

6 Diskussion

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit bestand darin, dass bestimmte CLCA-mRNA und -Proteine im Darm von Zystische Fibrose-Mäusen vermehrt exprimiert sein könnten, sofern diese Genfamilie tatsächlich als Vermittler einer hochregulierten alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit fungiert. Ziel der Arbeit war es daher, mit kombinierten quantitativen mRNA-Expressionsstudien und immunhistochemischen Methoden eine eventuelle Heraufregulation der CLCA-Vertreter mCLCA1 bis mCLCA4 im Darm von CF-Mäusen unterschiedlicher genetischer Defekte und Stämme zu detektieren und damit einen Hinweis zu erhalten, ob der in elektrophysiologischen Studien beobachteten Ca²⁺-aktivierbaren Cl⁻-Leitfähigkeit einer dieser vier murinen Vertreter zugrunde liegen könnte. Gleichzeitig sollte mit einer Quantifizierung der mCLCA3- und PAS-positiven Becherzellen getestet werden, ob Veränderungen der mCLCA3-mRNA-Expression mit Zu- oder Abnahmen der Becherzellen zusammenhängt, oder ob sich die Transkription in den Einzelzellen verändert. Außerdem wurden mit spezifischen immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von Apoptosen und Mitosen in Kombination mit der durchschnittlichen Erfassung der Darmepithelzellzahl getestet, ob Veränderungen der mRNA-Expressionsraten im Zusammenhang mit einer veränderten Darmepithelzellkinetik stehen. Außerdem konnten die mRNA-Expressionsdaten anhand der Häufigkeit des für die jeweiligen Homologen stehenden Zelltypen (Becherzellen=mCLCA3 exprimierend, Enterozyten=mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4 exprimierend) relativiert werden und eine mRNA-Hochregulation pro Einzelzelle von einer mRNA-Hochregulation aufgrund einer Zellhyperplasie unterschieden werden.

Um eventuell bestehende Stammeseinflüsse auf die Regulation der CLCA-Expression zu untersuchen, wurden dabei drei ingezüchtete Mausstämme (BALB/cJ, C57BL/6J, DBA/2J) untersucht, also drei genetische Hintergründe zum Vergleich gewählt, die jeweils sehr homogen sind und den individuellen genetischen Einfluss des Einzeltieres minimieren. Eine Gruppengröße von fünf Tieren pro Genotyp (CF und WT) wurde deswegen als ausreichend groß angesehen, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Die CF-Gruppen dieser drei Mausstämme trugen jeweils die Mutation *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (DORIN et al. 1992), eine Mutation, die durch alternatives Spleißen bis zu 20% WT-CFTR-Protein-Expression im Darm aufweist (DORIN et al. 1994). Betroffene Mäuse zeigen einen mild ausgeprägten Phänotyp,

