFTR-Expression zeigte in der Trachea einen zweiphasigen Verlauf mit der höchsten relativen Expression in neugeborenen und adulten Tieren. Die Expression von pSCNN1B war in der Trachea ab dem 56. Gestationstag konstant erhöht. Der Graph zeigt das Vielfache des Delta Delta Ct auf einer logarithmischen Skala, wobei der 37. Trächtigkeitstag von jeder Organprobe als Referenzpunkt fungiert (hellgrau). Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Expression zwischen 0,5 und 2 als Bereich der normalen biologischen Varianz in Geweben. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ verglichen mit dem 37. Trächtigkeitstag je Organprobe. $n = 4-7$.

Die relative Expression von pCLCA-1, einem zellulären Marker für Becherzellen im Respirations- und Intestinaltrakt (Plog, Mundhenk et al. 2009), zeigte insgesamt ein deutlich höheres Expressionsniveau als das von pCFTR und pSCNN1B. In der zeitlichen Entwicklung wies die relative Expression von pCLCA-1 einen zweigipfligen, wellenförmigen Verlauf auf, wobei sich die höchsten Werte im zweiten Trimenon und den postnatalen Stadien befanden.

Die *pCLCA-1*-Expression stieg im kranialen Tracheaabschnitt ausgehend vom 37. GT bis zum ersten Höhepunkt am 56. GT (274-fach, $p < 0,01$) an (**Abbildung 10**). Von hier aus sank das Expressionsniveau leicht ab, verblieb insgesamt im restlichen zweiten und ganzen dritten Trimenon aber auf einem deutlich erhöhten Level. Bei den neugeborenen und adulten Schweinen war die Expression ähnlich stark erhöht wie am 56. GT, mit der höchsten Expression bei den adulten Sauen (689-fach, $p < 0,001$). In den kaudalen Tracheaabschnitten zeigte sich ein nahezu gleicher Verlauf für *pCLCA-1* wie in den kranialen Tracheaabschnitten. Einzig das Expressionsniveau nach dem ersten Höhepunkt am 56. GT (221-fach, $p < 0,01$) verblieb auf einem leicht höheren Expressionsniveau als in den kranialen Tracheaabschnitten mit einer statistisch signifikanten Erhöhung der Expression am Beginn des dritten Trimenon (85. GT, 128-fach, $p < 0,5$).

Im Gegensatz zu *pCLCA-1* zeigte das Expressionsmuster von *pCLCA-4a*, dessen Protein postnatal in Epithelzellen des Respirations- und Intestinaltrakts, außer Becherzellen, exprimiert wird (Plog, Grotzsch et al. 2012), in den kranialen Tracheaabschnitten eine nahezu gleichbleibendes Expressionsniveau, das sich bis auf zwei Ausnahmen kaum von der Expressionshöhe am 37. GT unterschied (**Abbildung 10**). Die erste Ausnahme war eine deutlich geringere, jedoch nicht statistisch signifikante Expression am 45. GT. Die zweite Ausnahme war eine leicht erhöhte Expression bei neugeborenen Ferkeln (6-fach, $p < 0,5$). Die Expressionshöhe lag wieder auf einem ähnlichen Expressionsniveau wie der 37. GT. Die Expression in den kaudalen Tracheanteilen zeigte ein sehr ähnliches Muster wie in den kranialen Tracheanteilen, jedoch ohne statistisch signifikante Erhöhungen. Auch hier fand sich eine deutlich geringere, jedoch nicht statistisch signifikante Expression.

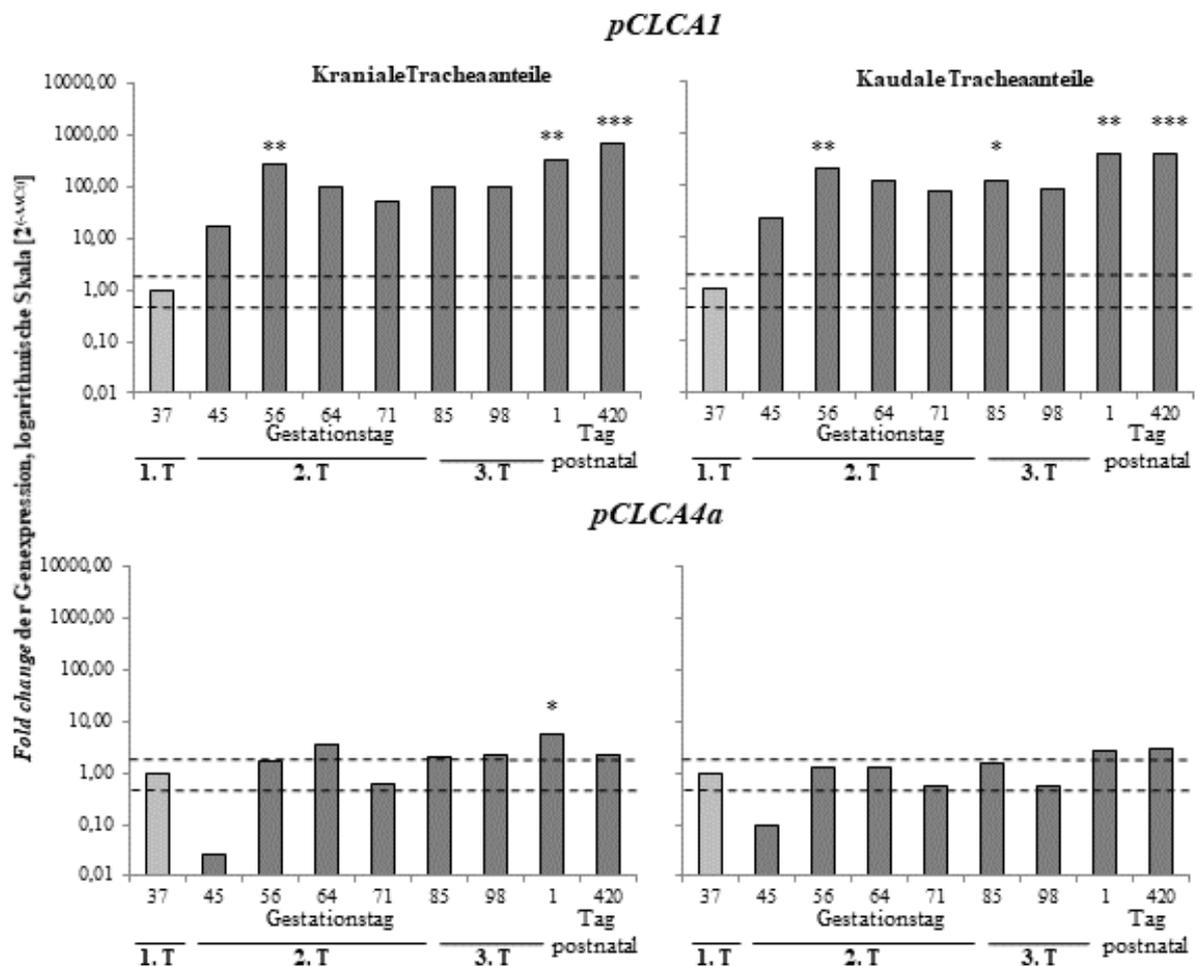


Abbildung 10: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCLCA1 und pCLCA4a in der Trachea.

Das Expressionsmuster von pCLCA-1 zeigte in beiden Tracheaabschnitten einen vergleichbaren Verlauf, mit einem ähnlich hohen Expressionsniveau ab dem 56. GT. Die Expression von pCLCA-4a verblieb mit Ausnahme einer deutlich geringeren Expression am 45. GT in beiden Tracheaabschnitten zu allen Zeitpunkten auf einem ähnlichen Niveau wie am 37. GT. Der Graph zeigt das Vielfache des Delta Delta Ct auf einer logarithmischen Skala, wobei der 37. Trächtigkeitstag von jeder Organprobe als Referenzpunkt fungiert (hellgrau). Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Expression zwischen 0,5 und 2 als Bereich der normalen biologischen Varianz in Geweben. n = 3-7. *p<0,5, **p<0,01, ***p<0,001 verglichen mit dem 37. Trächtigkeitstag je Organprobe.

5.3 Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene in der Lunge

Die relative Expression von *pCFTR* zeigte im bronchusreichen Spitzenlappen einen zweigipfligen, wellenförmigen Verlauf, deren Gipfel sich im zweiten Trimenon und den postnatalen Stadien befanden. Dieser Verlauf ähnelt dem in der kranialen Trachea, wobei die relative Expression im bronchusreichen Spitzenlappen im Vergleich zu den entsprechenden HK auf einem höheren Niveau lag. Die Expression stieg vom 37. GT bis zum höchsten Expressionslevel in der fetalen Phase am 56. GT (23-fach, $p < 0,01$) an (**Abbildung 11**). Anschließend fiel das Niveau bis zum 85. GT zunächst ab und stieg von hier zur Geburt hin wieder an. Die höchste relative Expression im bronchusreichen Spitzenlappen in allen untersuchten Zeitpunkten zeigte sich bei den Sauen (82-fach, $p < 0,001$). Im alveolarreichen Hauptlappen hingegen fand sich ein eingipfliger, wellenförmiger Verlauf, dessen Gipfel sich im zweiten Trimenon befand. Die Expression stieg bis zu diesem Höhepunkt am 56. GT an (4-fach) und fiel bis zum 85. GT wieder ab. Von hier aus blieb die Expression auf einem konstanten Niveau während des dritten Trimenon und der postnatalen Phase, das unterhalb der Expressionshöhe des 37. GT lag.

Im bronchusreichen Spitzenlappen stieg die relative Expression von *pSCNN1B* während der fetalen Entwicklung immer weiter an (**Abbildung 11**). In den neugeborenen Ferkeln erreichte diese dann ihren Höhepunkt (208-fach, $p < 0,001$). Diese Expression im bronchusreichen Spitzenlappen ist damit deutlich höher als die Expression in der Trachea. Wie bei der *pCFTR*-Expression ist die Expression von *pSCNN1B* im alveolarreichen Hauptlappen jedoch deutlich niedriger als im bronchusreichen Spitzenlappen und liegt insgesamt auf einem niedrigen Niveau. Die relative Expression stieg bis zum 85. GT auf seinen höchsten Punkt (7-fach, $p < 0,01$) und fiel anschließend zur Geburt hin ab. In den neugeborenen Tieren war das Expressionsniveau vergleichbar mit dem von 98. GT. Das Expressionsniveau bei den adulten Tieren lag unterhalb der des 37. GT und ist damit die niedrigste Expression in dieser Gewebeprobe.

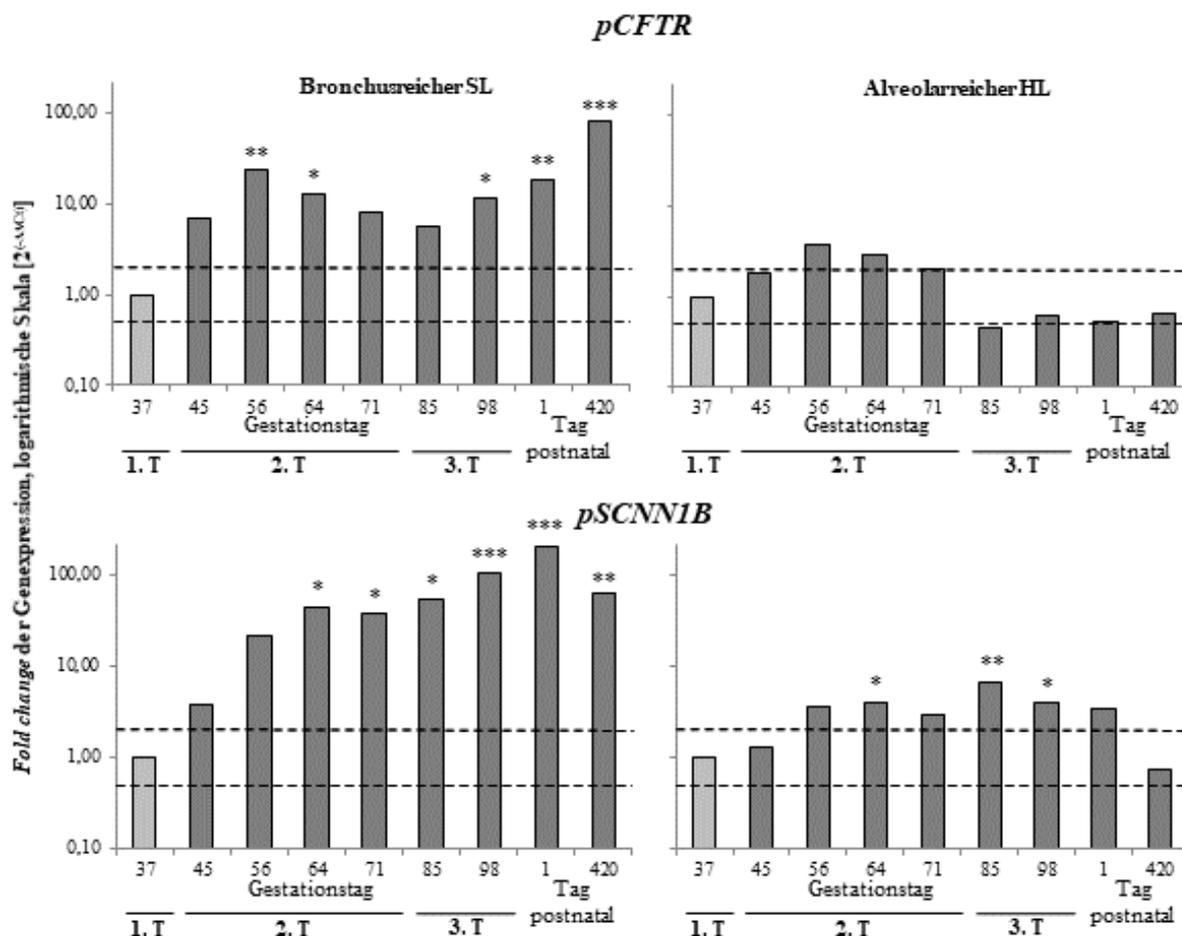


Abbildung 11: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCFTR und pSCNN1B in der Lunge.

Die pCFTR-Expression zeigte im bronchusreichen Spitzenlappen einen zweiphasigen Verlauf mit der höchsten relativen Expression in postnatalen Tieren. Im alveolarreichen Hauptlappen fand sich die höchste relative Expression in der Mitte der Trächtigkeit. Die Expression von pSCNN1B zeigte eine deutlich höhere Expression im bronchusreichen Spitzenlappen, als im alveolarreichen Hauptlappen. Die Graphen zeigen das Vielfache des Delta Delta Ct auf einer logarithmischen Skala, wobei der 37. Trächtigkeitstag von jeder Organprobe als Referenzpunkt fungiert (hellgrau). Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Expression zwischen 0,5 und 2 als Bereich der normalen, biologischen Varianz in Geweben. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ verglichen mit dem 37. Trächtigkeitstag je Organprobe. $n = 3-7$. SL: Spitzenlappen. HL: Hauptlappen

Die relative Expression von *pCLCA-1* zeigt im bronchusreichen Lungenspitzenlappen einen leicht wellenförmigen Verlauf mit der höchsten Erhebung im zweiten Trimenon. Jedoch war keine der gemessenen Expressionen statistisch signifikant. Die Expression stieg vom 37. GT an bis zum 56. GT leicht an und fiel anschließend auf ein ähnliches, leicht erhöhtes Niveau an den folgenden prä- und postnatalen Zeitpunkten ab (**Abbildung 12**). Die Expression der postnatalen Stadien war dabei auf einem ähnlichen Niveau wie am Ende des zweiten Trimenon und dem gesamten dritten Trimenon. Im alveolarreichen Lungenhauptlappen zeigte sich ebenfalls ein leicht wellenförmiger Verlauf mit der höchsten Messung im zweiten Trimenon, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach einer leichten Erhöhung am Beginn des zweiten Trimenons fiel das Expressionslevel wieder auf ein ähnliches Niveau wie am 37. GT ab. Auffällig war eine deutlich niedrigere Expression in den adulten Sauen im Vergleich zum 37. GT, wobei auch diese nicht statistisch signifikant war.

Auch in der Expression von *pCLCA-4a* gab es in beiden Lungenanteilen keine statistisch signifikanten Erhöhungen (**Abbildung 12**). Im Gegensatz zu allen bisherigen Beschreibungen war eine deutlich niedrigere Expression im Vergleich zum 37. GT während des gesamten zweiten und dritten Trimenon auffällig. Somit scheint eine besonders niedrige Expression von *pCLCA-4a* in der gesamten Lunge vorzuliegen. Die neugeborenen und adulten Schweine zeigten wiederum eine ähnlich hohe Expression wie am 37. GT. Im alveolarreichen Lungenhauptlappen konnte *pCLCA-4a* als einziges untersuchtes Gen nicht bei allen Feten nachgewiesen werden. So wurde *pCLCA-4a* am 45., 56. und 64. GT jeweils nur bei zwei Feten, am 71. GT nur bei einem Fetus nachgewiesen. Demzufolge wurde für das zweite Trimenon weder eine *fold change*-Berechnung noch eine statistische Analyse durchgeführt. Im dritten Trimenon und den postnatalen Stadien konnte *pCLCA-4a* auf einem ähnlichen, jedoch leicht niedrigeren Niveau im Vergleich zum 37. GT nachgewiesen werden.

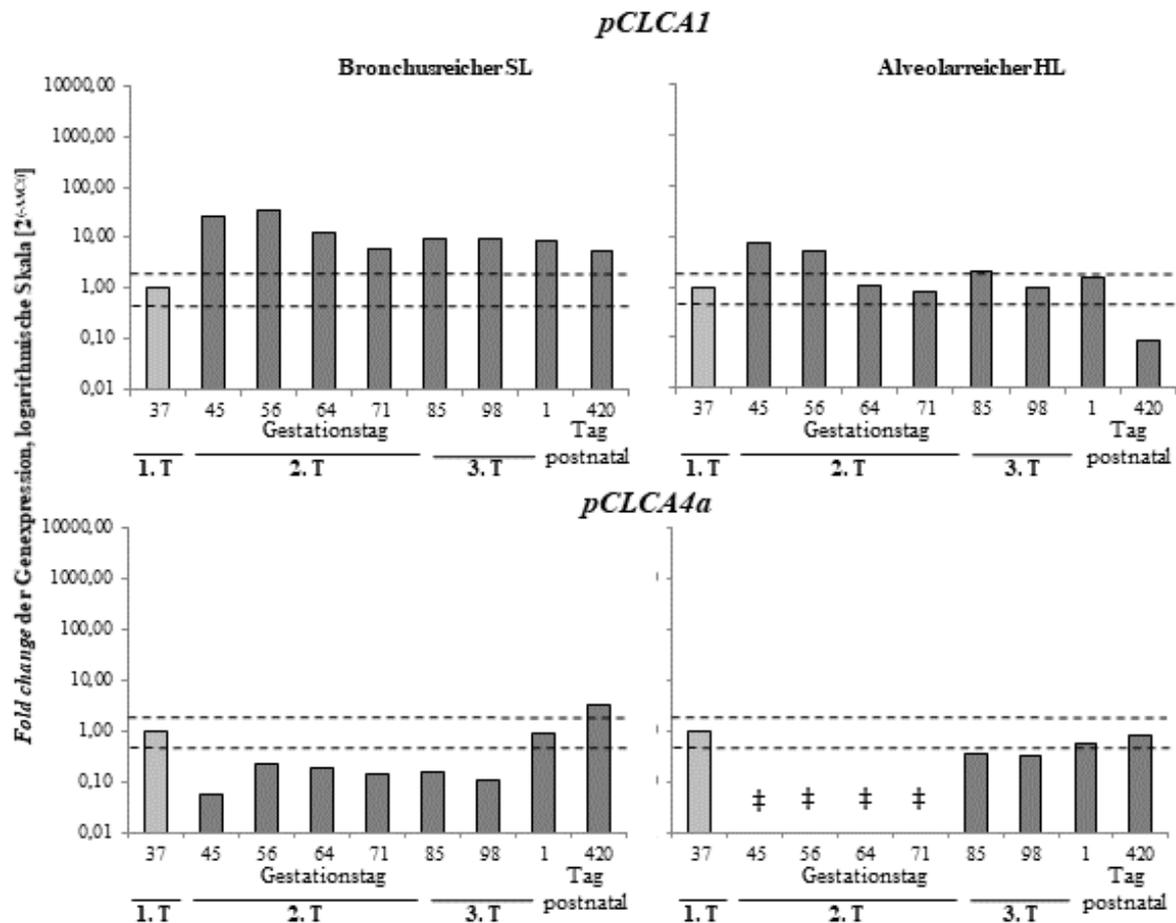


Abbildung 12: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCLCA-1 und pCLCA-4a in der Lunge.