der sich als recht robust hinsichtlich der Dauer der Überlebenszeit und Vermehrbarkeit erweist. Da bei dieser CF-Mutation bekannt ist, dass der Phänotyp im Absetzalter (3 Wochen) bereits gut ausgeprägt ist (DORIN et al. 1992) und sich mit zunehmendem Alter die histopathologischen Veränderungen im Darm deutlicher ausprägen (GRUBB u. GABRIEL 1997), wurden die Tiere erst mit 9-11 Wochen euthanasiert. Nicht nur die gute Vitalität der $cftr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Mutation macht dieses Modell zu einem hervorragenden Studienobjekt für die Erforschung modifizierender Gene, sondern auch die Vergleichbarkeit zur häufigsten CF-Mutation des Menschen, $\Delta F508$. Diese weist ebenfalls eine cAMP-aktivierbare Cl^- -Restleitfähigkeit durch CFTR-Proteine auf, die aufgrund des Prozessierungsdefekts nur zu einem verminderten Anteil die Plasmamembran erreichen (BRONSVELD et al. 2000). Um die Regulation der CLCA-Expression bei unterschiedlichen CF-Mutationen zu vergleichen, wurde zusätzlich zu dem $cftr^{TgH(neoim)1Hgu}$ -Modell das $cftr^{tm1Cam}$ -Modell untersucht (RATCLIFF et al. 1993). Da diese Mutation zu einem vollständigen Verlust der CFTR-Protein-Expression führt und im Ursprungsstamm mit einer Sterblichkeit von 80% in den ersten Lebenstagen einhergeht (RATCLIFF et al. 1993), wurde ein ausgezüchteter genetischer Hintergrund, NMRI, gewählt. In dem genetischen Hintergrund NMRI haben die betroffenen Tiere eine längere Überlebenszeit bei zusätzlicher Applikation eines oralen Laxativums ab dem Absetzalter. Allein diese Tatsache beweist den starken Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Ausprägungsgrad der Erkrankung. Da bei den bisher bekannten Mausmodellen ein Mukus-Ileus vor allem für das Jejunum und Ileum und weniger häufig für den Dickdarm beschrieben wird (ROZMA-HEL et al. 1996) und dies vermutlich mit der Pathophysiologie eines vor allem sekretorischen Defekts zusammenhängt (GRUBB u. GABRIEL 1997), wurden für die vorliegende Arbeit Dünndarmproben verwendet. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Verwendung von Dickdarm waren sowohl größere Materialmengen als auch eine bessere Probenqualität, dadurch dass der Dünndarm nach einer Fastenzeit von wenigen Stunden vor der Euthanasie praktisch frei von Ingesta war.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression der vier murinen CLCA-Vertreter im Dünndarm von vier unterschiedlichen Mausstämmen, die zwei unterschiedliche $cftr$ -Mutationen trugen, quantifiziert. Um eine spezifische, quantitative Aussage über die mRNA-Expression der mCLCA-Vertreter-1 bis -4 treffen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) im *real-time* Modus etabliert,

bzw. für mCLCA1 und mCLCA2 von Vorarbeiten, die in unserer Arbeitsgruppe entstanden sind, übernommen (HORSTMEIER 2003; LEVERKOEHNE et al. 2002). Diese Untersuchungsmethode kombiniert die Amplifikation, Detektion und Quantifizierung in einem Reaktionsansatz. Zu den Vorzügen dieser Methode zählen die hohe Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Daten, die durch ausgewählte Primer- /Sondenkombinationen erzielt werden. Zusätzlich zu den Primerpaaren, die als Begrenzung des Amplikons einen wichtigen Beitrag zur Spezifität und Sensitivität liefern, werden diese noch durch eine Oligonukleotidsonde erhöht, die während der Anlagerungs- und Extensionsphase der PCR an das Amplikon hybridisiert (BUSTIN 2000). Für die RT-qPCR in dieser Arbeit wurde wegen der Stabilität bei hohen Temperaturen ein *TaqMan* Assay, bestehend aus *Taq*-Polymerase und *TaqMan*-Sonden, verwendet.

Die Sensitivität der Methode wurde anhand der CT-Werte der untersuchten Verdünnungsreihen beurteilt. Dazu wurden Verdünnungen von mCLCA1-, mCLCA2- und mCLCA3-Plasmid-cDNA, oder ein mCLCA4-PCR-Produkt mit 10^2 bis 10^9 Kopien pro quantitativen PCR-Ansatz untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass 10^2 Kopien der untersuchten cDNA von mCLCA1 bis -3 sicher nachgewiesen werden konnten. Die Standardabweichungen waren gering (< 1 CT-Wert), was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterstreicht. Die Sensitivität der Primer- /Sondenkombination für die Detektion von mCLCA4 wurde bewusst durch die Heraufsetzung des Fluoreszenz-Schwellenwertes und der Anlagerungstemperatur herabgesetzt, um Kreuzreaktionen sicher vermeiden zu können. Es wurde nur noch eine Kopienzahlmenge von 10^3 sicher nachgewiesen, diese aber mit hoher Gleichförmigkeit (Standardabweichung $< 0,29$ CT-Werte) und unter völligem Ausschluss von Kreuzreaktionen. Des Weiteren wurde die Spezifität der Primer- /Sondenkombinationen überprüft. Dieser Vorversuch ist von maßgeblicher Bedeutung für die Bewertung der etablierten RT-qPCR-Methode, da die mCLCA-Vertreter -1 und -2 auf Nukleinsäureebene zu 96% identisch und mCLCA1 und -2 im Vergleich zu mCLCA4 zu 85% identisch sind. Die Nukleinsäureübereinstimmungen von mCLCA1, -2 und -4 im Vergleich zu mCLCA3 liegen dagegen nur bei 58-60%.