Die relative Expression von pCLCA1 war nur während des Beginns des zweiten Trimenon leicht erhöht. Hiernach blieb die Expression im bronchusreichen Lungenspitzenlappen auf einem leicht erhöhten Niveau, im alveolarreichen Lungenhauptlappen fiel sie auf ein ähnliches Niveau wie beim Referenzpunkt ab. pCLCA4a war während der fetalen Entwicklung niedriger im Vergleich zum Referenzpunkt exprimiert. Im zweiten Trimenon konnte pCLCA4a nicht bei allen Tieren nachgewiesen werden. Die Graphen zeigen das Vielfache des Delta Delta Ct auf einer logarithmischen Skala, wobei der 37. Trächtigkeitstag von jeder Organprobe als Referenzpunkt fungiert (hellgrau). Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Expression zwischen 0,5 und 2 als Bereich der normalen, biologischen Varianz in Geweben. ‡: Ein Zeitpunkt mit weniger als 3 Tieren, bei denen eine Expression nachweisbar war, wurde von der fold change-Berechnung und statistischen Analyse ausgeschlossen. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ verglichen mit dem 37. Trächtigkeitstag je Organprobe. $n = 3-7$. SL: Spitzenlappen. HL: Hauptlappen

5.4 Prä- und postnatale relative mRNA-Expression der untersuchten Gene im Dickdarm

Die Expression von *pCFTR* zeigte während der gesamten fetalen Entwicklung des Dickdarms einen leicht wellenförmigen Verlauf, der sich bis auf eine Ausnahme innerhalb der normalen biologischen Varianz bewegte. Lediglich am 56. GT zeigte sich eine geringe, jedoch statistisch signifikante Erhöhung des Expressionslevels (3-fach, $p < 0,01$, **Abbildung 13**). Das Expressionsniveau der neugeborenen und adulten Tiere lag auf einem ähnlichen Niveau wie während der fetalen Entwicklung des Darms.

Auch die relative Expression von *pSCNN1B* zeigte in der fetalen Entwicklung des Dickdarms einen wellenförmigen Verlauf, der sich innerhalb der normalen biologische Varianz bewegte (**Abbildung 13**). Ab dem 98. GT stieg diese zur Geburt hin leicht an. In neugeborenen und adulten Tieren lag die relative Expression von *pSCNN1B* deutlich über der der Feten und damit auf einem mittleren Niveau, wobei sie am höchsten in den neugeborenen Ferkeln war (48-fach, $p < 0,01$).

Die relative Expression von *pCLCA1* wies einen zweigipfligen, wellenförmigen Verlauf auf, der sich insgesamt auf einem hohen bis sehr hohen Niveau bewegte. Sie stieg bis zum 56. GT stark an (1037-fach, $p < 0,5$), fiel dann ab und stieg ab Beginn des dritten Trimenon erneut an (**Abbildung 13**). Dabei blieb die Expression ab dem zweiten Trimenon auf einem deutlich erhöhten Expressionsniveau. Die größte relative Expression fand sich in den neugeborenen Schweinen (7094-fach, $p < 0,001$). Die Expression in den neugeborenen und adulten Schweinen war insgesamt stark erhöht im Vergleich zum ersten Trimenon, deutlich erhöht im Vergleich zum zweiten Trimenon und auf einem ähnlichen Expressionslevel wie die Werte im dritten Trimenon.

Die relative Expression von *pCLCA4a* wies einen eingipfligen, wellenförmigen Verlauf auf, der sich insgesamt auf einem mittleren Niveau bewegte. Im Detail betrachtet, stieg die Expression im zweiten Trimenon stark bis zum 56. und 64. GT an (307-fach, $p < 0,001$ bzw. 350-fach, $p < 0,001$; **Abbildung 13**). Hiernach sank das Expressionslevel leicht ab und verblieb auch während des dritten Trimenons auf diesem Niveau. In den postnatalen Stadien zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den neugeborenen und adulten Schweinen. Während die relative Expression bei neugeborenen Schweinen auf demselben Niveau lag, wie der Referenzpunkt des ersten Trimenon, war die relative Expression beim adulten Schwein auf einem ähnlich erhöhten Niveau wie bei den Schweinefeten im dritten Trimenon.

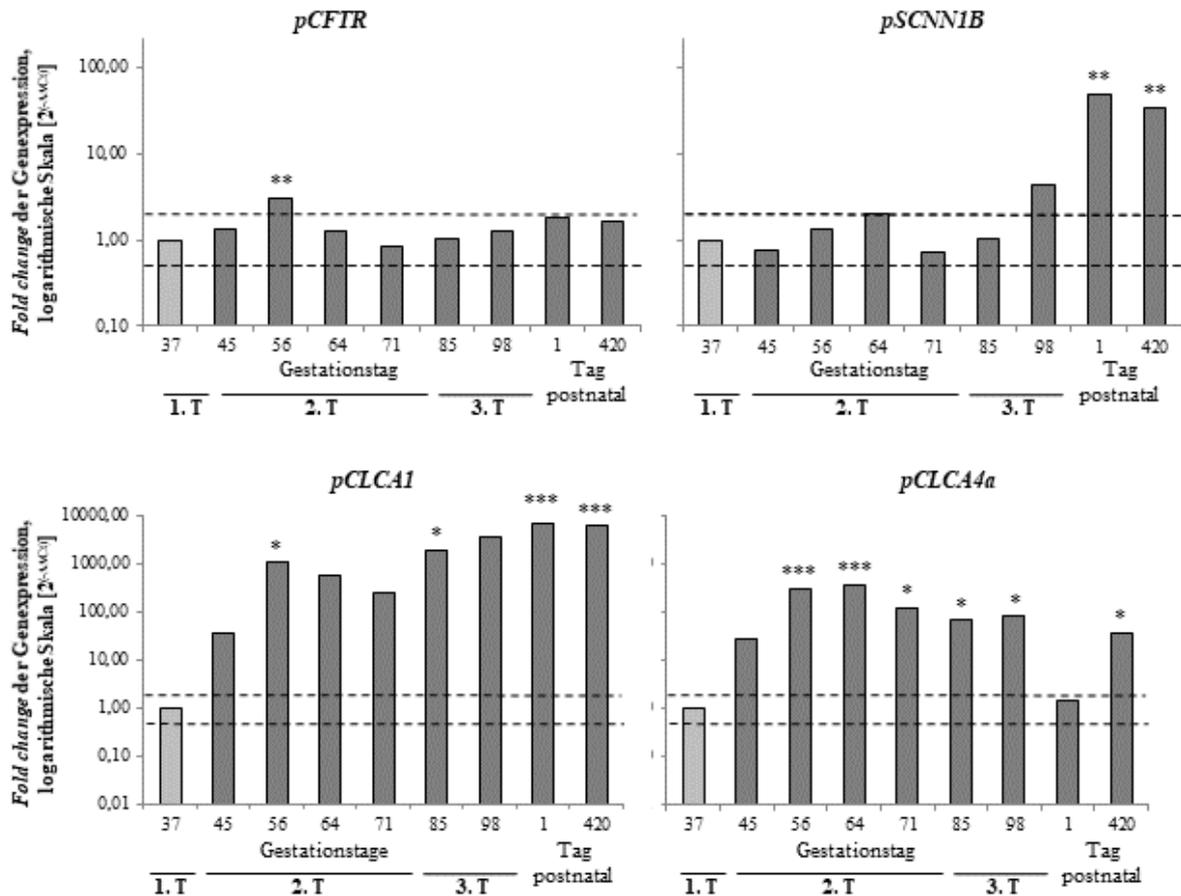


Abbildung 13: Prä- und postnatale mRNA-Expression von pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a im Dickdarm.

Die relative Expression von pCFTR zeigte einen einzelnen Peak am 56. Gestationstag. pSCNN1B war konstant in den fetalen Stadien exprimiert und stieg postnatal an. Die relative Expression von pCLCA1 verlief wellenförmig mit einem ersten Höhepunkt am 56. GT und einem zweiten Höhepunkt bei den neugeborenen Schweinen. Bei pCLCA4a war die Expression im zweiten Trimenon am höchsten, verblieb aber auch im dritten Trimenon und bei den adulten Sauen auf einem erhöhten Niveau. Die Graphen sind das Vielfache des Delta-Delta-Ct auf einer logarithmischen Skala mit dem 37. Trächtigkeitstag als Referenzpunkt. Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Expression zwischen 0,5 und 2 als Bereich der normalen biologischen Varianz in Geweben. *p<0,5, **p<0,01, ***p<0,001 verglichen zum 37. Trächtigkeitstag. n = 4-7. T: Trimenon.

5.5 Zelluläre Lokalisation des pCFTR-Proteins

Die mittels RT-qPCR in allen Stadien nachweisbare mRNA von *pCFTR* konnte als Protein mit der verwendeten Methode nicht in allen Stadien aller Gewebeproben nachgewiesen werden. Besonders auffällig war dies im unteren Respirationstrakt. Das pCFTR-Protein war in der Trachea ausschließlich in Trachealepithelzellen neugeborener Ferkel und Sauen nachweisbar (**Abbildung 14**). Das Farbsignal fand sich in diesen Epithelzellen stets apikal des Zellkerns, eine Region in der sich ebenfalls das endoplasmatische Retikulum befindet. Auffällig war, dass die Färbeintensität in den kaudalen Tracheaabschnitten stärker als in den kranialen Abschnitten war. In allen untersuchten fetalen Stadien war das pCFTR-Protein durch die immunohistochemische Markierung nicht in der Trachea nachweisbar. Ähnlich wie in der Trachea konnte das pCFTR-Protein nur bei neugeborenen und adulten Tieren in den Epithelzellen der Hauptbronchien der Lunge nachgewiesen werden. In beiden Lungenanteilen war pCFTR mit der verwendeten Methode nicht in den Alveolarwänden, sofern diese entwickelt waren, nachweisbar.

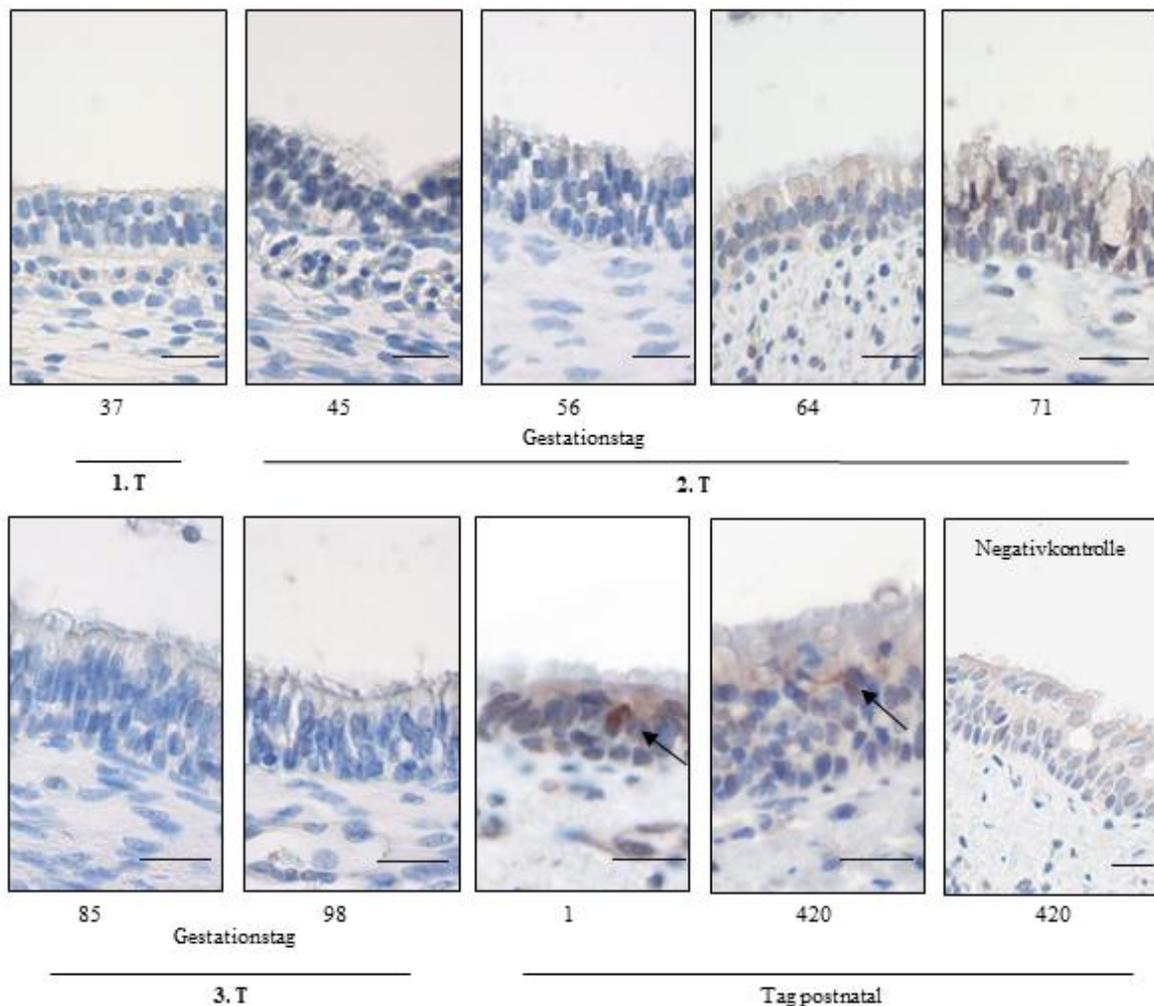


Abbildung 14: Prä- und postnatale Protein-Expression von *pCFTR* in der Trachea.

Das pCFTR-Protein war nur im Trachealepithel von neugeborenen Ferkeln und Sauen nachweisbar (Pfeile), nicht jedoch in den untersuchten fetalen Stadien. Balken 20 μm . n = 4-7. T = Trimenon.

Im Gegensatz zum unteren Respirationstrakt konnte pCFTR im Dickdarm wie auf der mRNA-Ebene auch auf Proteinebene zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen werden (**Abbildung 15**). Das Farbsignal fand sich hier ausschließlich in den Enterozyten des Dickdarms bzw. deren Vorläuferzellen. Die Stärke des immunhistologischen Signals nahm im Verlauf der Epithelausreifung über die fetale Entwicklung hinweg zu und war am deutlichsten in den Sauen ausgeprägt. In den noch unreifen Epithelzellen des Dickdarms am 37. GT, unter denen noch keine Becherzellen identifiziert werden konnten, fanden sich wenige, diffus im Zytoplasma der Epithelzellen verteilte Signale von pCFTR. Ab Beginn des zweiten Trimenon (45. GT) waren erste Becherzellen nachweisbar. Die pCFTR-Signale waren während des zweiten Trimenon weiterhin diffus im gesamten Zytoplasma der Enterozyten verteilt, jedoch deutlich häufiger nahe des Zellkerns sichtbar als noch am 37. GT. Ab Ende des zweiten Trimenons (71. GT) waren Darmkrypten nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt war eine deutliche Häufung der Signale im Bereich der Krypten sichtbar.

Als exprimierende Zellen wurden Enterozyten des unreifen Dickdarms bzw. ab dem 71. GT Enterozyten in den nun differenzierbaren Darmkrypten identifiziert. Während der fetalen Entwicklung waren die scharf demarkierten Signale innerhalb der Zelle diffus verteilt. In den untersuchten postnatalen Stadien waren die immunhistologischen Signale stark perinukleär lokalisiert, einer subzellulären Region, in der sich das endoplasmatische Retikulum (ER) befindet.

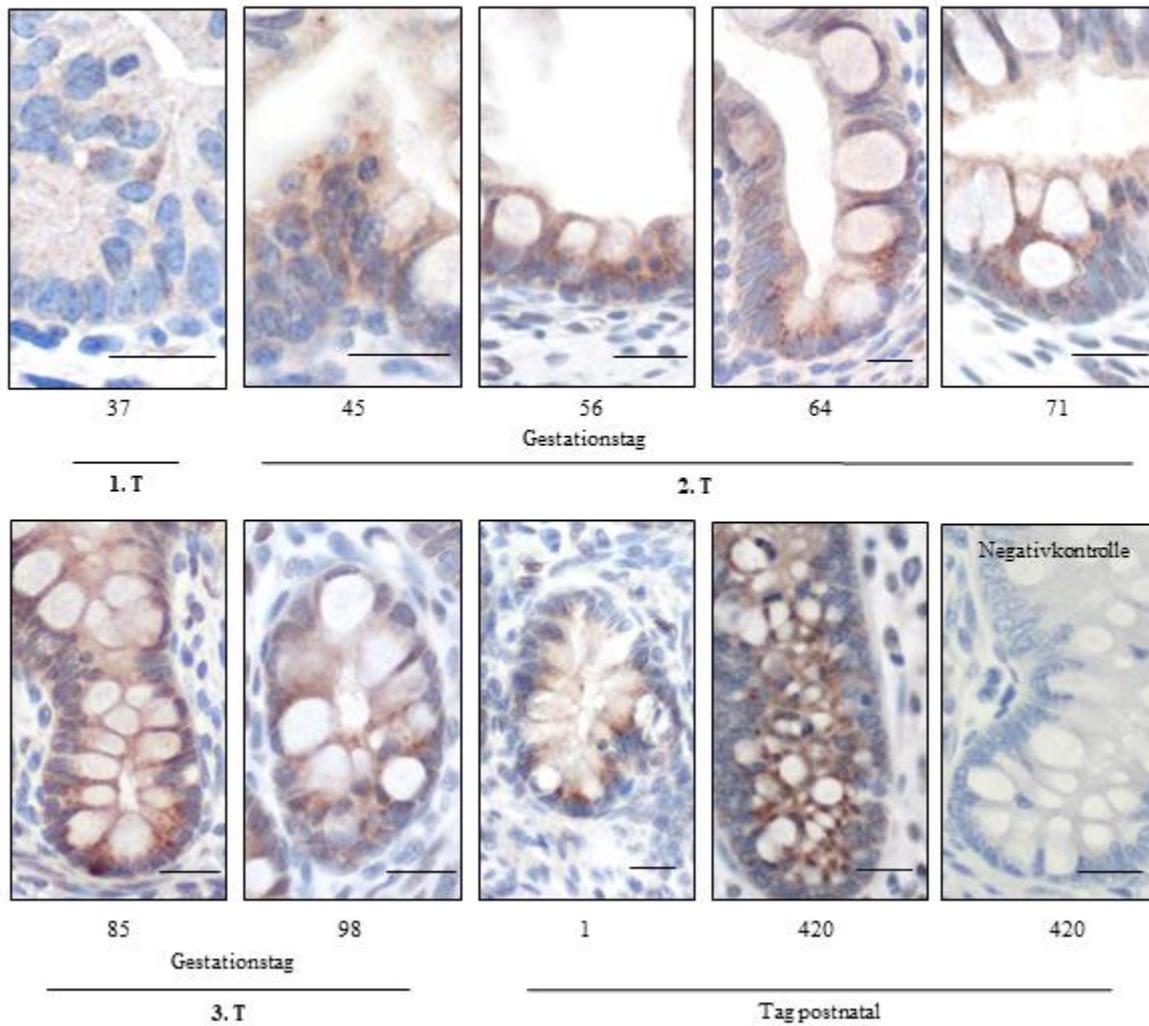


Abbildung 15: Prä- und postnatale Protein-Expression von pCFTR im Dickdarm.

Das Protein war in den Epithelzellen der Krypten bzw. in deren Vorläuferzellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachweisbar. $n = 4-7$. T = Trimenon. Balken = 20 μm.

6 Diskussion

Die Zystische Fibrose (CF) ist eine vererbte Krankheit, die durch Mutationen im *CFTR*-Gen ausgelöst wird. Dadurch kommt es zu verschiedenen Einschränkungen im Ionentransport in exokrinen Epithelzellen vor allem in der Lunge und dem Darm. Neben dem typischen Bild der progressiven Lungenentzündungen und verschiedener Darmpathologien, die überwiegend bei jugendlichen und erwachsenen CF-PatientInnen eine Rolle spielen, treten bereits bei Neugeborenen und Säuglingen mit CF verschiedene anatomische Veränderungen und funktionale Einschränkungen in diesen Organen auf (Gosden und Gosden 1984; Ornoy, Arnon et al. 1987; van der Doef, Kokke et al. 2011; Borowitz und Gelfond 2013). Vor allem die Beobachtung, dass angeborene strukturelle Veränderungen, wie z.B. eine Formveränderung der Trachea und der großen Bronchien sowie eine Tracheomalazie, bei Neugeborenen mit CF ohne klinische Symptome vorliegen können, führte zu der Hypothese, dass *CFTR* auch in der Organentwicklung während der Schwangerschaft eine Rolle spielen könnte (McCray, Reenstra et al. 1992; Broackes-Carter, Mouchel et al. 2002; Larson und Cohen 2005). Punktuelle Untersuchungen in gesunden humanen Feten wiesen ein auffälliges zeit- und gewebeabhängiges Expressionsmuster von *hCFTR* in der Lunge nach, welches sich von dem der anderen Organe deutlich unterscheidet (McGrath, Basu et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Bergougnoux, Rivals et al. 2014).