Die Spezifität der etablierten Methode wurde durch den Einsatz „heterologer“ cDNA in verschiedenen Konzentrationen als Template sichergestellt. Dazu wurde jede cDNA-Spezies in Zehner-Verdünnungsstufen von 10^2 bis 10^9 Kopien pro PCR-Ansatz in einer RT-qPCR mit

einer Primer- /Sondenkombination eingesetzt, die jeweils spezifisch für nur eines der Homologe war. Die Ergebnisse zeigten, dass erst bei sehr hohen Template-Konzentrationen Kreuz-Amplifikationen auftraten, bei denen lediglich hohe CT-Werte gemessen wurden, die auf eine sehr geringe Amplifikationseffektivität schließen lassen. So wurden für die mCLCA1-Primer- /Sondenkombination schwache Kreuzreaktionen mit allen drei Homologen festgestellt: mit mCLCA2-cDNA ab Kopienzahlen von mindestens 10^6 , mit mCLCA3-cDNA ab 10^9 und mit mCLCA4 ab 10^5 . Diese Reaktionen waren sehr schwach und traten bei mCLCA2 und -4 bei Kopienzahlen von 10^6 und bei mCLCA3 bei Kopienzahlen von 10^9 mit einer Zyklenzahl über 36 auf. Diese Zyklenzahlen traten bei der Detektion von mCLCA1 erst bei 5fach (Vergleich mit mCLCA2 und -4) oder 8fach (Vergleich mit mCLCA3) niedrigeren Kopienzahlverdünnungen auf.

Die Primer- /Sondenkombination, die mCLCA2 detektierte, zeigte eine äußerst schwache Kreuz-Amplifikation mit mCLCA3-cDNA und keine Kreuzreaktionen mit mCLCA1- und mCLCA4-cDNA. Diese trat bei Verdünnungsstufen ab mindestens 10^8 mit CT-Werten von über 35 auf. Damit war die Kreuzreaktion um ein 6 bis 7faches insensitiver als die Detektion von mCLCA2.

Die mCLCA3-Primer- /Sondenkombination zeigte schwache Kreuzreaktionen mit mCLCA2- und mCLCA4-cDNA und keine Detektion von mCLCA1-cDNA. Die Kreuzreaktionen traten bei hohen Zyklenzahlen über 34 und bei hohen Templatekonzentrationen ab 10^8 (mCLCA2) und 10^7 (mCLCA4) auf. Die Amplifikationseffektivität war damit um ein 6 bis 7faches geringer als bei mCLCA3-cDNA.

Die Primer- /Sondenkombination, die zur Detektion von mCLCA4 ausgewählt wurde, zeigte keine Kreuz-Amplifikationen mit den drei homologen cDNA-Spezies. Insgesamt traten sämtliche Kreuzreaktionen bei so hohen Templatekonzentrationen auf, wie sie im Hauptversuch nicht vorkamen. Daher ist davon auszugehen, dass im Hauptversuch ausschließlich spezifische Ergebnisse erzielt wurden.

Da sich die ausgesuchten Primer und die Sonde der RT-qPCR zur Detektion von mCLCA2 jeweils nur in 1 bis 3 bp von dem entsprechenden Sequenzbereich der mCLCA1- und mCLCA4-cDNA unterschieden, wurde die Spezifität dieses Assays zur Detektion von mCLCA2 in einem kompetitiven Versuchsansatz nochmals überprüft. Hierbei lagen als Template zugleich alle vier homologen cDNA-Spezies pro Verdünnungsstufe im Reaktions-

ansatz vor. Daneben wurde eine Verdünnungsreihe reiner mCLCA2-cDNA mit den gleichen Konzentrationen pipettiert. Es wurde verglichen, ob in beiden Verdünnungsreihen, auch im Beisein konkurrierender Templates, die mCLCA2-cDNA von der mCLCA2-Sonde und -Primern mit derselben Effektivität amplifiziert wird. In diesem Versuch wurde deutlich, dass die mCLCA2-cDNA in Anwesenheit konkurrierender Templates mit der gleichen Sensitivität und Spezifität detektiert wurde, als wenn reine mCLCA2-cDNA als Template vorgelegen hätte.

Nach den Ergebnissen dieser Vorversuche ist also anzunehmen, dass die für die vier mCLCA-Spezies detektierten Kopienzahlwerte spezifisch sind. Die kürzlich, während der Anfertigung dieser Arbeit, veröffentlichten mCLCA-Homologen -5 und -6 besitzen stärkste Sequenzverwandtschaften zu den beiden humanen Vertretern mCLCA2 und -4 und sind den hier untersuchten mCLCA-Spezies recht unähnlich. Die cDNA-Sequenzhomologie zwischen mCLCA1 bis 4 zu mCLCA5 und mCLCA6 bewegt sich zwischen 47 bis 60% (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). Eine eventuelle Kreuzreaktion mit diesen beiden neuen mCLCA-Vertretern scheint daher sehr unwahrscheinlich.

Als Kriterium für die Reproduzierbarkeit wurde der Variationskoeffizient der CT-Werte zwischen den verschiedenen Messdurchgängen herangezogen. Die cDNA der einzelnen Proben wurde zweifach (teilweise vierfach) in Form von Triplikaten in jedem Messdurchgang untersucht. Dabei lag der Variationskoeffizient innerhalb und zwischen den Läufen stets zwischen 0 und 5%, was den Empfehlungen von BUSTIN (2000) entspricht.

Zur Normalisierung der Messdaten wurde außerdem die cDNA-Kopienzahl des *Housekeeping*-Gens EF-1 α in allen Darmgewebeproben über die Bestimmung der entsprechenden CT-Werte für EF-1 α ermittelt. EF-1 α wird in allen Zell- und Gewebetypen mit vergleichsweise konstanter Kopienzahl exprimiert und eignet sich daher als universelle Referenz-mRNA-Spezies (GRUBER u. LEVINE 1997). Damit konnten in der vorliegenden Studie Variationen der eingesetzten mRNA-Mengen, unterschiedliche Effektivitäten der Reversen Transkription sowie eventuelle Polymerase-Inhibitoren (z.B. Glykogen, Hämoglobin) in den Proben ausgeglichen werden. Das Vorhandensein solcher Variationen belegen die stark schwankenden für EF-1 α gemessenen CT-Werte deutlich. Um die Höhe der EF-1 α -Expression in den Geweben in Kopienzahlen ausdrücken zu können, wurde ebenso wie für die mCLCA-Homologen eine Standardkurve mit Kopienzahlen von 10^2 bis 10^9 hergestellt. Diese

Standardkurve wurde in jedem Messdurchgang bestimmt, so dass eventuelle Effektivitätsschwankungen der Messdurchgänge durch die aktuellen Kopienzahldaten der Standardkurven korrigiert wurden. Die CT-Werte der einzelnen Darmproben wurden auch hier in Doppelläufen jeweils als Triplikate gemessen. Die Normalisierung der Kopienzahlwerte für mCLCA1 bis -4 erfolgte für jede Probe durch die Bildung des Quotienten aus den ermittelten absoluten Kopienzahlen für mCLCA1 bis -4 und den absoluten Kopienzahlen des *Housekeeping*-Gens andererseits.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit ein quantitatives, sensitives und hochspezifisches Nachweisverfahren für die mRNA-Expression von mCLCA1 bis -4 in Dünndarmgeweben der Maus etabliert werden konnte.

Die vier hier untersuchten mCLCA-Homologen wurden bereits in vorherigen Studien im Darmepithel nachgewiesen und zwar in den Enterozyten vor allem der Krypten (mCLCA1, mCLCA2; GRUBER et al. 1998b), in den Enterozyten vor allem der Zotten (mCLCA4; ELBLE et al. 2002) oder ausschließlich in den Becherzellen (mCLCA3; LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002).