Da fetale humane Gewebe aufgrund ethischer Aspekte nur punktuell vorliegen, muss für eine systematische Untersuchung der pränatalen Expression von Molekülen bzw. deren Bedeutung bei angeborenen Malformationen auf Tiermodelle zurückgegriffen werden. In den letzten Jahren hat sich das Schwein als bedeutsames Modelltier für die CF etabliert, da die Veränderungen bei neugeborenen und adulten CF-Schweinen vor allem im Respirationstrakt viele Parallelen zu den klinischen und den pathophysiologischen Veränderungen der CF beim Menschen aufweisen (Rogers, Stoltz et al. 2008; Meyerholz, Stoltz et al. 2010; Ostedgaard, Meyerholz et al. 2011; Klymiuk, Mundhenk et al. 2012; Meyerholz, Stoltz et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *pCFTR* in Schweinefeten sowie neugeborenen und adulten Schweinen im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm systematisch untersucht. Dabei wurde vor allem ein Augenmerk auf das zweite Trimenon gelegt, in dem beim Menschen eine auffällig erhöhte Expression in der Lunge gefunden wurde (Trezise, Chambers et al. 1993). Zusätzlich wurde auch die Expression im dritten Trimenon und bei neugeborenen und adulten Schweinen untersucht. Hierfür wurde eine RT-qPCR

etabliert, um pCFTR im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm nachzuweisen. Flankierend wurden die gleichen mRNA-Expressionsmessungen für *pSCNN1B*, das für den Natriumkanal ENaC kodiert und bei der CF eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, pCLCA1 als Marker für Becherzellen (Plog, Mundhenk et al. 2009) und pCLCA4a als Marker für respiratorische und intestinale Epithelzellen, die keine Becherzellen sind (Plog, Grotzsch et al. 2012), untersucht.

6.1 Vergleich der prä- und postnatalen zeit- und gewebeabhängigen Expression von pCFTR und hCFTR im Respirationstrakt und Dickdarm

6.1.1 Expressionsmuster von pCFTR in der Trachea im Vergleich zu hCFTR

In dieser Arbeit konnte die mRNA von *pCFTR* mittels RT-qPCR zu jedem der untersuchten Zeitpunkte am Ende des ersten Trimenon, im zweiten und dritten Trimenon sowie bei neugeborenen und adulten Schweinen in der Trachea nachgewiesen werden. Das deckt sich mit dem Nachweis von *hCFTR* mittels *in situ* Hybridisierung zum Ende des ersten Trimenon (10.-12. SSW), im zweiten Trimenon (17.-21. SSW), dem dritten Trimenon (25.-33. SSW) sowie bei Neugeborenen und Erwachsenen (Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Tizzano, O'Brodovich et al. 1994). Dabei wiesen Tizzano und KollegInnen (1993) *hCFTR* in ähnlicher Menge während der gesamten fetalen Entwicklung der Trachea nach (Tizzano, Chitayat et al. 1993). Auch bei den Schweinefeten unterlag die Expression von *pCFTR* während der fetalen Entwicklung nur wenigen Schwankungen. So fanden sich vor allem im zweiten Trimenon eine erhöhte Expression in den kranialen (64. GT) und kaudalen (71. GT) Tracheaanteilen. Die Expressionshöhe der postnatalen Stadien (neugeborene und adulte Schweine) war in dieser Arbeit auf einem leicht höheren Niveau als in den fetalen Stadien. Vergleichende Studien zwischen fetaler und postnataler Expression von *hCFTR* in der Trachea liegen jedoch bisher nicht vor.

Das pCFTR-Protein konnte mit dem hier verwendeten Antikörperserum im Tracheaepithel mittels Immunhistochemie nur bei den neugeborenen und adulten Schweinen nachgewiesen werden. Zu beiden Zeitpunkten ähneln sich die perinukleären Signalmuster, was dem Bild bei bereits untersuchten adulten Sauen und erwachsenen Menschen entspricht (Engelhardt, Yankaskas et al. 1992; Plog, Mundhenk et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte pCFTR hingegen nicht in den untersuchten pränatalen Stadien der Schweinefeten nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 6.4 Methodenkritik). Gaillard und KollegInnen (1994) konnten beim Menschen das hCFTR-Protein jedoch diffus im Zytoplasma der sich entwickelnden Epithelzellen der Trachea im ersten Trimenon (7. SSW) nachweisen. Am Übergang vom zweiten zum dritten Trimenon (24.-25. SSW) wurde das Signal hauptsächlich

in der apikalen Plasmamembran von zillierten Zellen nachgewiesen, nicht jedoch in den Becherzellen (Gaillard, Ruocco et al. 1994).

Im Gegensatz zu den pCFTR Signalen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, wiesen Meyerholz und KollegInnen 2018 das pCFTR-Protein mittels eines anderen Antikörpers an einer anderen Lokalisation in der Zelle und zu weiteren Zeitpunkten nach. Das pCFTR-Signal war in ihrer Studie in der apikalen Plasmamembran von nicht zillierten Epithelzellen der Trachea zu finden. Diese fanden sich am 60. und 90. GT und bei neugeborenen Schweinen (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Das apikale Signal unterschied sich von dem zellkernnahen Signal, das mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper in den Epithelzellen der Trachea von neugeborenen Schweinen nachgewiesen wurde. Dies könnte an den unterschiedlichen genutzten pCFTR-Epitopen liegen, gegen die die jeweils verwendeten Antikörper gerichtet sind, bzw. an einer unterschiedlichen Sensitivität der Antikörper. Außerdem war das Signal in der Studie von Meyerholz und KollegInnen (2018) bei den neugeborenen Schweinen deutlich stärker als in den untersuchten fetalen Stadien (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Das deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da hier nur in den neugeborenen und adulten Schweinen ein pCFTR-Protein Signal nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch in den pränatalen Stadien. Dies wird durch die Quantifizierung der *pCFTR*-mRNA in der vorliegenden Arbeit unterstützt. In den postnatalen Stadien wurde in beiden Tracheaabschnitten mehr mRNA nachgewiesen als in den pränatalen Stadien.

In den submukosalen Drüsen (SMD) waren bei den Feten, sofern SMD nachweisbar waren, neugeborenen Ferkeln und adulten Sauen mit dem hier verwendeten pCFTR-N1 Antikörperserum keine spezifischen pCFTR-Signale sichtbar. Im Bezug auf die hier untersuchten Sauen bestätigt dies die Ergebnisse von Plog und KollegInnen (2010), die mit dem hier verwendeten Antikörper ebenfalls keine Signale nachweisen konnten (Plog, Mundhenk et al. 2010). Jedoch stehen diese Ergebnisse im starken Gegensatz zu den Beobachtungen beim Menschen, wo in den SMD bei Erwachsenen die meisten Signale gefunden werden (Engelhardt, Yankaskas et al. 1992). Meyerholz und KollegInnen (2018) konnten mittels eines anderen Antikörpers pCFTR in den SMD bei Schweinefeten am 90. GT nachweisen (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Gründe für die unterschiedliche Sensitivität der CFTR-Antikörper wurde oben bereits diskutiert.

6.1.2 Expressionsmuster von pCFTR in der Lunge im Vergleich zu hCFTR

Die mRNA von *pCFTR* konnte in der Lunge zu jedem untersuchten Zeitpunkt der fetalen Entwicklung sowie den neugeborenen und adulten Sauen nachgewiesen werden. Dies deckt

sich mit der mittels *in situ* Hybridisierung beim Menschen nachgewiesenen Expression von *hCFTR* in den luftführenden Wegen der Lunge in der fetalen Entwicklung und bei den Neugeborenen und Erwachsenen (McGrath, Basu et al. 1993; Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Tizzano, O'Brodivich et al. 1994). Die mRNA Nachweise in der Lunge bei der adulten Sau bestätigen außerdem die früheren Ergebnisse mittels konventioneller PCR von Plog et al. (Plog, Mundhenk et al. 2010).

In dieser Arbeit zeigte sich eine auffällige Schwankung von *pCFTR* in der Lunge beim Schwein über die fetale Entwicklung hinweg. Sowohl in den bronchusreichen als auch den alveolarreichen Lungenanteilen fiel ein wellenförmiger Verlauf der *pCFTR*-Expression auf, wobei in beiden Lungenanteilen am 56. GT ein Höhepunkt auftrat. Ab diesem Zeitpunkt fiel in beiden untersuchten Lungenanteilen die Expression bis zum Beginn des dritten Trimenon am 85. GT ab. Eine vergleichbare Erhöhung der Expression fand sich auch im zweiten Trimenon bei humanen Feten (McGrath, Basu et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993).

In den bronchusreichen Lungenabschnitten zeigte sich beim Schwein ein weiterer Anstieg von *pCFTR* am 98. GT, der sich bei den neugeborenen und adulten Schweinen fortsetzte. Dabei lag das Expressionsniveau in den postnatalen Stadien mindestens gleich hoch, in der adulten Sau deutlich höher als das Expressionsniveau in den fetalen Proben. Im alveolarreichen Lungenhauptlappen zeigte sich dieser Trend nicht. Hier fiel die Expression zu Beginn des dritten Trimenon auf ein niedrigeres Level als im ersten Trimenon. Auch die Expression bei den neugeborenen und adulten Tieren verblieb im alveolarreichen Hauptlappen auf diesem Niveau und damit gleich hoch wie im dritten Trimenon bzw. deutlich unter der Expressionshöhe des zweiten Trimenon. Beim Menschen wurde für die luftführenden Wege gezeigt, dass die Menge an *hCFTR*-mRNA in den luftführenden Wegen in Feten größer ist als bei Neugeborenen (Trezise, Chambers et al. 1993) bzw. im zweiten Trimenon höher ist als bei Erwachsenen (McGrath, Basu et al. 1993). Das würde eher dem Expressionsmuster von *pCFTR* ähneln, das in dem alveolarreichen Hauptlappen beim Schwein in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten.

Diese unterschiedliche *pCFTR*-Expressionshöhe in den beiden untersuchten Lungenanteilen könnte unter anderem mit den unterschiedlichen Anteilen an luftführenden Wegen bzw. deren unterschiedlicher pränataler Entwicklung in den untersuchten Lungenanteilen zusammenhängen. So wurde bei der Probennahme in dieser Arbeit darauf geachtet, dass in den Proben des bronchusreichen Spitzenlappens besonders viele Luftwege enthalten waren und in den Proben des alveolarreichen Hauptlappens entsprechend hauptsächlich alveoläres Gewebe und nur wenige luftführende Wege vorhanden war. In den Untersuchungen beim Menschen wurde eine solche Unterscheidung von Proben in der

Lunge nicht gemacht (McCray, Wohlford-Lenane et al. 1992; McGrath, Basu et al. 1993; Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993; Bergougnoux, Rivals et al. 2014). Jedoch ist dies durch die Verwendung der *in situ* Hybridisierung nur bedingt nötig, da hier die *hCFTR*-mRNA exprimierenden Gewebe im Zellverband sichtbar gemacht werden können. Für einen unterschiedlichen Anteil an luftführenden Wegen als Ursache für die unterschiedlich hohen Nachweise von *pCFTR* in den beiden Lungenanteilen könnte die im Vergleich zu *pCFTR* sehr ähnlich verlaufende Expression des Becherzell-Markers *pCLCA1* (Plog, Mundhenk et al. 2009) in den fetalen Zeitpunkten sprechen. Dieser Marker erreichte im bronchusreichen Lungenspitzenlappen ein höheres Expressionslevel als in den alveolarreichen Anteilen. Bei dem zweiten untersuchten Marker *pCLCA4a*, der hauptsächlich in Epithelzellen des Respirationstraktes, die keine Becherzellen sind, exprimiert wird (Plog, Grotzsch et al. 2012), war dieser Unterschied noch auffälliger. Dieser war zwar in den bronchusreichen Lungenanteilen während des zweiten und dritten Trimenon niedriger exprimiert als am 37. GT, konnte jedoch im alveolarreichen Lungenhauptlappen nicht bei allen untersuchten Feten nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf den nur geringen Anteil an Luftwegen und deren Epithelzellen zurückzuführen.

Das *pCFTR*-Protein konnte in dieser Arbeit in den Lungenproben mittels dem *pCFTR*-N1 Antikörperserum ähnlich wie in der Trachea, nur bei den neugeborenen und adulten Schweinen nachgewiesen werden. Gaillard und KollegInnen (1994) wiesen bei humanen Feten ein schwaches, diffus im Zytoplasma verteiltes *hCFTR*-Signal in den undifferenzierten Epithelzellen der luftführenden Wege im ersten Trimenon (7. SSW) nach. Am Übergang des zweiten zum dritten Trimenon (24.–25. SSW) wurde das *hCFTR*-Protein in der apikalen Plasmamembran zillierter Epithelzellen nachgewiesen, nicht jedoch in Becherzellen (Gaillard, Ruocco et al. 1994). Diese Entwicklung von einem zunächst diffusen Signal im Zytoplasma im ersten Trimenon hin zu einem Signal, das ab etwa der Mitte der Schwangerschaft in der apikalen Zellmembran lokalisiert ist, konnte auch durch Marcorelles und KollegInnen (2007) in Epithelzellen der luftführenden Wege bestätigt werden (Marcorelles, Montier et al. 2007). In den Bronchien war das Signal von *hCFTR* diffus im Zytoplasma sowohl der zillierten als auch der noch undifferenzierten Epithelzellen zu finden. Dabei nahm die Signalstärke im Epithel der luftführenden Wege von den kleineren Bronchien zu den distalen respiratorischen Bronchiolen hin ab (Gaillard, Ruocco et al. 1994).

Meyerholz und KollegInnen (2018) konnten mittels eines anderen Antikörpers das *pCFTR*-Protein bei Schweinefeten im ersten Trimester (36. GT) in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen der sich entwickelnden Luftwegen nachweisen. Im Verlauf des zweiten Trimenon (54. und 60. GT) war das Signal schwächer und fehlte im dritten Trimenon (90. GT) (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Damit ist dieses Expressionsmuster in den luftführenden

Wegen beim Schwein zwar ähnlich der Expression beim Menschen, jedoch ist die Lokalisation des Signals vor allem im ersten Trimester unterschiedlich. Beim Menschen ist dieses im ersten Trimester diffus im Zytoplasma, beim Schwein apikal in der Plasmamembran lokalisiert (Gaillard, Ruocco et al. 1994; Marcorelles, Montier et al. 2007; Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Gründe für diese unterschiedliche Spezifität der Antikörper, wurden bereits in der Diskussion der pCFTR-Expression in der Trachea besprochen.

6.1.3 Expressionsmuster von pCFTR im Dickdarm im Vergleich zu hCFTR

Die mRNA von *pCFTR* konnte im Dickdarm zu allen Zeitpunkten bei den Schweinefeten sowie den neugeborenen und adulten Schweinen nachgewiesen werden. Dabei blieb das Expressionslevel während der gesamten Trächtigkeit auf einem konstant niedrigen Niveau. Eine Ausnahme bildet hier der 56. GT, an dem die Expression leicht erhöht war. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte beim Menschen ebenfalls eine gleichbleibende, jedoch sehr hohe Expression im Dickdarm in den undifferenzierten Epithelzellen am Ende des ersten Trimenon (10.–12. SSW) und später in den Epithelzellen der sich entwickelnden Dickdarmkrypten im zweiten und dritten Trimenon, nicht jedoch in den luminal liegenden Epithelzellen nachgewiesen werden (Tizzano, Chitayat et al. 1993).

Die *pCFTR*-Expression blieb im Dickdarm bei den neugeborenen und adulten Schweinen auf einem ähnlich niedrigen Niveau, wie zu den meisten untersuchten Zeitpunkten in der Trächtigkeit. Das entspricht dem Bild beim Menschen, wo ein ähnlich starkes mRNA-Signal in einer *in situ* Hybridisierung in der fetalen Entwicklung und bei Erwachsenen nachgewiesen wurde (Trezise, Chambers et al. 1993). Die semiquantitativ bestimmte Menge an mRNA war beim Menschen im Darmtrakt dabei deutlich höher als in anderen Organen, wie z. B. der Lunge (Tizzano, Chitayat et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte das Expressionslevel in Dickdarm und Lunge jedoch, aufgrund der unterschiedlichen stabilsten HK, nicht direkt miteinander verglichen werden. Für eine höhere Expression von *pCFTR* im Darm als im Respirationstrakt spricht auch beim Schwein der Nachweis des pCFTR-Proteins im Dickdarm durch die vorliegenden Arbeit, nicht jedoch im unteren Respirationstrakt. Dies spricht wahrscheinlich für eine deutlich unterschiedliche Proteinmenge in den beiden Organsystemen.

Das pCFTR-Protein konnte in allen fetalen Stadien beim Schwein sowie den neugeborenen und adulten Tieren nachgewiesen werden. Dabei nahm die Signalstärke während der fetalen Entwicklung zu und war am stärksten bei adulten Sauen. Gaillard und KollegInnen (1994) konnten das hCFTR-Protein beim Menschen ebenfalls während aller Phasen der fetalen Entwicklung in gleichbleibender Signalstärke nachweisen. Dabei wurde das Signal in den

unreifen Enterozyten bzw. in den Epithelzellen der im zweiten Trimenon auftretenden Krypten lokalisiert. Zusätzlich fanden sich in den Becherzellen der Krypten im zweiten Trimenon basale Signale von hCFTR (Gaillard, Ruocco et al. 1994). Diese sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auffällige Abnahme der Signalstärke entlang der Krypten-Lumen-Achse könnte mit der Differenzierung der Enterozyten entlang dieser Achse zusammenhängen (Tizzano, Chitayat et al. 1993; Gaillard, Ruocco et al. 1994). In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten postnatalen Stadien waren die immunhistologischen Signale von pCFTR stark perinukleär assoziiert. Dies korreliert mit einer subzellulären Region, in der sich das ER befindet. Eine stark ER-assoziierte Lokalisation des pCFTR Protein wurde bereits zuvor in adulten Schweinen beschrieben (Plog, Mundhenk et al. 2010). Dies entspricht dem Bild beim Menschen, bei dem sich das hCFTR-Protein ebenfalls perinukleär in den Becherzellen bei Erwachsenen fand (Kälin, Claass et al. 1999).

6.1.4 Zusammenfassender Vergleich der pCFTR-Expression in der pränatalen Entwicklung mit dem hCFTR im Respirationstrakt und im Dickdarm

In der vorliegenden Arbeit konnten viele Gemeinsamkeiten der fetalen mRNA-Expression von *CFTR* zwischen Schweinen und Menschen festgestellt werden (siehe **Tabelle 19**). Dabei konnte *pCFTR* beim Schwein in denselben Geweben zu denselben Zeitpunkten der fetalen Entwicklung nachgewiesen werden wie beim Menschen (Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993). Die Untersuchung an Schweinen bot die Möglichkeit, zu definierten Zeitpunkten Proben zu gewinnen, die den bisher untersuchten Zeitpunkten beim Menschen entsprachen, und diese zusätzlich um weitere Zeitpunkte zu ergänzen. So konnte die pCFTR-Expression während der Organentwicklung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detaillierter dargestellt werden, als dies beim Menschen bisher möglich war. Durch die Nutzung von Schweinen war außerdem die Gewinnung von sehr frischen Proben möglich, die eine objektive Quantifizierung der *pCFTR*-mRNA mittels RT-qPCR ermöglichte – eine Untersuchung, die bisher nur subjektiv und semiquantitativ mittels *in situ* Hybridisierung in Gewebeproben des Menschen möglich war. Im Folgenden werden besondere Aspekte der vergleichenden Betrachtung hervorgehoben.

Beim Schwein und Mensch fand sich in der Lunge im zweiten Trimenon eine auffällige Erhöhung von *pCFTR* bzw. *hCFTR*. Auffällig ist beim Schwein zusätzlich eine geringere Expression von *pCFTR* im alveolarreichen Lungenhauptlappen im dritten Trimenon im Vergleich zum bronchusreichen Lungenspitzenlappen. Die Nachweise von *hCFTR* im dritten Trimenon entsprechen dabei dem Bild in den alveolarreichen Lungenhauptlappen beim Schwein.

Tabelle 19: Vergleich der fetalen CFTR-mRNA-Expression zwischen Schwein und Mensch

Gewebe	1. Trimenon		2. Trimenon		3. Trimenon	
	S	M	S	M	S	M
Trachea	+	+ a)	++	+ a, b)	+	+ a)
Lunge	+	+ a)	++	++ b)	++ / + *	+ a)
Dickdarm	+	+ a)	++	+ a, b)	+	+ a)

+ = positiv. * = höhere Expression von pCFTR im bronchusreichen Lungenspitzenlappen als im alveolarreichen Lungenhauptlappen. S = Schwein. M = Mensch. Quellen: a) Tizzano, Chitayat et al. (1993). b) Trezise, Chambers et al. (1993).

Der Proteinnachweis von pCFTR war in den Schweinefeten in der vorliegenden Arbeit nicht durchgängig möglich (siehe **Tabelle 20**). In der Trachea konnte mit dem hier verwendeten pCFTR-N1 Antikörperserum nur bei den neugeborenen und adulten Schweinen spezifische Signale gefunden werden. Beim Menschen konnte hCFTR während der gesamten fetalen Entwicklung in der Trachea und den luftführenden Wegen der Lunge nachgewiesen werden (Gaillard, Ruocco et al. 1994; Marcorelles, Montier et al. 2007). Meyerholz und KollegInnen (2018) konnten beim Schwein bei Feten im zweiten und dritten Trimenon in der Trachea bzw. im ersten und zweiten Trimenon in den luftführenden Wegen der Lunge mit einem anderen Antikörper ebenfalls ein pCFTR-Signal nachweisen. Auffällig ist, dass Meyerholz und KollegInnen (2018) im dritten Trimenon kein pCFTR in den luftführenden Wegen der Lunge nachweisen konnten (Meyerholz, Stoltz et al. 2018).

Im Dickdarm war pCFTR genauso wie hCFTR beim Menschen in der gesamten fetalen Entwicklung zunächst in dem noch undifferenzierten Enterozyten, später ausschließlich in den Darmkrypten sichtbar. Dass pCFTR im Dickdarm in der vorliegenden Arbeit, nicht jedoch im unteren Respirationstrakt nachgewiesen werden konnte, spricht wahrscheinlich für eine deutlich unterschiedliche Proteinmenge in den beiden Organsystemen. Das wurde durch die Beobachtungen beim Menschen gestützt, bei der im Darm die größte Menge an mRNA semi-quantitativ nachgewiesen wurde (Tizzano, Chitayat et al. 1993).

Tabelle 20: Vergleich der fetalen CFTR-Protein-Expression zwischen Schwein und Mensch

Gewebe	1. Trimenon		2. Trimenon		3. Trimenon	
	S	M	S	M	S	M
Trachea	-	+ a)	- / + c)	+ a)	- / + c)	+ a)
Lunge						
Lufff. Wege	- / + c)	+ a, b)	- / + c)	++ a)	+ / + c)	++ a, b)
Alveolen	NE	NE	NE	NE	- / - c)	- a)
Dickdarm	+	++ a)	++	++ a)	++	++ a)

S = Schwein. M = Mensch. Lufff. Wege = Epithel der großen luftführenden Wege der Lunge. NE = nicht entwickelt. - : kein Nachweis. + = Nachweis. Quellen: a) Gaillard, Ruocco et al. (1994). b) Marcorettes, Montier et al. (2007). c) Meyerholz, Stoltz et al. (2018).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die gestellte Arbeitshypothese durch die Ergebnisse der Untersuchung gestützt wird. Das porzine CFTR wies in der pränatalen Entwicklung von Trachea, Lunge und Darm von Wildtyp-Schweinen eine stadien- und gewebe-spezifische Expression auf. Damit scheint sich das Schwein in Hinblick auf seine hier nachgewiesene Ähnlichkeit in der zeit- und gewebeabhängigen Expression von *pCFTR* und *pSCNN1B* in der fetalen Entwicklung sehr gut als Modelltier für die Erforschung der CF zu eignen. Einschränkungen gibt es jedoch im Proteinnachweis von pCFTR vor allem im unteren Respirationstrakt. Hier waren je nach Sensitivität des verwendeten Antikörpers nicht immer spezifische Signale nachweisbar.

6.2 Vergleich der prä- und postnatalen zeit- und gewebeabhängigen Expression von pENaC im Vergleich zu hENaC

Die Untersuchungen zu ENaC und seinem kodierenden Gen SCNN beschränken sich i. d. R. auf funktionale Untersuchungen der Kanalaktivität von ENaC, so dass Daten zu der Gewebeerexpression beim Menschen nur lückenhaft vorhanden sind. Zusätzlich werden meist nicht alle Untereinheiten parallel untersucht. Jedoch besteht Konsens darüber, dass der ENaC-Kanal immer durch die Untereinheiten alpha, beta und gamma gebildet wird (Hanukoglu und Hanukoglu 2016).

Die Expression von *pSCNN1B* konnte in der vorliegenden Arbeit zu allen Zeitpunkten in den Schweinefeteten sowie den neugeborenen und adulten Schweinen in der Trachea nachgewiesen werden. Studien speziell zum Nachweis von *hSCNN*-mRNA in der Trachea liegen bei Erwachsenen nicht vor. In einem humanen Fetus in der 29. SSW konnte die mRNA der *hSCNN1* beta- und gamma-Untereinheiten im Rahmen des RIKEN FANTOM5 *project* nachgewiesen werden (RIKEN_FANTOM5_project 2020).

In der Lunge konnte *pSCNN1B* in der vorliegenden Arbeit zu allen Zeitpunkten in der fetalen Entwicklung sowie bei den neugeborenen und adulten Schweinen nachgewiesen werden. Das deckt sich mit dem Nachweis von den Untereinheiten alpha, beta und gamma des *hSCNN* im Epithel der luftführenden Wege der Lunge, die in Erwachsenen mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen wurden. Dabei fanden sich die alpha- und beta-Untereinheiten zusätzlich im Epithel der SMD (Burch, Talbot et al. 1995). Zusätzlich konnten Smith und KollegInnen (2000) *hSCNN1A* sowohl im ersten Trimenon (5. und 10. SSW), dem zweiten Trimenon (19. und 20. SSW) als auch dem dritten Trimenon (28.–41. SSW) in der Lunge nachweisen (Smith, Otulakowski et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wies die Expression von *pSCNN1B* bei den untersuchten Schweinefeteten einen konstanten Anstieg bis zum 64. GT auf und blieb dann konstant auf einem stark erhöhten Expressionslevel. Die Expression der adulten Sauen war auf einem ähnlichen Niveau, wie im zweiten und dritten Trimenon. Im Gegensatz hierzu findet sich im Vergleich zum Ende des zweiten Trimenon beim Erwachsenen in der Lunge eine deutlich höhere Expression von *hSCNN* (Voilley, Lingueglia et al. 1994; Venkatesh und Katzberg 1997). Dabei konnten Voilley und KollegInnen 1994 mittels Northern Blot Analyse kein *hSCNN* in der Lunge bei den untersuchten Feteten zu diesem Zeitpunkt nachweisen, sondern allein bei den untersuchten Lungen von Erwachsenen (Voilley, Lingueglia et al. 1994). Der Unterschied zu Venkatesh und KollegInnen (1997) sowie zu den vorliegenden Ergebnissen beim Schwein könnte auf die unterschiedlichen Methoden zurückzuführen sein. Die von Voilley und KollegInnen 1994 genutzte semiquantitative Northern Blot Analyse weist dabei eine geringere Sensitivität auf als die von Venkatesh und KollegInnen 1997 genutzte Reverse Transkriptase-PCR und die in der vorliegenden Arbeit genutzten RT-qPCR.

Auch im Dickdarm war die mRNA von *pSCNN1B* zu allen Zeitpunkten bei den Schweinefeteten sowie den neugeborenen und adulten Schweinen nachweisbar. Dabei blieb das Expressionslevel während der gesamten Trächtigkeit auf einem konstanten Niveau. Systematische Untersuchungen zur fetalen Expression von *hSCNN* im Colon liegen bisher nicht vor. Jedoch wiesen Voilley und KollegInnen (1994) mittels Northern Blot Analyse die mRNA von *hSCNN* im Colon sowohl bei Erwachsenen als auch humanen Feteten des zweiten Trimester nach (Voilley, Lingueglia et al. 1994).

Auffällig ist bei *pSCNN1B* die deutlich höhere Expression in neugeborenen Ferkeln und adulten Schweinen im Dickdarm im Vergleich zu den Schweinefeten. Da die Rolle von ENaC als wichtiger Ionenporter im Dickdarm bekannt ist (Kunzelmann und Mall 2002), könnte die beobachtete deutlich höhere postnatale Expression mit der Aufnahme der Verdauungstätigkeit des Colon nach der Geburt zusammenhängen.

Systematische Untersuchungen zur Proteinexpression von hENaC im unteren Respirationstrakt und Colon in der fetalen Entwicklung liegen bisher nicht vor. In Erwachsenen konnten die alpha-, beta- und gamma-Untereinheiten von hENaC in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen des Colon und den luftführenden Wegen nachgewiesen werden. In den Alveolen der Lunge fanden sich diese nicht (Renard, Voilley et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit konnten mit den untersuchten Antikörper, die gegen hENaC-1 β gerichtet sind, mit verschiedenen Färbeprotokollen und Verdünnungen keine spezifischen Signale beim Schwein nachgewiesen werden. Dies könnte für einen speziesspezifischen Unterschied oder eine Maskierung des nachzuweisenden Epitops sprechen. Es ist allerdings auch möglich, dass eine zu geringe Sensitivität der Antikörper vorliegt. Die sehr hohen Ct-Werte von *pSCNN1B* in den untersuchten Geweben sprechen für eine geringe Kopienzahl im Ausgangsmaterial. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch nur sehr geringe Mengen an pEnaC in den untersuchten Geweben vorliegen.

6.3 Zusammenhänge zwischen der Expression der untersuchten Gene und der Organentwicklung im unteren Respirationstrakt und dem Dickdarm

Die bereits bei einigen Neugeborenen mit CF vorkommenden strukturellen Veränderungen im unteren Respirationstrakt führten zu der Hypothese, dass CFTR eine Rolle in der Organentwicklung spielen könnte (McCray, Reenstra et al. 1992; Broackes-Carter, Mouchel et al. 2002; Larson und Cohen 2005).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene zeitabhängige Expression von *pCFTR* in der Lunge weist eine auffällige, deutlich erhöhte Expression im zweiten Trimenon am 56. GT auf. Auch beim Menschen konnte ein solcher Höhepunkt im zweiten Trimester nachgewiesen werden (McGrath, Basu et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993). Diese Phase stellt beim Menschen den Übergang der pseudoglandulären zur kanalikulären Entwicklungsphase der Lunge dar (Shi, Bellusci et al. 2007; Warburton, El-Hashash et al. 2010). In verschiedenen Studien konnte beim Schwein die pseudoglanduläre Entwicklungsphase am 36. bis 60. GT bzw. am 70. GT und die kanalikuläre Entwicklungsphase der Lunge am 80. GT nachgewiesen werden (Schlichenmaier, Steffl et al. 2002; Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Damit entspricht der Zeitraum, in dem in der vorliegenden Arbeit die erhöhte Expression von pCFTR in der Lunge nachgewiesen wurde, der pseudoglandulären Phase. In einer ähnlichen

Untersuchungsreihe beim Schaf konnte mittels qRT-PCR ebenfalls ein Höhepunkt der ovinen *CFTR*-Expression im mittleren Trimenon (80. GT von 147 Trächtigkeitstagen) nachgewiesen werden, wobei in dieser Studie die Höhe der Expression relativ zum 83. GT des zweiten Trimenon berechnet wurde. Diese erhöhte Expression wurde von den AutorInnen mit einem möglichen Einfluss von *CFTR* in der Organentwicklung in Verbindung gebracht (Broackes-Carter, Mouchel et al. 2002). Dass *CFTR* selbst eine direkte Rolle in der pseudoglandulären Entwicklungsphase der Luftwege spielen könnte, wird durch verschiedene Studien gestützt. Meyerholz und KollegInnen (2018) wiesen das p*CFTR* Protein bei Schweinefeten während der pseudoglandulären Entwicklungsphase der Lunge mittels Immunhistologie ausschließlich in den Spitzen der sich entwickelnden Luftwege nach (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Dieser Bereich ist maßgeblich für das weitere Wachstum und Aufzweigen der sich entwickelnden Luftwege verantwortlich. Zusätzlich konnte durch eine Überexpression von *CFTR* in WT-Mäusen während des Übergangs der pseudoglandulären zur kanalikulären Lungenentwicklungsphase (15-16. GT) eine erhöhte Proliferation und weitere Differenzierung der Epithelzellen ausgelöst werden (Larson, Delcarpio et al. 2000).

Ein weiterer Faktor für das Wachstum der luftführenden Wege ist die durch die Epithelzellen produzierte Lungenflüssigkeit, die einen konstanten Ausdehnungsdruck auf die Wände der luftführenden Wege ausübt (Olver und Strang 1974; Alcorn, Adamson et al. 1977). Diese Flüssigkeit ist besonders reich an Chloridionen (Jain und Eaton 2006). Die erhöhte Expression im zweiten Trimenon von p*CFTR* als Chloridkanal, der postnatal Chloridionen aus dem Zellinneren in das Lumen transportiert, könnte hiermit korrelieren. Dafür, dass neben *CFTR* noch andere Chloridkanäle eine Rolle in der fetalen Chloridsekretion in den luftführenden Wegen spielt, spricht jedoch, dass die CF des Menschen nicht mit einer Hypoplasie der Lunge assoziiert ist. Solche Hypoplasien der Lunge treten u. a. dann auf, wenn die Lungenflüssigkeit in der fetalen Entwicklung reduziert ist (Shi, Bellusci et al. 2007).

Das *pCLCA4a* als Ortholog des *hCLCA4* und als Marker für respiratorische Epithelzellen, die keine Becherzellen sind (Plog, Grotzsch et al. 2012), war in allen untersuchten Anteilen des unteren Respirationstrakts im zweiten Trimenon nicht erhöht. Dabei konnte *pCLCA4a* nicht bei allen Feteten im alveolarreichen Lungenhauptlappen im zweiten Trimenon nachgewiesen werden. Die fehlende Expression von *pCLCA4a* im alveolarreichen Lungenhauptlappen liegt wahrscheinlich an dem nur geringen Anteil an luftführenden Wegen und deren Epithelzellen in dieser Gewebeprobe, die keine Becherzellen sind. Dass *pCLCA4a* in den übrigen untersuchten Anteilen des Respirationstraktes während der gesamten fetalen Entwicklung auf einem relativ konstant niedrigen Niveau bleibt, könnte für eine relativ gleichbleibende Anzahl an Epithelzellen, die keine Becherzellen sind, oder für eine insgesamt geringe Expression des Gens sprechen. Auch zur fetalen Expression von *hCLCA4* beim Menschen liegen nur

punktueller Untersuchungen vor. So konnte *hCLCA4* im dritten Trimenon zwar in der Trachea (29. SSW), nicht jedoch in der Lunge (40. SSW) nachgewiesen werden (RIKEN_FANTOM5_project 2020). Durch das Fehlen einer Untersuchung des *hCLCA4*-Proteins in der fetalen Entwicklung des unteren Respirationstraktes bleibt jedoch offen, in welchen Zelltypen dieses beim Menschen lokalisiert ist.

Im dritten Trimenon konnte im alveolarreichen Lungenhauptlappen eine auffallend geringe Expressionsmenge von *pCFTR* gefunden werden, die möglicherweise auf eine zelltypspezifische Differenzierung mit der Ausbildung von Alveolen, in denen CFTR nicht exprimiert wird, zurückzuführen ist. Im gleichen Zeitraum nahe der Geburt konnte in der vorliegenden Arbeit eine auffällige Steigerung der Expressionhöhe für *pSCNN1B* im bronchusreichen Lungenspitzenlappen ermittelt werden. Dieser Zeitpunkt korreliert beim Menschen mit der physiologischen Umstellung der Lunge zur Geburt von einem sekretorischen Organ zu einem luftaustauschenden Organ. Zum einen ist die Chloridionenvermittelte Sekretion der fetalen Lungenflüssigkeit, die ein Zusammenfallen der Alveolen verhindert, nicht länger notwendig. Zum anderen wird direkt zur Geburt durch verschiedene Mechanismen die Chloridionensekretion herabreguliert und der aktive Natriumionentransport aus dem Lumen erhöht. Wie in 2.2.6.1 beschrieben, wird so die Lungenflüssigkeit osmotisch aus dem Lumen transportiert (Venkatesh und Katzberg 1997; Jain und Eaton 2006; Shi, Bellusci et al. 2007; Hillman, Kallapur et al. 2012).

Im Dickdarm zeigte sich beim Schwein im zweiten Trimenon eine leichte Erhöhung der Expression von *pCFTR* sowie eine deutliche Erhöhung von *pCLCLA1* als Marker für Becherzellen (Plog, Mundhenk et al. 2009) und des *pCLCA-4a* als Marker für intestinale Epithelzellen, die keine Becherzellen sind (Plog, Grotzsch et al. 2012). Dieser Zeitpunkt im zweiten Trimenon korreliert beim Menschen mit der Morphogenese der Zotten, in der sich das unreife mehrschichtige Epithel weiter zu Enterozyten und Becherzellen differenziert und erste sekundäre Zotten sichtbar werden (Chin, Hill et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnten die ersten Becherzellen im Dickdarm im zweiten Trimenon (45. GT) nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression von *pCLCA1* als Becherzellmarker (Plog, Mundhenk et al. 2009) am 56. GT korreliert hier mit der beschriebenen Differenzierung der unreifen Enterozyten zu Becherzellen. Die weitere Zunahme der *pCLCA1*-Expression im Verlauf der Organentwicklung spricht weiterhin für eine zunehmende Zahl der Becherzellen in der gesamten Gewebeprobe. Auf Proteinebene konnte in der vorliegenden Arbeit eine Verteilung der *pCFTR*-Signale in den sich entwickelnden Darmkrypten im zweiten Trimenon nachgewiesen werden. Dies korreliert mit dem Nachweis eines sehr starken Signals von *hCFTR* mittels *in situ* Hybridisierung in den Dickdarmkrypten im zweiten Trimenon (Gaillard, Ruocco et al. 1994). Zusammenfas-

send sprechen die vorangegangenen Beobachtungen dafür, dass hCFTR bereits in dieser Phase der Dickdarmentwicklung eine Funktion ausübt (Trezise, Chambers et al. 1993).

6.4 Methodenkritik

Die Aussagekraft dieser Arbeit muss vor allem in Hinblick auf die limitierenden Faktoren der RT-qPCR kritisch betrachtet werden. So fallen auch in den HK leichte Schwankungen in den Ct-Werten auf. Einige Ct-Werte von HK weisen vor allem im zweiten Trimenon am 56. und 64. GT einen erhöhte CT auf (siehe 5.1). Dies spricht für eine leicht geringere Expression zu diesen Zeitpunkten. Bei gleichzeitiger Schwankung in den GOI kann so durch die Berechnung des *fold change* eine artifizielle Erhöhung oder Verringerung der Expression des GOI ausgelöst werden. Somit muss immer auch sichergestellt werden, dass die Schwankungen im HK geringer sind als die Schwankung im GOI. Hierfür wurde in dieser Studie die GeNorm-Analyse genutzt, die die stabilsten HK identifiziert und damit ein wichtiges Kontrollwerkzeug darstellt (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Vandesompele, De Preter et al. 2002; Mestdagh, Van Vlierberghe et al. 2009).