Die eigenen Expressionsdaten für mCLCA1 und -2 stimmen gut mit bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe erhobenen quantitativen Expressionsstudien dieser beiden mRNA-Spezies überein (LEVERKOEHNE et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass mCLCA1 am niedrigsten von den vier untersuchten Genen im Dünndarm der Maus exprimiert wird und ungefähr in einem Verhältnis zu mCLCA2, mCLCA3 und mCLCA4 bei 1:4:40:100 steht. Weiterhin ist die mCLCA1-Expression im Jejunum der WT-Tiere zumeist höher als im Ileum, während sich dieses Verhältnis bei mCLCA2 umgekehrt darstellt. Diese Verhältnisse im Jejunum und Ileum stimmen mit der Studie von LEVERKOEHNE et al. (2002) überein. Auch hier wurden sehr niedrige Kopienzahlwerte vor allem für mCLCA1 im Darm der Maus detektiert. Beim Vergleich der Genotypen wurden keine signifikanten Unterschiede bei den mRNA-Expressionsdaten festgestellt. Es konnte lediglich eine leicht erhöhte Expressionsrate im Jejunum der CF-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen beobachtet werden, während im Ileum der CF-Tiere eine leicht erniedrigte Expressionsrate vorlag. Da bekannt ist, dass mCLCA1 in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten, Milz und Knochenmark stark exprimiert wird (LEVERKOEHNE et al. 2002), könnten diese Schwankungen mit dem Anteil

der im jeweiligen Darmabschnitt lokalisierten Immunzellen zusammenhängen. Aufgrund von früheren Expressionsanalysen von mCLCA1 (GANDHI et al. 1998; GRUBER et al. 1998b; ROMIO et al. 1999) galt dieser murine CLCA-Vertreter, der ein ähnliches Verteilungsmuster wie der CFTR-Kanal in sekretorischen Epithelien aufweist, als vielversprechender Kandidat für einen potentiellen alternativen Cl⁻-Kanal, wobei davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen teils zelltypspezifischen Studien um Summensignale aus mCLCA1-, mCLCA2- und mCLCA4-mRNA handelte. Das zelluläre Verteilungsmuster im Darm ist für mCLCA1 und mCLCA2 letztendlich nicht bekannt, da bisherige Versuche in unserer Arbeitsgruppe zur Etablierung einer Immunhistochemie im Darm zu negativen Ergebnissen geführt haben (HORSTMEIER 2003) und eine mit *in situ*-Hybridisierung durchgeführte Studie mit einer Sonde durchgeführt wurde, die nicht zwischen mCLCA1, -2 oder -4 unterscheiden konnte (GRUBER et al. 1998b). Diese Kreuzreaktionen konnten damals deshalb nicht berücksichtigt werden, da die übrigen Maus-Homologen zum Zeitpunkt dieser Studie noch nicht entdeckt worden waren. Ob mCLCA1 bei den Sekretionsmechanismen der Enterozyten eine funktionelle Bedeutung hat, kann mit den bisherigen Expressionsdaten weder bewiesen noch widerlegt werden, zumal noch nicht einmal bewiesen ist, dass dieser Homolog in Enterozyten tatsächlich exprimiert wird. Durch die hier ermittelten mRNA-Expressionsdaten ergeben sich keine Hinweise darauf, dass mCLCA1 als hochregulierter, alternativer Cl⁻-Kanal bei den untersuchten CF-Mausmodellen eine Rolle spielen könnte.

Auch mCLCA2 ist ein in einer Vielzahl sekretorischer Epithelien vorkommender Vertreter der mCLCA-Genfamilie und ist im Darm der Maus sowohl in der vorliegenden Arbeit (um fast ein Vierfaches) als auch in vorhergehenden Studien als höher exprimiert beschrieben (LEVERKOEHNE et al. 2002) als sein engster Verwandter, mCLCA1. In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Zunahmen der Expressionsraten im Jejunum der *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse der Stämme BALB/cJ und C57BL/6J gegenüber den WT-Stämmen festgestellt. Diese Beobachtung könnte durchaus mit einer potentiellen Rolle des mCLCA2-Homologen als hochregulierter, alternativer Cl⁻-Kanal im Darmepithel von CF-Mäusen einhergehen. Auch die Lokalisation dieses Vertreters in den Enterozyten der Krypten des Darmes ist sehr gut mit einer sekretorischen Funktion vereinbar (GRUBER et al. 1998b). Dass es nicht auch im Ileum zu einer statistisch signifikanten Hochregulation der mCLCA2-mRNA bei den CF-Mäusen dieser beiden Stämme kommt, könnte eventuell damit erklärt werden, dass die Enterozyten