Da der genaue exprimierende Zelltyp der CFTR-Expression im Respirationstrakt bei den Schweinefeten nicht nachgewiesen werden konnte und die getesteten Antikörper gegen hENaC-1 β keine spezifischen Signale zeigten, sind weitere Untersuchungen zu der Lokalisation von pCFTR und pSCNN1B in der Lunge von Schweinefeten notwendig. Das in dieser Arbeit verwendete pCFTR-N1 Antikörperserum scheint zunächst eine zu geringe Sensitivität zu besitzen, da sie im Respirationstrakt während der fetalen Phase keine Signale zeigt. Lediglich für Untersuchungen von pCFTR im Dickdarm ist die Sensitivität des genutzten Antikörperserums über die gesamte fetale Entwicklung hinweg ausreichend gewesen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kopienanzahl des CFTR-Proteins innerhalb der Zelle sehr niedrig ist (Crawford, Maloney et al. 1991; Claass, Sommer et al. 2000; Farinha, Penque et al. 2004). Die hier durchgeführten mRNA-Analysen zeigten, dass die Expression von CFTR im Darm höher als im Respirationstrakt zu sein scheint. Dies lässt vermuten, dass auch mehr Protein im Darm vorliegt, womit sich die ausreichende Sensitivität des Antikörpers im Dickdarm erklären ließe. Meyerholz und KollegInnen (2018) fanden jedoch mit einem anderen Antikörper schwache Signale während der fetalen Entwicklung im Epithel der luftführenden Wege (Meyerholz, Stoltz et al. 2018). Diese unterschiedliche Sensitivität verschiedener Antikörper zum Nachweis des CFTR-Proteins ist ein bekanntes Problem (Crawford, Maloney et al. 1991; Claass, Sommer et al. 2000; Plog, Mundhenk et al. 2010). Eine *in situ* Hybridisierung, bei der die RNA in Zellen sichtbar gemacht wird, kann hier weitere wertvolle Einblicke geben. Weiterführend können außerdem mittels einer Laser

Mikrodissektion entsprechende Gewebebereiche ausgeschnitten werden und auf deren mRNA-Expressionslevel hin untersucht werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Expression in genau den Gewebeanteilen zu untersuchen, die für die Studie relevant sind. Somit können z. B. in der Trachea Epithelzellen und SMD getrennt voneinander untersucht werden. Mit dieser Methode kann auch der Nachteil eines Lysates aus ganzen Gewebeteilen, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, umgangen werden.

Da in den adulten Tieren ausschließlich Sauen verwendet wurden, könnte ein geschlechtsspezifischer Bias geschaffen worden sein. Jedoch sind geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von pCFTR nicht bekannt, auch konnte in dieser Arbeit kein erkennbarer Unterschied zwischen den Geschlechtern der pränatalen Stadien und der Ferkel nachgewiesen werden. Um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen, sollten in zukünftigen Untersuchungen auch männliche adulte Schweine eingeschlossen werden.

6.5 Ausblick

Mit den Erkenntnissen, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, wurde ein Grundstein zur weiteren Erforschung der Rolle von CFTR und ENaC in der Organentwicklung beim Schwein gelegt. Dabei hat sich zu verschiedenen Zeitpunkten die Expression in den untersuchten Geweben als besonders interessant herausgestellt. In den luftführenden Wegen ist das vor allem der Zeitraum des zweite Trimenon, da hier eine erhöhte Expression von pCFTR vorliegt. Dieser Zeitraum scheint mit dem Übergang der Lungenentwicklung von der pseudoglandulären zur kanalikulären Phase einher zu gehen. Ein zweiter sehr interessanter Zeitpunkt in Bezug auf den Respirationstrakt stellt die Umstellung der Lunge von einem sekretorischen Organ zu einem luftaustauschenden Organ zum Zeitpunkt der Geburt dar. Hierbei spielen CFTR und ENaC eine entscheidende Rolle. Im Dickdarm erscheint ebenfalls das zweite Trimenon als besonders interessant, da sich auch hier eine leichte Erhöhung von pCFTR findet. Diese scheint ebenfalls mit einem entscheidenden Entwicklungsschritt zu korrelieren, der Morphogenese der Zotten.

Die Kenntnis dieser Zeiträume kann für weitere Untersuchungen genutzt werden. So wäre ein nächster wichtiger Schritt, die CF-Schweinefeten zu diesem Zeitpunkt pathologisch dahingehend zu untersuchen, ob die bei der Geburt nachgewiesenen Malformationen in diesem Zeitraum beginnen. Dadurch könnte die Rolle von pCFTR in der Entwicklung des unteren Respirationstrakts und des Dickdarms und dessen Einfluss auf die CF-Pathologie weiter charakterisiert werden.

Die genannten Zeitpunkte sind auch für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden relevant. Mit der Kenntnis, wann die *CFTR*-Expression erhöht ist, kann gezielter bei CF-PatientInnen eingegriffen werden, um den bereits bei der Geburt vorliegenden strukturellen Veränderungen entgegen zu wirken. Dabei werden schon heute zwei Therapieansätze in der fetalen Entwicklung bei Modelltieren untersucht.

Bei dem ersten Therapieansatz wird versucht mittels einer *in utero* Applikation von modifizierten Adenoviren in die Trachea (Peebles, Gregory et al. 2004) die Funktion von *CFTR* während der Organentwicklung aufrecht zu erhalten. Für solche Behandlungsmethoden spielt auch die Körpergröße des genutzten Modelltieres eine Rolle. So ist die Applikation von Therapeutika direkt in die Amnionhöhle oder direkt in die Trachea eines Fetus durch die Bauchwand des Muttertieres bei größeren Modelltieren deutlich einfacher und entsprechen aufgrund der ähnlicheren Größenverhältnisse eher dem Vorgehen beim Menschen. Jedoch ist dabei zu beachten, dass die Applikation von Therapeutika in die Amnionhöhle eines größeren Modelltieres aufgrund der größeren Fruchtwassermenge einem größeren Verdünnungseffekt unterliegen. Die dadurch nötige höhere Dosierung des Therapeutikums kann zu unerwünschten Nebenwirkungen in anderen Organen als dem Zielorgan führen (Peebles, Gregory et al. 2004). Somit sollte bei größeren Modelltieren wie dem Schwein eher die Etablierung von Applikationsformen direkt in Organe des Fetus erfolgen.

Bei dem zweiten Therapieansatz wird versucht mittels eines Medikaments die vorhandene Restaktivität bei milden CF-Mutationen deutlich zu steigern (siehe 2.4.2). So führte die intrauterine Gabe von dem Potentiator Ivacaftor bei CF-Frettchen zu einer Unterdrückung der CF Symptome, solange die Mütter bzw. die neugeborenen Frettchen mit diesem Medikament behandelt wurden. Nach Absetzen des Medikaments stellten sich wieder CF-typische Symptome ein und die meisten Tiere starben an einem Mekoniumileus. (Sun, Yi, et al. 2019). Für diese Behandlungsmethoden kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein Therapiebeginn im zweiten Trimenon vorgeschlagen werden, um eine maximale Effektivität zu erreichen.

Die Erforschung der pränatalen *CFTR*-Expression in anderen Organen von WT-Schweinen kann weitere Erkenntnisse einer organ-spezifischen Expression aufzeigen, die zur Verbesserung der Therapie von CF beitragen kann. So fanden sich beim Menschen bereits im zweiten Trimenon erste Ansammlungen von Mukus in den Ausführungsgängen des Pankreas bei CF-Feten (Reid, Hyde et al. 1997), die ebenfalls mit einer erhöhten Expression von *hCFTR* im zweiten Trimenon einher gingen (Harris, Chalkley et al. 1991; Tizzano, Chitayat et al. 1993; Trezise, Chambers et al. 1993). Ähnliche Veränderungen wurden auch in neugeborenen *CFTR*^{-/-}-Schweinen gefunden (Meyerholz, Stoltz et al. 2010). Insbesondere eine Verbes-

serung der Therapie der CF-typischen exokrinen Pankreasinsuffizienz, die immer behandlungsbedürftig ist, würde auch maßgeblich zur Linderung der Darmpathologie bei erwachsenen CF-PatientInnen beitragen.

7 Zusammenfassung

Stadien- und gewebespezifische pränatale Expression des porzinen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* in Trachea, Lunge und Dickdarm – Hinweise auf seine Rolle in der Organogenese?

Stefanie Binder

Zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) entsteht durch Mutationen im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Gen, das für einen epithelialen Chloridionenkanal kodiert. Sie ist bis heute eine nicht vollständig verstandene, multisystemische Erkrankung, die zu Exokrinopathien in verschiedenen Organen führt. Trotz verbesserter Behandlungsmethoden versterben die Betroffenen heute durchschnittlich mit 50 Jahren größtenteils an progressiven Lungenentzündungen.

Schon bei der Geburt liegen strukturelle Veränderungen im Respirationstrakt vor, wie beispielsweise eine Deformation der Trachea und Wandverdickungen großer Bronchien, lange bevor sich eine Lungenentzündung entwickelt. Identische Malformationen fanden sich auch in CF-Schweinemodellen, bei denen porzines CFTR (pCFTR) durch genetisch Modifikation ausgeschaltet wurde. Die Bedeutung dieses angeborenen Phänotyps für die Pathogenese von CF ist noch unklar, jedoch lassen diese Beobachtungen eine Rolle von CFTR bereits in der pränatalen Organentwicklung vermuten. Bislang liegen allerdings nur wenige Daten hinsichtlich der pränatalen CFTR-Expression vor.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war somit die Charakterisierung des stadien- und gewebeabhängigen Expressionsmusters von CFTR während der pränatalen Entwicklung im unteren Respirationstrakt und Dickdarm gesunder Wildtypschweine. Die Ergebnisse wurden mit bereits bekannten Erkenntnissen der pränatalen CFTR-Expression im Menschen verglichen. In die Analysen wurden Feten zu verschiedene Trächtigkeitzeitpunkten, neugeborene Ferkel und adulte Sauen eingeschlossen. Die gewebliche Expression von CFTR wurde auf mRNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase quantitative Polymerase Kettenreaktion quantifiziert, das zelluläre Expressionsmuster mittels Immunhistochemie bestimmt. Des Weiteren wurde die gewebliche Expression des Natriumkanals pENaC, der ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von CF zu spielen scheint, sowie zelluläre Marker für Becherzellen (pCLCA1) und anderer Epithelzellen (pCLCA4a) analysiert.

Die Expression aller untersuchten Gene konnten mit einer Ausnahme auf mRNA-Ebene zu jedem untersuchten Zeitpunkt vom Ende des ersten Trimenon bis 24 Stunden postpartal und bei adulten Sauen nachgewiesen werden. Einzig im alveolarreichen Lungenhauptlappen konnte *pCLCA4a* im zweiten Trimenon nicht bei allen Feten nachgewiesen werden, was vermutlich mit einer zu geringen Expression zusammenhängt. Die Expressionsanalyse von *pCFTR* und *pSCNN1B*, das für pENaC kodiert, ließ, wie beim Menschen auch, markante Zeitpunkte erkennen. Beispielsweise zeigte sich eine erhöhte Expression von *pCFTR* und *pSCNN1B* im unteren Respirationstrakt und Dickdarm im zweiten Trimenon. Daneben fand sich eine auffällige Reduktion der Expression von *pCFTR* im alveolarreichen Hauptlappen und eine Erhöhung der Expression von *pSCNN1B* im bronchusreichen Lungenspitzenlappen zum Zeitpunkt der Geburt. Auch die mRNA der beiden analysierten Markergene *pCLCA1* und *pCLCA4a* wurde vermehrt im zweiten Trimenon nachgewiesen, was wahrscheinlich mit der Differenzierung der einzelnen Zelltypen zu diesem Zeitpunkt zusammenhängt.

Mittels Immunhistochemie wurde pCFTR in epithelialen Zellen des Dickdarms zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen. In der Trachea konnte das pCFTR-Signal jedoch nur bei neugeborenen Ferkeln und adulten Sauen, nicht aber in pränatalen Stadien nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf die mangelnde Sensitivität des Antikörpers zurückzuführen.

Die pränatale pCFTR-Expression zeigte somit ein charakteristisches, zeitabhängiges und mit humanem CFTR vergleichbaren Expressionsmuster und war durch eine erhöhte Expression im 2. Trimenon im Respirationstrakt und im Dickdarm charakterisiert. Möglicherweise ist CFTR daher zu diesem spezifische Entwicklungszeitpunkt für die Organentwicklung relevant. Zukünftige Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt sollten an CF-Schweinefeten durchgeführt werden, um mögliche Ursachen für die angeborene Organmalformationen zu identifizieren.

8 Summary

The stage and tissue specific expression pattern of the porcine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in porcine fetuses as well as newborn and adult pigs in the trachea, lung and colon.

Stefanie Binder

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) gene, which encodes for an epithelial chloride channel. CF is still an incompletely understood, multisystemic disease leading to exocrinopathies in various organs. Despite improved treatment methods, affected patients die at an average age of 50 years, predominantly due to progressive pneumonia.

Structural changes in the respiratory tract are already present at birth, such as the deformation of the trachea and wall thickening of large bronchi, long before pneumonia develops. Identical malformations have also been found in pig models of CF, in which porcine CFTR (*pCFTR*) has been genetically deleted or functionally impaired by genetical modifications. The significance of this innate phenotype for the pathogenesis of CF is still unclear. However, these observations suggest a role of CFTR already in prenatal organ development. Anyhow, only few data regarding prenatal CFTR expression are available to date.

The aim of this study was to characterize the time-dependent tissue and cellular expression patterns of CFTR during prenatal development in the lower respiratory and large intestinal tract of healthy wild type pigs. The results were compared with available data concerning prenatal CFTR expression in humans. These analyses included fetuses at different gestation periods, newborn piglets, and adult sows. The tissue expression of CFTR was quantified at the mRNA level by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction, the cellular expression pattern was determined by immunohistochemistry. Furthermore, the tissue expression of the sodium channel *pSCNN1B*, which also plays a role in the pathogenesis of CF, as well as cellular markers for goblet cells (*pCLCA1*) and other epithelial cells (*pCLCA4a*) were analyzed.

With one exception, all investigated genes could be detected at the mRNA level at any time from the end of the first trimenon to 24 hours post partum and in adult sows. Only in the alveolar-rich main lobe of the lung *pCLCA4a* could not be detected in all fetuses in the second trimenon, which is probably related to a too low expression. The expression analysis of

pCFTR and *pSCNN1B* revealed significant time points, as in humans. For example, an increased expression of *pCFTR* and *pSCNN1B* was observed in the lower respiratory tract and colon in the second trimester. In addition, there was a noticeable reduction in the expression of *pCFTR* in the alveolar-rich main lobe and an increase in the expression of *pSCNN1B* in the bronchus-rich lung lobe at birth. The mRNA of the two analysed marker genes *pCLCA1* and *pCLCA4a* were also found to be increased in the second trimester, which is probably related to the differentiation of the individual cell types at this time.

pCFTR was detectable via immunohistochemistry in epithelial cells of the colon at any time. In the trachea, however, the *pCFTR* signal could only be detected in newborn piglets and adult sows, but not in prenatal stages. This may be due to the lack of sensitivity of the antibody.

Prenatal *pCFTR* expression thus showed a characteristic, time-dependent expression pattern comparable to human *CFTR*, characterized by increased expression in the second trimester in the respiratory tract and colon. Therefore, *CFTR* may be relevant for organogenesis at this specific developmental stage. Future studies at this specific timepoint should be performed in CF pig fetuses to determine if the onset of congenital organ malformations starts at this time.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mutationsklassen von CFTR und ihrer Art des Funktionsverlustes im Vergleich zum intakten CFTR-Protein.	17
Abbildung 2: Schema der Probennahme an Trachea und Lunge.	37
Abbildung 3 Erstellen einer Verdünnungsreihe aus einer Stammlösung mit definierter cDNA-Konzentration.	51
Abbildung 4: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a in den kranialen und kaudalen Tracheaabschnitten.	66
Abbildung 5: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der in den kranialen und kaudalen Tracheaabschnitten stabilsten Housekeeping Gene pSDHD und pYWHAZ.	67
Abbildung 6: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a in den bronchusreichen und alveolarreichen Lungenanteilen.	68
Abbildung 7: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der in den bronchusreichen und den alveolarreichen Lungenanteilen stabilsten Housekeeping Gene pSDHD, p β 2M und pYWHAZ.	69
Abbildung 8: Prä- und postnatale Threshold Cycle (Ct)-Werte pro 50 ng cDNA der untersuchten Gene pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a im Dickdarm und des hier stabilsten Housekeeping Gens pSDHD.	70
Abbildung 9: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCFTR und pSCNN1B in der Trachea.	72
Abbildung 10: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCLCA1 und pCLCA4a in der Trachea.	74
Abbildung 11: <i>Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCFTR und pSCNN1B in der Lunge.</i>	76
Abbildung 12: Prä- und postnatale Expression der mRNA von pCLCA-1 und pCLCA-4a in der Lunge.	78
Abbildung 13: Prä- und postnatale mRNA-Expression von pCFTR, pSCNN1B, pCLCA1 und pCLCA4a im Dickdarm.	80
Abbildung 14: Prä- und postnatale Protein-Expression von pCFTR in der Trachea.	81
Abbildung 15: Prä- und postnatale Protein-Expression von pCFTR im Dickdarm.	83

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll der Extraktion der totalRNA. Angelehnt an das Protokoll des NucleoSpin® RNA II Kit.....	38
Tabelle 2 Reagenzienmix zum Umschreiben der totalRNA mittels iScript cDNA Synthesis Kit.....	41
Tabelle 3 Temperaturprotokoll für das Umschreiben von totalRNA zu cDNA mittels iScript. 41	
Tabelle 4: Ensemble Transkriptnummern, Primer- und Sonden-Sequenzen, Größe des Amplifikats, Exone, die durch das Primersystem überspannt werden sowie die dazwischen liegende Intronlänge der Gene, die in der RT-qPCR genutzt wurden.	45
Tabelle 5 Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine SYBR™-Green RT-qPCR	48
Tabelle 6 Temperaturprotokoll für eine SYBR-Green RT-qPCR.....	48
Tabelle 7 Protokoll der Produkt-Aufreinigung aus der RT-qPCR mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit.....	49
Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für eine Taqman-RT-qPCR	50
Tabelle 9: Temperaturprotokoll für die Etablierung eines Primersystems einer Taqman-RT-qPCR	50
Tabelle 10: Pipettierschema für eine Taqman-RT-qPCR mit einem Temperaturgradienten zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur	52
Tabelle 11: Temperaturprotokoll für ein Temperaturgradienten Experiment mittels Taqman-RT-qPCR.....	53
Tabelle 12: Stabilste Housekeeping Gene laut GeNorm	55
Tabelle 13: Protokoll der Entwässerung und Überführung der Gewebeproben in Paraffin im Tissue-Tek® Einbettautomat	57
Tabelle 14 Protokoll für die Rehydrierung, HE-Färbung und Dehydrierung der Gewebeschnitte im Leica CV 5030 Färbe- und Eindeckautomaten	58
Tabelle 15: Protokoll der Rehydrierung der immunhistologischen Schnitte	61
Tabelle 16: Rezepte zur Herstellung der Stammlösungen A und B für den Citratpuffer.....	62
Tabelle 17 Zusammensetzung der Lösung zum Blocken unspezifischer Antikörper	62
Tabelle 18: Protokoll der Dehydration der immunhistologischen Schnitte	64
Tabelle 19: Vergleich der fetalen CFTR-mRNA-Expression zwischen Schwein und Mensch	91
Tabelle 20: Vergleich der fetalen CFTR-Protein-Expression zwischen Schwein und Mensch	92

Tabelle 21: Alter, Gewicht, Größe der untersuchten Schweine sowie die Konservierungsart von deren Organen.	128
Tabelle 22 Wirkstoffe, Produktname und deren Hersteller, die zur Euthanasie der Tiere verwendet wurden.	130
Tabelle 23 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmittel sowie deren Hersteller, die zur totalRNA-Extraktion genutzt wurden.	130
Tabelle 24 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle der totalRNA sowie zum Umschreiben zur cDNA genutzt wurden.	131
Tabelle 25 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die PCR- und RT-qPCR-Experimente und deren Produkt-Aufreinigung genutzt wurden.	131
Tabelle 26 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die Herstellung der Paraffinblöcke, die Herstellung von Leerschnitten und durchgeführten histologische und immunhistologische Färbungen sowie deren Auswertung genutzt wurden.	132

11 Literaturverzeichnis

- ADAM, R. J.; MICHALSKI, A. S.; BAUER, C.; ABOU ALAIWA, M. H.; GROSS, T. J.; AWADALLA, M. S.; BOUZEK, D. C.; GANSEMER, N. D.; TAFT, P. J.; HOEGGER, M. J.; DIWAKAR, A.; OCHS, M.; REINHARDT, J. M.; HOFFMAN, E. A.; BEICHEL, R. R.; MEYERHOLZ, D. K.; STOLTZ, D. A. (2013): Air trapping and airflow obstruction in newborn cystic fibrosis piglets. *Am J Respir Crit Care Med.* 188(12), 1434-41.
- ADLER, F. R.; AURORA, P.; BARKER, D. H.; BARR, M. L.; BLACKWELL, L. S.; BOSMA, O. H.; BROWN, S.; COX, D. R.; JENSEN, J. L.; KURLAND, G.; NOSSENT, G. D.; QUITTNER, A. L.; ROBINSON, W. M.; ROMERO, S. L.; SPENCER, H.; SWEET, S. C.; VAN DER BIJ, W.; VERMEULEN, J.; VERSCHUUREN, E. A.; VRIJLANDT, E. J.; WALSH, W.; WOO, M. S.; LIU, T. G. (2009): Lung transplantation for cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 6(8), 619-33.
- ALCORN, D.; ADAMSON, T. M.; LAMBERT, T. F.; MALONEY, J. E.; RITCHIE, B. C.; ROBINSON, P. M. (1977): Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat.* 123(Pt 3), 649-60.
- ANDERSON, M. P.; GREGORY, R. J.; THOMPSON, S.; SOUZA, D. W.; PAUL, S.; MULLIGAN, R. C.; SMITH, A. E.; WELSH, M. J. (1991): Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* 253(5016), 202-5.
- BARRETT, P. M.; ALAGELY, A.; TOPOL, E. J. (2012): Cystic fibrosis in an era of genomically guided therapy. *Hum Mol Genet.* 21(R1), R66-71.
- BEDROSSIAN, C. W.; GREENBERG, S. D.; SINGER, D. B.; HANSEN, J. J.; ROSENBERG, H. S. (1976): The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol.* 7(2), 195-204.
- BERGOUGNOUX, A.; RIVALS, I.; LIQUORI, A.; RAYNAL, C.; VARILH, J.; MAGALHAES, M.; PEREZ, M. J.; BIGI, N.; DES GEORGES, M.; CHIRON, R.; SQUALLI-HOUSSAINI, A. S.; CLAUSTRES, M.; DE SARIO, A. (2014): A balance between activating and repressive histone modifications regulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in vivo. *Epigenetics.* 9(7), 1007-17.
- BLAST. (2020): NCBI nucleotide BLAST (Internet). Abgerufen am: 04.11.2016, von https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.
- BONVIN, E.; LE ROUZIC, P.; BERNAUDIN, J. F.; COTTART, C. H.; VANDEBROUCK, C.; CRIE, A.; LEAL, T.; CLEMENT, A.; BONORA, M. (2008): Congenital tracheal malformation in

- cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol.* 586(13), 3231-43.
- BORGIO, G.; MASTELLA, G.; GASPARINI, P.; ZORZANELLO, A.; DORO, R.; PIGNATTI, P. F. (1990): Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis. *J Med Genet.* 27(11), 665-9.
- BOROWITZ, D. (2015): CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 50 Suppl 40, S24-s30.
- BOROWITZ, D.; GELFOND, D. (2013): Intestinal complications of cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 19(6), 676-80.
- BOYLE, M. P.; BELL, S. C.; KONSTAN, M. W.; MCCOLLEY, S. A.; ROWE, S. M.; RIETSCHEL, E.; HUANG, X.; WALTZ, D.; PATEL, N. R.; RODMAN, D. (2014): A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2(7), 527-38.
- BRENNAN, S. C.; WILKINSON, W. J.; TSENG, H. E.; FINNEY, B.; MONK, B.; DIBBLE, H.; QUILLIAM, S.; WARBURTON, D.; GALIETTA, L. J.; KEMP, P. J.; RICCARDI, D. (2016): The extracellular calcium-sensing receptor regulates human fetal lung development via CFTR. *Sci Rep.* 6, 21975.
- BROACKES-CARTER, F. C.; MOUCHEL, N.; GILL, D.; HYDE, S.; BASSETT, J.; HARRIS, A. (2002): Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet.* 11(2), 125-31.
- BURCH, L. H.; TALBOT, C. R.; KNOWLES, M. R.; CANESSA, C. M.; ROSSIER, B. C.; BOUCHER, R. C. (1995): Relative expression of the human epithelial Na⁺ channel subunits in normal and cystic fibrosis airways. *Am J Physiol.* 269(2 Pt 1), C511-8.
- CALABRESE, F.; LUNARDI, F.; NANNINI, N.; BALESTRO, E.; LOY, M.; MARULLI, G.; CALABRESE, F.; VULJAN, S. E.; SCHIAVON, M.; PERISSINOTTO, E.; REA, F. (2015): Higher Risk of Acute Cellular Rejection in Lung Transplant Recipients with Cystic Fibrosis. *Ann Transplant.* 20, 769-76.
- CANESSA, C. M.; SCHILD, L.; BUELL, G.; THORENS, B.; GAUTSCHI, I.; HORISBERGER, J. D.; ROSSIER, B. C. (1994): Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature.* 367(6462), 463-7.
- CASTELLANI, C.; DUFF, A. J. A.; BELL, S. C.; HEIJERMAN, H. G. M.; MUNCK, A.; RATJEN, F.; SERMET-GAUDELUS, I.; SOUTHERN, K. W.; BARBEN, J.; FLUME, P. A.; HODKOVA, P.; KASHIRSKAYA, N.; KIRSZENBAUM, M. N.; MADGE, S.; OXLEY, H.; PLANT, B.;

- SCHWARZENBERG, S. J.; SMYTH, A. R.; TACCETTI, G.; WAGNER, T. O. F.; WOLFE, S. P.; DREVINEK, P. (2018): ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 17(2), 153-178.
- CHEN, J. H.; STOLTZ, D. A.; KARP, P. H.; ERNST, S. E.; PEZZULO, A. A.; MONINGER, T. O.; RECTOR, M. V.; REZNIKOV, L. R.; LAUNSPACH, J. L.; CHALONER, K.; ZABNER, J.; WELSH, M. J. (2010): Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell.* 143(6), 911-23.
- CHIN, A. M.; HILL, D. R.; AURORA, M.; SPENCE, J. R. (2017): Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin Cell Dev Biol.* 66, 81-93.
- CHOI, H. C.; KIM, C. S.; TARRAN, R. (2015): Automated acquisition and analysis of airway surface liquid height by confocal microscopy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 309(2), L109-18.
- CHRISTOPHER BOYD, A.; GUO, S.; HUANG, L.; KEREM, B.; OREN, Y. S.; WALKER, A. J.; HART, S. L. (2020): New approaches to genetic therapies for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 19 Suppl 1, S54-59.
- CIPOLLI, M.; CASTELLANI, C.; WILCKEN, B.; MASSIE, J.; MCKAY, K.; GRUCA, M.; TAMANINI, A.; ASSAEL, M. B.; GASKIN, K. (2007): Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Arch Dis Child.* 92(10), 842-6.
- CLAASS, A.; SOMMER, M.; DE JONGE, H.; KALIN, N.; TUMMLER, B. (2000): Applicability of different antibodies for immunohistochemical localization of CFTR in sweat glands from healthy controls and from patients with cystic fibrosis. *J Histochem Cytochem.* 48(6), 831-7.
- CLARKE, L. L.; GRUBB, B. R.; YANKASKAS, J. R.; COTTON, C. U.; MCKENZIE, A.; BOUCHER, R. C. (1994): Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr*(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(2), 479-83.
- CLARKE, L. L.; HARLINE, M. C. (1998): Dual role of CFTR in cAMP-stimulated HCO₃-secretion across murine duodenum. *Am J Physiol.* 274(4), G718-26.
- CLARKE, L. L.; STIEN, X.; WALKER, N. M. (2001): Intestinal bicarbonate secretion in cystic fibrosis mice. *Jop.* 2(4 Suppl), 263-7.
- COHEN-CYMBERKNOH, M.; SHOSEYOV, D.; KEREM, E. (2011): Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med.* 183(11), 1463-71.

- COLOMBO, C. (2007): Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 13(6), 529-36.
- COONEY, A. L.; ABOU ALAIWA, M. H.; SHAH, V. S.; BOUZEK, D. C.; STROIK, M. R.; POWERS, L. S.; GANSEMER, N. D.; MEYERHOLZ, D. K.; WELSH, M. J.; STOLTZ, D. A.; SINN, P. L.; MCCRAY, P. B., JR. (2016): Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight.* 1(14), e88730.
- CRAWFORD, I.; MALONEY, P. C.; ZEITLIN, P. L.; GUGGINO, W. B.; HYDE, S. C.; TURLEY, H.; GATTER, K. C.; HARRIS, A.; HIGGINS, C. F. (1991): Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(20), 9262-6.
- CROSBY, J. R.; ZHAO, C.; JIANG, C.; BAI, D.; KATZ, M.; GREENLEE, S.; KAWABE, H.; MCCALED, M.; ROTIN, D.; GUO, S.; MONIA, B. P. (2017): Inhaled ENaC antisense oligonucleotide ameliorates cystic fibrosis-like lung disease in mice. *J Cyst Fibros.* 16(6), 671-680.
- DAVIDSON, D. J.; DORIN, J. R. (2001): The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. *Expert Rev Mol Med.* 2001, 1-27.
- DAVIDSON, D. J.; DORIN, J. R.; MCLACHLAN, G.; RANALDI, V.; LAMB, D.; DOHERTY, C.; GOVAN, J.; PORTEOUS, D. J. (1995): Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nat Genet.* 9(4), 351-7.
- DE LISLE, R. C.; BOROWITZ, D. (2013): The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(9), a009753.
- DELANEY, S. J.; ALTON, E. W.; SMITH, S. N.; LUNN, D. P.; FARLEY, R.; LOVELOCK, P. K.; THOMSON, S. A.; HUME, D. A.; LAMB, D.; PORTEOUS, D. J.; DORIN, J. R.; WAINWRIGHT, B. J. (1996): Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *Embo j.* 15(5), 955-63.
- DENNING, G. M.; OSTEDGAARD, L. S.; CHENG, S. H.; SMITH, A. E.; WELSH, M. J. (1992): Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest.* 89(1), 339-49.
- DI SANT'AGNESE, P. A.; DARLING, R. C.; PERERA, G. A.; SHEA, E. (1953): Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics.* 12(5), 549-63.
- DIETERT, K.; REPPE, K.; MUNDHENK, L.; WITZENRATH, M.; GRUBER, A. D. (2014): mCLCA3 modulates IL-17 and CXCL-1 induction and leukocyte recruitment in murine *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One.* 9(7), e102606.

- DONOWITZ, M.; WELSH, M. J. (1986): Ca²⁺ and cyclic AMP in regulation of intestinal Na, K, and Cl transport. *Annu Rev Physiol.* 48, 135-50.
- DORIN, J. R.; DICKINSON, P.; ALTON, E. W.; SMITH, S. N.; GEDDES, D. M.; STEVENSON, B. J.; KIMBER, W. L.; FLEMING, S.; CLARKE, A. R.; HOOPER, M. L.; ET AL. (1992): Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature.* 359(6392), 211-5.
- ENGELHARDT, J. F.; YANKASKAS, J. R.; ERNST, S. A.; YANG, Y.; MARINO, C. R.; BOUCHER, R. C.; COHN, J. A.; WILSON, J. M. (1992): Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet.* 2(3), 240-8.
- ENSEMBLE. (2011): Ensemble Datenbank (Internet). Letzte Aktualisierung: April 2020. Abgerufen am: 04.11.2016, von <http://www.ensembl.org/index.html>
- FAN, Z.; PERISSE, I. V.; COTTON, C. U.; REGOUSKI, M.; MENG, Q.; DOMB, C.; VAN WETTERE, A. J.; WANG, Z.; HARRIS, A.; WHITE, K. L.; POLEJAEVA, I. A. (2018): A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight.* 3(19), :e123529.
- FARINHA, C. M.; PENQUE, D.; ROXO-ROSA, M.; LUKACS, G.; DORMER, R.; MCPHERSON, M.; PEREIRA, M.; BOT, A. G.; JORNA, H.; WILLEMSSEN, R.; DEJONGE, H.; HEDA, G. D.; MARINO, C. R.; FANEN, P.; HINZPETER, A.; LIPECKA, J.; FRITSCH, J.; GENTZSCH, M.; EDELMAN, A.; AMARAL, M. D. (2004): Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J Cyst Fibros.* 3 Suppl 2, 73-7.
- FISCHER, A. J.; SINGH, S. B.; ADAM, R. J.; STOLTZ, D. A.; BARANANO, C. F.; KAO, S.; WEINBERGER, M. M.; MCCRAY, P. B., JR.; STARNER, T. D. (2014): Tracheomalacia is associated with lower FEV1 and Pseudomonas acquisition in children with CF. *Pediatr Pulmonol.* 49(10), 960-70.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 27(2-3), 126-39.
- FUKUDA, R.; OKIYONEDA, T. (2018): Peripheral Protein Quality Control as a Novel Drug Target for CFTR Stabilizer. *Front Pharmacol.* 9, 1100.
- GAILLARD, D.; RUOCCO, S.; LALLEMAND, A.; DALEMANS, W.; HINNRASKY, J.; PUCHELLE, E. (1994): Immunohistochemical localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human fetal airway and digestive mucosa. *Pediatr Res.* 36(2), 137-43.
- GARCIA, M. A.; YANG, N.; QUINTON, P. M. (2009): Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest.* 119(9), 2613-22.

- GEDDES, D. M.; SHINER, R. (1989): Cystic fibrosis--from lung damage to symptoms. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 78(S363), 52-57.
- GIULIANO, K. A.; WACHI, S.; DREW, L.; DUKOVSKI, D.; GREEN, O.; BASTOS, C.; CULLEN, M. D.; HAUCK, S.; TAIT, B. D.; MUNOZ, B.; LEE, P. S.; MILLER, J. P. (2018): Use of a High-Throughput Phenotypic Screening Strategy to Identify Amplifiers, a Novel Pharmacological Class of Small Molecules That Exhibit Functional Synergy with Potentiators and Correctors. *SLAS Discov.* 23(2), 111-121.
- GOLDSTEIN, J. L.; NASH, N. T.; AL-BAZZAZ, F.; LAYDEN, T. J.; RAO, M. C. (1988): Rectum has abnormal ion transport but normal cAMP-binding proteins in cystic fibrosis. *Am J Physiol.* 254(5 Pt 1), C719-24.
- GOLDSTEIN, J. L.; SHAPIRO, A. B.; RAO, M. C.; LAYDEN, T. J. (1991): In vivo evidence of altered chloride but not potassium secretion in cystic fibrosis rectal mucosa. *Gastroenterology.* 101(4), 1012-9.
- GOSDEN, C. M.; GOSDEN, J. R. (1984): Fetal abnormalities in cystic fibrosis suggest a deficiency in proteolysis of cholecystokinin. *Lancet.* 2(8402), 541-6.
- GREGER, R.; MALL, M.; BLEICH, M.; ECKE, D.; WARTH, R.; RIEDEMANN, N.; KUNZELMANN, K. (1996): Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Mol Med (Berl).* 74(9), 527-34.
- GRIESENBACH, U.; DAVIES, J. C.; ALTON, E. (2016): Cystic fibrosis gene therapy: a mutation-independent treatment. *Curr Opin Pulm Med.* 22(6), 602-9.
- GRUBB, B. R.; BOUCHER, R. C. (1999): Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev.* 79(1 Suppl), S193-214.
- GRUBB, B. R.; O'NEAL, W. K.; OSTROWSKI, L. E.; KREDA, S. M.; BUTTON, B.; BOUCHER, R. C. (2012): Transgenic hCFTR expression fails to correct beta-ENaC mouse lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302(2), L238-47.
- GUGGINO, W. B. (1999): Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell.* 96(5), 607-10.
- GUILBAULT, C.; MARTIN, P.; HOULE, D.; BOGHDADY, M. L.; GUIOT, M. C.; MARION, D.; RADZIOCH, D. (2005): Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in *Cftr* knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Lab Anim.* 39(3), 336-52.
- GUILBAULT, C.; NOVAK, J. P.; MARTIN, P.; BOGHDADY, M. L.; SAEED, Z.; GUIOT, M. C.; HUDSON, T. J.; RADZIOCH, D. (2006): Distinct pattern of lung gene expression in the

- Cftr-KO mice developing spontaneous lung disease compared with their littermate controls. *Physiol Genomics*. 25(2), 179-93.
- GUILBAULT, C.; SAEED, Z.; DOWNEY, G. P.; RADZIOCH, D. (2007): Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 36(1), 1-7.
- HAARDT, M.; BENHAROUGA, M.; LECHARDEUR, D.; KARTNER, N.; LUKACS, G. L. (1999): C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*. 274(31), 21873-7.
- HANUKOGLU, I.; HANUKOGLU, A. (2016): Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 579(2), 95-132.
- HARDCASTLE, J.; HARDCASTLE, P. T.; TAYLOR, C. J.; GOLDHILL, J. (1991): Failure of cholinergic stimulation to induce a secretory response from the rectal mucosa in cystic fibrosis. *Gut*. 32(9), 1035-9.
- HARRIS, A.; CHALKLEY, G.; GOODMAN, S.; COLEMAN, L. (1991): Expression of the cystic fibrosis gene in human development. *Development*. 113(1), 305-10.
- HARTZELL, C.; PUTZIER, I.; ARREOLA, J. (2005): Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 67, 719-58.
- HASHIMOTO, S.; NAKANO, H.; SINGH, G.; KATYAL, S. (2002): Expression of Sprad and Sprouty in developing rat lung. *Mech Dev*. 119 Suppl 1, S303-9.
- HASTY, P.; O'NEAL, W. K.; LIU, K. Q.; MORRIS, A. P.; BEBOK, Z.; SHUMYATSKY, G. B.; JILLING, T.; SORSCHER, E. J.; BRADLEY, A.; BEAUDET, A. L. (1995): Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somat Cell Mol Genet*. 21(3), 177-87.
- HEECKEREN, A.; WALENGA, R.; KONSTAN, M. W.; BONFIELD, T.; DAVIS, P. B.; FERKOL, T. (1997): Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest*. 100(11), 2810-5.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 8(2), R19.
- HILLMAN, N. H.; KALLAPUR, S. G.; JOBE, A. H. (2012): Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin Perinatol*. 39(4), 769-83.

- HOEGGER, M. J.; AWADALLA, M.; NAMATI, E.; ITANI, O. A.; FISCHER, A. J.; TUCKER, A. J.; ADAM, R. J.; MCLENNAN, G.; HOFFMAN, E. A.; STOLTZ, D. A.; WELSH, M. J. (2014): Assessing mucociliary transport of single particles in vivo shows variable speed and preference for the ventral trachea in newborn pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(6), 2355-60.
- HOLLENHORST, M. I.; RICHTER, K.; FRONIUS, M. (2011): Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 174306.
- HUDAK, J. J.; KILLEEN, E.; CHANDRAN, A.; COHEN, J. C.; LARSON, J. E. (2009): Adult onset lung disease following transient disruption of fetal stretch-induced differentiation. *Respir Res.* 10, 34.
- HUGO. (2020): Human Genome Nomenclature Committee (Internet). Letzte Aktualisierung: 30.04.2020. Abgerufen am: 15.04.2020, von www.genenames.org.
- ILLEK, B.; FISCHER, H. (1998): Flavonoids stimulate Cl conductance of human airway epithelium in vitro and in vivo. *Am J Physiol.* 275(5), L902-10.
- ITANI, O. A.; CHEN, J. H.; KARP, P. H.; ERNST, S.; KESHAVJEE, S.; PAREKH, K.; KLESNEY-TAIT, J.; ZABNER, J.; WELSH, M. J. (2011): Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl⁻ conductance but not increased Na⁺ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(25), 10260-5.
- JAIN, L.; EATON, D. C. (2006): Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor. *Semin Perinatol.* 30(1), 34-43.
- JARZABEK, K.; ZBUCKA, M.; PEPINSKI, W.; SZAMATOWICZ, J.; DOMITRZ, J.; JANICA, J.; WOLCZYNSKI, S.; SZAMATOWICZ, M. (2004): Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol.* 4(2), 119-29.
- JAYARAMAN, S.; JOO, N. S.; REITZ, B.; WINE, J. J.; VERKMAN, A. S. (2001): Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na⁺] and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(14), 8119-23.
- Ji, H. L.; CHALFANT, M. L.; JOVOV, B.; LOCKHART, J. P.; PARKER, S. B.; FULLER, C. M.; STANTON, B. A.; BENOS, D. J. (2000): The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 275(36), 27947-56.

- KÄLIN, N.; CLAASS, A.; SOMMER, M.; PUCHELLE, E.; TUMMLER, B. (1999): DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 103(10), 1379-89.
- KENT, G.; ILES, R.; BEAR, C. E.; HUAN, L. J.; GRIESENBACH, U.; MCKERLIE, C.; FRNDOVA, H.; ACKERLEY, C.; GOSSELIN, D.; RADZIOCH, D.; O'BRODOVICH, H.; TSUI, L. C.; BUCHWALD, M.; TANSWELL, A. K. (1997): Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 100(12), 3060-9.
- KENT, G.; OLIVER, M.; FOSKETT, J. K.; FRNDOVA, H.; DURIE, P.; FORSTNER, J.; FORSTNER, G. G.; RIORDAN, J. R.; PERCY, D.; BUCHWALD, M. (1996): Phenotypic abnormalities in long-term surviving cystic fibrosis mice. *Pediatr Res.* 40(2), 233-41.
- KEREM, B.; KEREM, E. (1996): The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 4(2), 65-73.
- KIETZMANN, M. (2003): [Euthanasia of pregnant animals]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 110(5), 188-9.
- KLYMIUK, N.; MUNDHENK, L.; KRAEHE, K.; WUENSCH, A.; PLOG, S.; EMRICH, D.; LANGENMAYER, M. C.; STEHR, M.; HOLZINGER, A.; KRONER, C.; RICHTER, A.; KESSLER, B.; KUROME, M.; EDDICKS, M.; NAGASHIMA, H.; HEINRITZI, K.; GRUBER, A. D.; WOLF, E. (2012): Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl).* 90(5), 597-608.
- KNOWLES, M. R.; BOUCHER, R. C. (2002): Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 109(5), 571-7.
- KNOWLES, M. R.; STUTTS, M. J.; SPOCK, A.; FISCHER, N.; GATZY, J. T.; BOUCHER, R. C. (1983): Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science.* 221(4615), 1067-70.
- KORESSAAR, T.; REMM, M. (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 23(10), 1289-91.
- KUNZELMANN, K.; KISER, G. L.; SCHREIBER, R.; RIORDAN, J. R. (1997): Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* 400(3), 341-4.
- KUNZELMANN, K.; MALL, M. (2002): Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev.* 82(1), 245-89.

- KUNZELMANN, K.; SCHREIBER, R.; NITSCHKE, R.; MALL, M. (2000): Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* 440(2), 193-201.
- LARSON, J. E.; COHEN, J. C. (2005): Developmental paradigm for early features of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 40(5), 371-7.
- LARSON, J. E.; DELCARPIO, J. B.; FARBERMAN, M. M.; MORROW, S. L.; COHEN, J. C. (2000): CFTR modulates lung secretory cell proliferation and differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(2), L333-41.
- LARSON, J. E.; MORROW, S. L.; DELCARPIO, J. B.; BOHM, R. P.; RATTERREE, M. S.; BLANCHARD, J. L.; COHEN, J. C. (2000): Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product. *Mol Ther.* 2(6), 631-9.
- LAVELLE, G. M.; WHITE, M. M.; BROWNE, N.; MCELVANEY, N. G.; REEVES, E. P. (2016): Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *Biomed Res Int.* 2016, 5258727.
- LEE, B.; HONG, G. S.; LEE, S. H.; KIM, H.; KIM, A.; HWANG, E. M.; KIM, J.; LEE, M. G.; YANG, J. Y.; KWEON, M. N.; TSE, C. M.; MARK, D.; OH, U. (2019): Anoctamin 1/TMEM16A controls intestinal Cl⁻ secretion induced by carbachol and cholera toxin. *Exp Mol Med.* 51(8), 1-14.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. (2006): Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 124(4), 837-48.
- LIN, C. L.; TAGGART, A. J.; FAIRBROTHER, W. G. (2016): RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. *RNA Biol.* 13(9), 766-71.
- LOPES-PACHECO, M. (2016): CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 7, 275.
- LOPES-PACHECO, M. (2019): CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* 10, 1662.
- LU, M. M.; LI, S.; YANG, H.; MORRISEY, E. E. (2002): Foxp4: a novel member of the Foxp subfamily of winged-helix genes co-expressed with Foxp1 and Foxp2 in pulmonary and gut tissues. *Mech Dev.* 119 Suppl 1, S197-202.
- LUKACS, G. L.; VERKMAN, A. S. (2012): CFTR: folding, misfolding and correcting the DeltaF508 conformational defect. *Trends Mol Med.* 18(2), 81-91.

- LV, Y. Q.; WU, J.; LI, X. K.; ZHANG, J. S.; BELLUSCI, S. (2019): Role of FGF10/FGFR2b Signaling in Mouse Digestive Tract Development, Repair and Regeneration Following Injury. *Front Cell Dev Biol.* 7, 326.
- MALL, M.; GRUBB, B. R.; HARKEMA, J. R.; O'NEAL, W. K.; BOUCHER, R. C. (2004): Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 10(5), 487-93.
- MARCORELLES, P.; MONTIER, T.; GILLET, D.; LAGARDE, N.; FEREC, C. (2007): Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol.* 42(11), 1032-40.
- MARINO, C. R.; MATOVCIK, L. M.; GORELICK, F. S.; COHN, J. A. (1991): Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreas. *J Clin Invest.* 88(2), 712-6.
- MARTINEZ, T. M.; LLAPUR, C. J.; WILLIAMS, T. H.; COATES, C.; GUNDERMAN, R.; COHEN, M. D.; HOWENSTINE, M. S.; SABA, O.; COXSON, H. O.; TEPPER, R. S. (2005): High-resolution computed tomography imaging of airway disease in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 172(9), 1133-8.
- MATSUI, H.; GRUBB, B. R.; TARRAN, R.; RANDELL, S. H.; GATZY, J. T.; DAVIS, C. W.; BOUCHER, R. C. (1998): Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell.* 95(7), 1005-15.
- MATTICK, J. S. (2001): Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2(11), 986-91.
- MCCOLLEY, S. A.; KONSTAN, M. W.; RAMSEY, B. W.; STUART ELBORN, J.; BOYLE, M. P.; WAINWRIGHT, C. E.; WALTZ, D.; VERA-LLONCH, M.; MARIGOWDA, G.; JIANG, J. G.; RUBIN, J. L. (2019): Lumacaftor/Ivacaftor reduces pulmonary exacerbations in patients irrespective of initial changes in FEV1. *J Cyst Fibros.* 18(1), 94-101.
- MCCRAY, P. B., JR.; REENSTRA, W. W.; LOUIE, E.; JOHNSON, J.; BETTENCOURT, J. D.; BASTACKY, J. (1992): Expression of CFTR and presence of cAMP-mediated fluid secretion in human fetal lung. *Am J Physiol.* 262(4 Pt 1), L472-81.
- MCCRAY, P. B., JR.; WOHLFORD-LENANE, C. L.; SNYDER, J. M. (1992): Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human fetal lung tissue by in situ hybridization. *J Clin Invest.* 90(2), 619-25.
- MCDERMOTT, S.; BARRY, S. C.; JUDGE, E. P.; COLLINS, S.; DE JONG, P. A.; TIDDENS, H. A.; MCKONE, E. F.; GALLAGHER, C. C.; DODD, J. D. (2009): Tracheomalacia in adults with

- cystic fibrosis: determination of prevalence and severity with dynamic cine CT. *Radiology*. 252(2), 577-86.
- MCGRATH, S. A.; BASU, A.; ZEITLIN, P. L. (1993): Cystic fibrosis gene and protein expression during fetal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 8(2), 201-8.
- McHUGH, D. R.; STEELE, M. S.; VALERIO, D. M.; MIRON, A.; MANN, R. J.; LEPAGE, D. F.; CONLON, R. A.; COTTON, C. U.; DRUMM, M. L.; HODGES, C. A. (2018): A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS One*. 13(6), e0199573.
- McNAMARA, J. J.; MCCOLLEY, S. A.; MARIGOWDA, G.; LIU, F.; TIAN, S.; OWEN, C. A.; STILES, D.; LI, C.; WALTZ, D.; WANG, L. T.; SAWICKI, G. S. (2019): Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lumacaftor and ivacaftor combination therapy in children aged 2-5 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: an open-label phase 3 study. *Lancet Respir Med*. 7(4), 325-335.
- MESTDAGH, P.; VAN VLIERBERGHE, P.; DE WEER, A.; MUTH, D.; WESTERMANN, F.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. (2009): A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 10(6), R64.
- MEYERHOLZ, D. K.; STOLTZ, D. A.; GANSEMER, N. D.; ERNST, S. E.; COOK, D. P.; STRUB, M. D.; LECLAIR, E. N.; BARKER, C. K.; ADAM, R. J.; LEIDINGER, M. R.; GIBSON-CORLEY, K. N.; KARP, P. H.; WELSH, M. J.; MCCRAY, P. B., JR. (2018): Lack of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator disrupts fetal airway development in pigs. *Lab Invest*. 98(6), 825-838.
- MEYERHOLZ, D. K.; STOLTZ, D. A.; NAMATI, E.; RAMACHANDRAN, S.; PEZZULO, A. A.; SMITH, A. R.; RECTOR, M. V.; SUTER, M. J.; KAO, S.; MCLENNAN, G.; TEARNEY, G. J.; ZABNER, J.; MCCRAY, P. B., JR.; WELSH, M. J. (2010): Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am J Respir Crit Care Med*. 182(10), 1251-61.
- MEYERHOLZ, D. K.; STOLTZ, D. A.; PEZZULO, A. A.; WELSH, M. J. (2010): Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol*. 176(3), 1377-89.
- MOLINSKI, S. V.; AHMADI, S.; IP, W.; OUYANG, H.; VILLELLA, A.; MILLER, J. P.; LEE, P. S.; KULLEPERUMA, K.; DU, K.; DI PAOLA, M.; ECKFORD, P. D.; LASELVA, O.; HUAN, L. J.; WELLHAUSER, L.; LI, E.; RAY, P. N.; POMES, R.; MORAES, T. J.; GONSKA, T.; RATJEN, F.; BEAR, C. E. (2017): Orkambi(R) and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue. *EMBO Mol Med*. 9(9), 1224-1243.

- MOORE, P. J.; TARRAN, R. (2018): The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease. *Expert Opin Ther Targets*. 22(8), 687-701.
- MORROW, S. L.; LARSON, J. E.; NELSON, S.; SEKHON, H. S.; REN, T.; COHEN, J. C. (1998): Modification of development by the CFTR gene in utero. *Mol Genet Metab*. 65(3), 203-12.
- NAGEL, G.; SZELLAS, T.; RIORDAN, J. R.; FRIEDRICH, T.; HARTUNG, K. (2001): Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *EMBO Rep*. 2(3), 249-54.
- OLIVIER, A. K.; GIBSON-CORLEY, K. N.; MEYERHOLZ, D. K. (2015): Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of cystic fibrosis: gastrointestinal, pancreatic, and hepatobiliary disease and pathophysiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 308(6), G459-71.
- OLVER, R. E.; STRANG, L. B. (1974): Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. *J Physiol*. 241(2), 327-57.
- OPPENHEIMER, E. H.; ESTERLY, J. R. (1975): Pathology of cystic fibrosis review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. *Perspect Pediatr Pathol*. 2, 241-78.
- ORLANDO, R. C.; POWELL, D. W.; CROOM, R. D.; BERSCHNEIDER, H. M.; BOUCHER, R. C.; KNOWLES, M. R. (1989): Colonic and esophageal transepithelial potential difference in cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 96(4), 1041-8.
- ORNOY, A.; ARNON, J.; KATZNELSON, D.; GRANAT, M.; CASPI, B.; CHEMKE, J. (1987): Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. *Am J Med Genet*. 28(4), 935-47.
- OSTEDGAARD, L. S.; MEYERHOLZ, D. K.; CHEN, J. H.; PEZZULO, A. A.; KARP, P. H.; ROKHLINA, T.; ERNST, S. E.; HANFLAND, R. A.; REZNIKOV, L. R.; LUDWIG, P. S.; ROGAN, M. P.; DAVIS, G. J.; DOHRN, C. L.; WOHLFORD-LENANE, C.; TAFT, P. J.; RECTOR, M. V.; HORNICK, E.; NASSAR, B. S.; SAMUEL, M.; ZHANG, Y.; RICHTER, S. S.; UC, A.; SHILYANSKY, J.; PRATHER, R. S.; MCCRAY, P. B., JR.; ZABNER, J.; WELSH, M. J.; STOLTZ, D. A. (2011): The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci Transl Med*. 3(74), 74ra24.
- OUSINGSAWAT, J.; MARTINS, J. R.; SCHREIBER, R.; ROCK, J. R.; HARFE, B. D.; KUNZELMANN, K. (2009): Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J Biol Chem*. 284(42), 28698-703.

- PARK, R. W.; GRAND, R. J. (1981): Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: a review. *Gastroenterology*. 81(6), 1143-61.
- PEEBLES, D.; GREGORY, L. G.; DAVID, A.; THEMIS, M.; WADDINGTON, S. N.; KNAPTON, H. J.; MIAH, M.; COOK, T.; LAWRENCE, L.; NIVSARKAR, M.; RODECK, C.; COUTELLE, C. (2004): Widespread and efficient marker gene expression in the airway epithelia of fetal sheep after minimally invasive tracheal application of recombinant adenovirus in utero. *Gene Ther.* 11(1), 70-8.
- PFÄFFL, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9), e45.
- PLOG, S.; GROTZSCH, T.; KLYMIUK, N.; KOBALZ, U.; GRUBER, A. D.; MUNDHENK, L. (2012): The porcine chloride channel calcium-activated family member pCLCA4a mirrors lung expression of the human hCLCA4. *J Histochem Cytochem.* 60(1), 45-56.
- PLOG, S.; MUNDHENK, L.; BOTHE, M. K.; KLYMIUK, N.; GRUBER, A. D. (2010): Tissue and cellular expression patterns of porcine CFTR: similarities to and differences from human CFTR. *J Histochem Cytochem.* 58(9), 785-97.
- PLOG, S.; MUNDHENK, L.; KLYMIUK, N.; GRUBER, A. D. (2009): Genomic, tissue expression, and protein characterization of pCLCA1, a putative modulator of cystic fibrosis in the pig. *J Histochem Cytochem.* 57(12), 1169-81.
- PRANKE, I.; BIDOU, L.; MARTIN, N.; BLANCHET, S.; HATTON, A.; KARRI, S.; CORNU, D.; COSTES, B.; CHEVALIER, B.; TONDELIER, D.; GIRODON, E.; COUPET, M.; EDELMAN, A.; FANEN, P.; NAMY, O.; SERMET-GAUDELUS, I.; HINZPETER, A. (2018): Factors influencing readthrough therapy for frequent cystic fibrosis premature termination codons. *ERJ Open Res.* 4(1).
- PRIMER3WEB-VERSION_4.0.0. (2016): (Internet). Abgerufen am: 04.11.2016, von <http://primer3.ut.ee/>
- RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. (2014): When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol.* 51(1), 42-87.
- RAMOS, K. J.; SMITH, P. J.; MCKONE, E. F.; PILEWSKI, J. M.; LUCY, A.; HEMPSTEAD, S. E.; TALLARICO, E.; FARO, A.; ROSENBLUTH, D. B.; GRAY, A. L.; DUNITZ, J. M. (2019): Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. *J Cyst Fibros.* 18(3), 321-333.
- RAMSEY, B. W.; DAVIES, J.; MCELVANNEY, N. G.; TULLIS, E.; BELL, S. C.; DREVINEK, P.; GRIESE, M.; MCKONE, E. F.; WAINWRIGHT, C. E.; KONSTAN, M. W.; MOSS, R.;

- RATJEN, F.; SERMET-GAUDELUS, I.; ROWE, S. M.; DONG, Q.; RODRIGUEZ, S.; YEN, K.; ORDONEZ, C.; ELBORN, J. S. (2011): A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 365(18), 1663-72.
- RANGANATHAN, S. C.; BUSH, A.; DEZATEUX, C.; CARR, S. B.; HOO, A. F.; LUM, S.; MADGE, S.; PRICE, J.; STROOBANT, J.; WADE, A.; WALLIS, C.; WYATT, H.; STOCKS, J. (2002): Relative ability of full and partial forced expiratory maneuvers to identify diminished airway function in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(10), 1350-7.
- RATCLIFF, R.; EVANS, M. J.; CUTHBERT, A. W.; MACVINISH, L. J.; FOSTER, D.; ANDERSON, J. R.; COLLEDGE, W. H. (1993): Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nat Genet.* 4(1), 35-41.
- REID, C. J.; HYDE, K.; HO, S. B.; HARRIS, A. (1997): Cystic fibrosis of the pancreas: involvement of MUC6 mucin in obstruction of pancreatic ducts. *Mol Med.* 3(6), 403-11.
- RENARD, S.; VOILLEY, N.; BASSILANA, F.; LAZDUNSKI, M.; BARBRY, P. (1995): Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflugers Arch.* 430(3), 299-307.
- RIKEN_FANTOM5_PROJECT. (2020): Expression Atlas (Internet). Abgerufen am: 20.04.2020, von <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>.
- RIORDAN, J. R.; ROMMENS, J. M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAUSIC, N.; CHOU, J. L.; ET AL. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245(4922), 1066-73.
- ROCK, J. R.; O'NEAL, W. K.; GABRIEL, S. E.; RANDELL, S. H.; HARFE, B. D.; BOUCHER, R. C.; GRUBB, B. R. (2009): Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *J Biol Chem.* 284(22), 14875-80.
- ROGERS, C. S.; STOLTZ, D. A.; MEYERHOLZ, D. K.; OSTEDGAARD, L. S.; ROKHLINA, T.; TAFT, P. J.; ROGAN, M. P.; PEZZULO, A. A.; KARP, P. H.; ITANI, O. A.; KABEL, A. C.; WOHLFORD-LENANE, C. L.; DAVIS, G. J.; HANFLAND, R. A.; SMITH, T. L.; SAMUEL, M.; WAX, D.; MURPHY, C. N.; RIEKE, A.; WHITWORTH, K.; UC, A.; STARNER, T. D.; BROGDEN, K. A.; SHILYANSKY, J.; MCCRAY, P. B., JR.; ZABNER, J.; PRATHER, R. S.; WELSH, M. J. (2008): Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 321(5897), 1837-41.
- ROMMENS, D. J. M. (2011): Cystic Fibrosis Mutation Database (Internet). Letzte Aktualisierung: 25.04.2011. Abgerufen am: 15.04.2020, von <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>

- ROWNTREE, R. K.; HARRIS, A. (2003): The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 67(Pt 5), 471-85.
- SALVATORE, F.; SCUDIERO, O.; CASTALDO, G. (2002): Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet.* 111(1), 88-95.
- SATHE, M.; HOUWEN, R. (2017): Meconium ileus in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros.* 16 Suppl 2, S32-s39.
- SAWICKI, G. S.; REN, C. L.; KONSTAN, M. W.; MILLAR, S. J.; PASTA, D. J.; QUITTNER, A. L. (2013): Treatment complexity in cystic fibrosis: trends over time and associations with site-specific outcomes. *J Cyst Fibros.* 12(5), 461-7.
- SCHADENDORF, D.; CZARNETZKI, B. M. (1991): Gene amplification by polymerase chain reaction in dermatology. *J Invest Dermatol.* 97(5), 751-5.
- SCHLICHENMAIER, H.; STEFFL, M.; SINOWATZ, F.; AMSELGRUBER, W. M. (2002): Expression of cytokeratin 18 during pre- and post-natal porcine lung development. *Anat Histol Embryol.* 31(5), 273-7.
- SCHOLTE, B. J.; DAVIDSON, D. J.; WILKE, M.; DE JONGE, H. R. (2004): Animal models of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 3 Suppl 2, 183-90.
- SHI, W.; BELLUSCI, S.; WARBURTON, D. (2007): Lung development and adult lung diseases. *Chest.* 132(2), 651-6.
- SLY, P. D.; BRENNAN, S.; GANGELL, C.; DE KLERK, N.; MURRAY, C.; MOTT, L.; STICK, S. M.; ROBINSON, P. J.; ROBERTSON, C. F.; RANGANATHAN, S. C. (2009): Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med.* 180(2), 146-52.
- SMITH, D. E.; OTULAKOWSKI, G.; YEGER, H.; POST, M.; CUTZ, E.; O'BRODOVICH, H. M. (2000): Epithelial Na⁺ channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 161(4 Pt 1), 1322-31.
- SMITH, J. J.; TRAVIS, S. M.; GREENBERG, E. P.; WELSH, M. J. (1996): Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 85(2), 229-36.
- SNOUWAERT, J. N.; BRIGMAN, K. K.; LATOUR, A. M.; MALOUF, N. N.; BOUCHER, R. C.; SMITHIES, O.; KOLLER, B. H. (1992): An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science.* 257(5073), 1083-8.

- STOLTZ, D. A.; MEYERHOLZ, D. K.; PEZZULO, A. A.; RAMACHANDRAN, S.; ROGAN, M. P.; DAVIS, G. J.; HANFLAND, R. A.; WOHLFORD-LENANE, C.; DOHRN, C. L.; BARTLETT, J. A.; NELSON, G. A. T.; CHANG, E. H.; TAFT, P. J.; LUDWIG, P. S.; ESTIN, M.; HORNICK, E. E.; LAUNSPACH, J. L.; SAMUEL, M.; ROKHLINA, T.; KARP, P. H.; OSTEDGAARD, L. S.; UC, A.; STARNER, T. D.; HORSWILL, A. R.; BROGDEN, K. A.; PRATHER, R. S.; RICHTER, S. S.; SHILYANSKY, J.; MCCRAY, P. B., JR.; ZABNER, J.; WELSH, M. J. (2010): Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med.* 2(29), 29ra31.
- STOLTZ, D. A.; MEYERHOLZ, D. K.; WELSH, M. J. (2015): Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med.* 372(16), 1574-5.
- STOLTZ, D. A.; ROKHLINA, T.; ERNST, S. E.; PEZZULO, A. A.; OSTEDGAARD, L. S.; KARP, P. H.; SAMUEL, M. S.; REZNIKOV, L. R.; RECTOR, M. V.; GANSEMER, N. D.; BOUZEK, D. C.; ABOU ALAIWA, M. H.; HOEGGER, M. J.; LUDWIG, P. S.; TAFT, P. J.; WALLEN, T. J.; WOHLFORD-LENANE, C.; MCMENIMEN, J. D.; CHEN, J. H.; BOGAN, K. L.; ADAM, R. J.; HORNICK, E. E.; NELSON, G. A. T.; HOFFMAN, E. A.; CHANG, E. H.; ZABNER, J.; MCCRAY, P. B., JR.; PRATHER, R. S.; MEYERHOLZ, D. K.; WELSH, M. J. (2013): Intestinal CFTR expression alleviates meconium ileus in cystic fibrosis pigs. *J Clin Invest.* 123(6), 2685-93.
- SUN, X.; YI, Y.; YAN, Z.; ROSEN, B. H.; LIANG, B.; WINTER, M. C.; EVANS, T. I. A.; ROTTI, P. G.; YANG, Y.; GRAY, J. S.; PARK, S. Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Y.; MOLL, S. R.; WOODY, L.; TRAN, D. M.; JIANG, L.; VONK, A. M.; BEEKMAN, J. M.; NEGULESCU, P.; VAN GOOR, F.; FIORINO, D. F.; GIBSON-CORLEY, K. N.; ENGELHARDT, J. F. (2019): In utero and postnatal VX-770 administration rescues multiorgan disease in a ferret model of cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 11(485).
- Taylor, C. J.; Hardcastle, J. (2006): Gut Disease: Clinical Manifestations, Pathophysiology, Current and New Treatments. In: *Cystic Fibrosis in the 21st Century.* / Hrsg. A. Bush, E. W. F. W. Alton, J. C. Davies, U. Griesenbach and A. Jaffe. Basel: Karger. S. 232-241.
- TIDDENS, H. A.; DONALDSON, S. H.; ROSENFELD, M.; PARE, P. D. (2010): Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? *Pediatr Pulmonol.* 45(2), 107-17.
- TIZZANO, E. F.; CHITAYAT, D.; BUCHWALD, M. (1993): Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. *Hum Mol Genet.* 2(3), 219-24.
- TIZZANO, E. F.; O'BRODOVICH, H.; CHITAYAT, D.; BENICHO, J. C.; BUCHWALD, M. (1994): Regional expression of CFTR in developing human respiratory tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10(4), 355-62.

- TREZISE, A. E.; CHAMBERS, J. A.; WARDLE, C. J.; GOULD, S.; HARRIS, A. (1993): Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet.* 2(3), 213-8.
- Trezise, A. E. O. (2006): Exquisite and multilevel regulation of CFTR expression. In: *Cystic Fibrosis in the 21st Century.* / Hrsg. A. Bush, E. W. F. W. Alton, J. C. Davies, U. Griesenbach and A. Jaffe. Basel: Karger. S. 11-20.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. (2012): Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15), e115.
- US CF FOUNDATION, J. H. U. (2020): The Clinical and Functional TRanslation of CFTR (CFTR2)(Internet). Letzte Aktualisierung: 10.01.2020. Abgerufen am: 17.04.2020, von <https://www.cfr2.org/>.
- VAN DER DOEF, H. P.; KOKKE, F. T.; VAN DER ENT, C. K.; HOUWEN, R. H. (2011): Intestinal obstruction syndromes in cystic fibrosis: meconium ileus, distal intestinal obstruction syndrome, and constipation. *Curr Gastroenterol Rep.* 13(3), 265-70.
- VAN DOORNINCK, J. H.; FRENCH, P. J.; VERBEEK, E.; PETERS, R. H.; MORREAU, H.; BIJMAN, J.; SCHOLTE, B. J. (1995): A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *Embo j.* 14(18), 4403-11.
- VAN GOOR, F.; HADIDA, S.; GROOTENHUIS, P. D.; BURTON, B.; STACK, J. H.; STRALEY, K. S.; DECKER, C. J.; MILLER, M.; MCCARTNEY, J.; OLSON, E. R.; WINE, J. J.; FRIZZELL, R. A.; ASHLOCK, M.; NEGULESCU, P. A. (2011): Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(46), 18843-8.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7), 1-11.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7), Research0034.
- VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 44(5), 619-26.
- VENKATESH, V. C.; KATZBERG, H. D. (1997): Glucocorticoid regulation of epithelial sodium channel genes in human fetal lung. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1), L227-33.

- VERKMAN, A. S.; SONG, Y.; THIAGARAJAH, J. R. (2003): Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(1), C2-15.
- VOILLEY, N.; LINGUEGLIA, E.; CHAMPIGNY, G.; MATTEI, M. G.; WALDMANN, R.; LAZDUNSKI, M.; BARBRY, P. (1994): The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(1), 247-51.
- WALTON, K. D.; MISHKIND, D.; RIDDLE, M. R.; TABIN, C. J.; GUMUCIO, D. L. (2018): Blueprint for an intestinal villus: Species-specific assembly required. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 7(4), e317.
- WANNER, A.; SALATHE, M.; O'RIORDAN, T. G. (1996): Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 154(6 Pt 1), 1868-902.
- WARBURTON, D.; BELLUSCI, S.; DE LANGHE, S.; DEL MORAL, P. M.; FLEURY, V.; MAILLEUX, A.; TEFFT, D.; UNBEKANDT, M.; WANG, K.; SHI, W. (2005): Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res.* 57(5 Pt 2), 26r-37r.
- WARBURTON, D.; EL-HASHASH, A.; CARRARO, G.; TIOZZO, C.; SALA, F.; ROGERS, O.; DE LANGHE, S.; KEMP, P. J.; RICCARDI, D.; TORDAY, J.; BELLUSCI, S.; SHI, W.; LUBKIN, S. R.; JESUDASON, E. (2010): Lung organogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 90, 73-158.
- Welsh, M. J.; Ramsey, B. W.; Accurso, F.; Cutting, G. R. (2001): Cystic Fibrosis. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* / Hrsg. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly et al. New York: McGraw-Hill. S. 5121-89.
- WELSH, M. J.; ROGERS, C. S.; STOLTZ, D. A.; MEYERHOLZ, D. K.; PRATHER, R. S. (2009): Development of a porcine model of cystic fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 120, 149-62.
- WINE, J. J. (2010): The development of lung disease in cystic fibrosis pigs. *Sci Transl Med.* 2(29), 29ps20.
- WINTER, M. C.; WELSH, M. J. (1997): Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature.* 389(6648), 294-6.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2020): Genes and human diseases - cystic fibrosis (Internet). Abgerufen am: 15.04.2020, von <https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#CF>.

- XIA, E.; MUNEGOWDA, M. A.; CAO, H.; HU, J. (2014): Lung gene therapy-How to capture illumination from the light already present in the tunnel. *Genes Dis.* 1(1), 40-52.
- ZABNER, J.; SMITH, J. J.; KARP, P. H.; WIDDICOMBE, J. H.; WELSH, M. J. (1998): Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell.* 2(3), 397-403.
- ZHOU, L.; DEY, C. R.; WERT, S. E.; DUVALL, M. D.; FRIZZELL, R. A.; WHITSETT, J. A. (1994): Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR. *Science.* 266(5191), 1705-8.
- ZHOU, Z.; DUERR, J.; JOHANNESSON, B.; SCHUBERT, S. C.; TREIS, D.; HARM, M.; GRAEBER, S. Y.; DALPKE, A.; SCHULTZ, C.; MALL, M. A. (2011): The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 10 Suppl 2, S172-82.
- ZHOU, Z.; WANG, X.; LI, M.; SOHMA, Y.; ZOU, X.; HWANG, T. C. (2005): High affinity ATP/ADP analogues as new tools for studying CFTR gating. *J Physiol.* 569(Pt 2), 447-57.
- ZIELENSKI, J.; COREY, M.; ROZMAHEL, R.; MARKIEWICZ, D.; AZNAREZ, I.; CASALS, T.; LARRIBA, S.; MERCIER, B.; CUTTING, G. R.; KREBSOVA, A.; MACEK, M., JR.; LANGFELDER-SCHWIND, E.; MARSHALL, B. C.; DECELIE-GERMANA, J.; CLAUSTRES, M.; PALACIO, A.; BAL, J.; NOWAKOWSKA, A.; FEREC, C.; ESTIVILL, X.; DURIE, P.; TSUI, L. C. (1999): Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet.* 22(2), 128-9.
- ZUELZER, W. W.; NEWTON, W. A., JR. (1949): The pathogenesis of fibrocystic disease of the pancreas; a study of 36 cases with special reference to the pulmonary lesions. *Pediatrics.* 4(1), 53-69.

12 Anhang

12.1 Alter, Größe, Gewicht und Konservierungstechnik der verwendeten Tiere

Tabelle 21: Alter, Gewicht, Größe der untersuchten Schweine sowie die Konservierungsart von deren Organen.

V-Nummer	Alter /GT	Gewicht (kg)	SSL (cm)	Konservierungsart	Bemerkung
V 190/12	15 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 16
V 191/12	37. GT	0,004	3,2	Formalin	
V196/12	37. GT	0,005	3,6	Formalin	
V 197/12	37. GT	0,004	3,41	Formalin	
V 202/12	37. GT	0,003	3,2	Formalin	
V 192/12	37. GT	0,005	3,55	Kryo	
V193/12	37. GT	0,004	3,6	Kryo	
V 194/12	37. GT	0,004	3,53	Kryo	
V 195/12	37. GT	0,005	3,54	Kryo	
V 362/12	15 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 20
V 363/12	45. GT	0,013	6,1	Formalin	
V 364/12	45. GT	0,02	6,7	Formalin	
V 365/12	45. GT	0,013	5,53	Formalin	
V 366/12	45. GT	0,014	6,13	Formalin	
V 367/12	45. GT	0,02	6,5	Formalin	
V 379/12	45. GT	0,015	6	Kryo	
V 380/12	45. GT	0,019	7	Kryo	
V 381/12	45. GT	0,018	6,3	Kryo	
V 382/12	45. GT	0,021	7,1	Kryo	
V 384/12	14 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 16
V 389/12	56. GT	0,086	12	Formalin	
V 390/12	56. GT	0,087	11,9	Formalin	
V 391/12	56. GT	0,082	11,5	Formalin	
V 392/12	56. GT	0,074	11,8	Formalin	
V 385/12	56. GT	0,083	12,44	Kryo	
V 386/12	56. GT	0,092	12,2	Kryo	
V 387/12	56. GT	0,08	11,7	Kryo	
V 388/12	56. GT	0,092	12,52	Kryo	
V 401/12	14 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 17 +2 Mumien
V 442/12	64. GT	0,176	15,8	Formalin	
V 443/12	64. GT	0,181	14,6	Formalin	
V 444/12	64. GT	0,175	15	Formalin	
V 445/12	64. GT	0,171	15,4	Formalin	

Fortsetzung Tabelle 21: Alter, Gewicht, Größe der untersuchten Schweine sowie die Konservierungsart von deren Organen.

V-Nummer	Alter /GT	Gewicht (kg)	SSL (cm)	Konservierungsart	Bemerkung
V 402/12	64. GT	0,167	13,2	Kryo	
V 403/12	64. GT	0,179	15,14	Kryo	
V 404/12	64. GT	0,179	15	Kryo	
V 441/12	64. GT	0,172	14,4	Kryo	
V 502/12	14 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 11
V 503/12	71. GT	0,177	15,3	Formalin	
V 504/12	71. GT	0,243	17,7	Formalin	
V 505/12	71. GT	0,223	17,8	Formalin	
V 506/12	71. GT	0,218	17,1	Formalin	
V 507/12	71. GT	0,206	16,8	Kryo	
V 508/12	71. GT	0,21	17	Kryo	
V 509/12	71. GT	0,167	15,8	Kryo	
V 510/12	71. GT	0,22	17	Kryo	
V 537/12	13 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 17 + 3 Mumien
V 538/12	85. GT	0,5	23	Formalin	
V 539/12	85. GT	0,4	20,6	Formalin	
V 540/12	85. GT	0,375	21	Formalin	
V 541/12	85. GT	0,504	21,5	Formalin	
V 542/12	85. GT	0,365	16,9	Kryo	
V 543/12	85. GT	0,328	16,2	Kryo	
V 544/12	85. GT	0,439	17,6	Kryo	
V 545/12	85. GT	0,365	17	Kryo	
V 575/12	13 mo	160		Formalin und Kryo	Anzahl Feten: 17
V 576/12	98. GT	0,667	24,7	Formalin	
V 577/12	98. GT	0,672	25	Formalin	
V 578/12	98. GT	0,744	24,5	Formalin	
V 579/12	98. GT	0,78	25,5	Formalin	
V 580/12	98. GT	0,845	20,2	Kryo	
V 581/12	98. GT	0,771	20,9	Kryo	
V 582/12	98. GT	0,891	22,1	Kryo	
V 583/12	98. GT	0,902	21,2	Kryo	
Achte Sau am Leben gelassen					Anzahl Feten: 14
V 672/12	p.p.	1,402	30,2	Formalin und Kryo	
V 673/12	p.p.	1,542	31,3	Formalin und Kryo	
V 674/12	p.p.	1,33	30	Formalin und Kryo	
V 675/12	p.p.	1,425	30,5	Formalin und Kryo	

mo: Monate. GT: Gestationstag. p.p.: post partum. Formalin: Formalinfixierung in 4%igem gepufferten Formalin. Kryo: Kryokonservierung durch Abkühlung in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80 °C.

12.2 Verwendete Chemikalien und Geräte sowie deren Hersteller

Tabelle 22 Wirkstoffe, Produktname und deren Hersteller, die zur Euthanasie der Tiere verwendet wurden.

Wirkstoff	Produktname	Firma
Azaperon	Stresnil	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Embutramid	T-61	Intervet, Wien, Österreich
Ketamin	Ursotamin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Phenobarbital	Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

Tabelle 23 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmittel sowie deren Hersteller, die zur total-RNA-Extraktion genutzt wurden.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Firma
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eppendorf PCR Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipetten, Einkanal, variabel, 2-20 µl (hellgrau), 20-200 µl (gelb), 100-1000 µl (blau)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 3810X, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Pipettenspitzen, steril mit Filter, 10 µl, 300 µl bzw. 1000 µl Volumen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus Fresco21 centrifuge	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
Lysing Matrix D Tubes 2 ml	MP Biomedicals, LLC Ohio, USA
NucleoSpin® RNA II Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PreCellys24 Homogenisator	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Skalpellsklingen Figur 15	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tabelle 24 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle der totalRNA sowie zum Umschreiben zur cDNA genutzt wurden.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Agilent RNA 6000-Nano-LabChip-Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Tabelle 25 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die PCR- und RT-qPCR-Experimente und deren Produkt-Aufreinigung genutzt wurden.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Hersteller
10x DreamTaq Green Buffer	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
96-Well Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
BioRad CFX96 Realtime System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
BioRad CFX96 Manager Software 2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
dNTP Mix, 2nM each	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
DEPC-Wasser	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
Eppendorf Pipetten, Einkanal, variabel, 2-20 µl (hellgrau), 20-200 µl (gelb), 100-1000 µl (blau)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Pipettenspitzen, steril mit Filter, 10 µl, 300 µl bzw. 1000 µl Volumen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Maxima Probe qPCR Master Mix (2x)	Thermo Fischer Diagnostics GmbH, Henningsdorf, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 25: Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die PCR- und RT-qPCR-Experimente und deren Produkt-Aufreinigung genutzt wurden.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Hersteller
Maxima SYBR™ Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Thermo Fischer Diagnostics GmbH, Henningsdorf, Deutschland
Microsoft® Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NucleoSpin® Extract II Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland

Tabelle 26 *Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die Herstellung der Paraffinblöcke, die Herstellung von Leerschnitten und durchgeführten histologische und immunhistologische Färbungen sowie deren Auswertung genutzt wurden.*

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Hersteller
4%iges gepuffertes Formalin (pH 7,0)	Th.Geyer, Renningen, Deutschland
Aqua dest.	Hausinterne Destillieranlage
BSA, Bovine Serum Albumin	Thermo Fischer Diagnostics GmbH, Henningsdorf, Deutschland
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cryoconsole Ausgießstation (Typ: EC350-1)	Intertek, Echterdingen, Deutschland
DAB	Merck, Darmstadt, Germany
Deckgläser 24 x 50 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Ethanol	Berkel AHK GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
GNS, <i>goat normal serum</i>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>goat anti-rabbit igG</i> (biotin)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Isopropanol 100 %	Berkel AHK GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Leica CV 5030 Färbe- und Eindeckautomaten	Leica Biosystems, Nussloch

Fortsetzung Tabelle 26: Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller, die für die Herstellung der Paraffinblöcke, die Herstellung von Leerschnitten und durchgeführten histologische und immunhistologische Färbungen sowie deren Auswertung genutzt wurden.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte	Hersteller
Marienfeld Superior™ Färbekästen und Gestelle aus Natron-Kalk-Glas	Thermo Fischer Diagnostics GmbH, Henningsdorf, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklinge	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Olympus BX41 Mikroskop	Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
PBS Tabletten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 325	Microm GmbH, Neuss, Deutschland
Rotiblock	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti® Histokit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellklingen Form 10	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
SuperFrost® Objektträger (beschichtet)	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Triton® X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
VECTASTAIN® Elite ABC kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Th.Geyer, Renningen, Deutschland

13 Publikationsliste

Vortrag

- Binder, S.; Mundhenk, L.; Plog, S.; Gruber, A. D. (2014):
Pränatale Expression des porcine Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (pCFTR): spielt er eine Rolle in der Organogenese?
57. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fulda – 08.03.- 09.03.2014. In: Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere; **42**(2), S. A20

14 Finanzielle Förderung

Die vorliegende Arbeit wurde unter dem Titel „Pathologische Charakterisierung der CFTR-Knock-Out Schweine“ durch den Mukoviszidose e. V. im Rahmen des Forschungsprojekts „Generation of CFTR-mutant Pig Models of Cystic Fibrosis“ (S01/11) finanziell unterstützt. Die finanzielle Förderung erfolgte hierbei durch Sachmittel. Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

15 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

An erster Stelle möchte ich Herrn **Prof. Dr. Achim Gruber** für die Bereitstellung dieses spannenden Themas sowie die wertvollen Anregungen und Unterstützung in allen fachlichen Fragen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Lars Mundhenk**, der mir während der Laborarbeiten selbst unter ungünstigen Umständen stets mit Rat zur Seite stand. Die fachlichen Diskussionen und seine Anmerkungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich Frau **Jana Enders**, Frau **Michaela Dauer** und Frau **Petra Nehrig** herzlich für die Einführung in die verschiedenen Labortechniken und das bereitwillige Beantworten von Fragen danken.

Ein besonderer Dank geht an Frau **Nancy A. Erickson, Ph.D.**, für ihre Freundschaft seit dem ersten Tag des Studiums, das gemeinsame fachliche Wachsen, den geteilten Wahnsinn und ihre Eigenschaft, immer die richtigen Worte zu finden.

Dem **gesamten Team der Tierpathologie der Freien Universität Berlin** möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken, die stets von Respekt geprägt war. Für all die Lacher auf den Fluren und das Aufmuntern, wenn nötig.

Von Herzen danke ich **meiner Familie**, die mich immer unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat. Ihr habt mir starke Wurzeln gegeben. Ein besonderer Dank geht an Herrn **Ronny Treyße**, für seine außerordentliche Unterstützung und seinen wunderbaren Humor. Du verleihst mir Flügel.

16 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, 18.02.2021

Stefanie Binder



9 783967 291056

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-105-6