zahlenmässig in diesem Darmabschnitt stark ab- und die Becherzellen zunehmen, wodurch die mCLCA2-exprimierende Zellfraktion abnimmt. Bei den NMRI- *cfr*^{tm1Cam}-Mäusen, die keine Restexpression von WT-CFTR-Protein aufweisen, würde man in beiden Darmlokalisationen eine deutliche Heraufregulation dieses CLCA-Vertreter erwarten, sollte er als Vermittler einer alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit fungieren, dies ist jedoch nicht beobachtet worden.

Der mCLCA3-Homolog ist aufgrund seines ausschließlichen Vorkommens in den Becherzellgranula des Dick- und Dünndarmes, sowie anderer Organe (LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002) besonders hervorzuheben. Dieser Vertreter der CLCA-Genfamilie scheint vor allem bei der Synthese oder Abgabe von Schleim von Bedeutung zu sein (NAKANISHI et al. 2001; ZHOU et al. 2001; HOSHINO et al. 2002).

In der vorliegenden mRNA-Expressionsanalyse wurde deutlich, dass die mCLCA3-mRNA wesentlich stärker im Intestinaltrakt vertreten war als mCLCA1 und -2. In Übereinstimmung mit den bisherigen Expressionsdaten waren die Kopienzahlen im Ileum höher als im Jejunum, korrelierend mit der zunehmenden Becherzellzahl in den weiter aboral Darmabschnitten.

Bei den Ergebnissen des Genotypvergleichs zeigte sich eine signifikant höhere Expression der mCLCA3-mRNA im Jejunum und Ileum der Mäuse des Stammes BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} und im Jejunum der Mäuse des Stammes NMRI-*cfr*^{tm1Cam} gegenüber den WT-Stämmen. Auch alle übrigen CF-Mausgruppen zeigten in beiden Dünndarmlokalisationen eine deutliche Heraufregulation dieser mRNA-Spezies, die aber nicht statistisch signifikant war. Dies könnte einerseits mit der Vermittlung einer alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit durch das mCLCA3-Protein im Zusammenhang stehen, andererseits aber auch mit einer erhöhten Synthese und Abgabe von Muzinen. Die NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Tiere wiesen in der vorliegenden Arbeit keinen schwerwiegenden Phänotyp auf als die *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere, gemessen an dem Anteil PAS-positiver Zellen. Die mCLCA3-mRNA-Expression war bei den NMRI-*cfr*^{tm1Cam}-Mäusen leicht gegenüber dem WT erhöht, was jedoch nur im Jejunum signifikant war. Ob dieser milde Phänotyp im Zusammenhang mit einer mCLCA3-Protein-vermittelten, alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit steht, ist deswegen nicht auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mCLCA4 als der am stärksten exprimierte der vier untersuchten CLCA-Vertreter im Mäusedarm detektiert. Dies mag damit zusammenhängen, dass er in zwei verschiedenen, häufig vorkommenden Zelltypen, Epithel und Muskulatur, des Darmes

vertreten ist. Bei den CF-Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede der mCLCA4-mRNA-Expression im Vergleich zu den WT-Tieren festgestellt. Für diesen CLCA-Vertreter kann also, ebenso wie bei mCLCA1, nicht aufgrund einer erhöhten mRNA-Expressionsrate bei den CF-Mäusen auf eine pathophysiologische Relevanz beim Ausgleich der fehlenden CFTR-vermittelten Cl⁻-Leitfähigkeit geschlossen werden. Trotzdem wird durch die hohe Expressionsrate verdeutlicht, dass mCLCA4 im Gastrointestinaltrakt eine wichtige funktionelle Bedeutung haben muss.

Beim Vergleich der mCLCA-mRNA-Expression der vier untersuchten Mausstämme sind eine Vielzahl stammestypischer Expressionsunterschiede in der vorliegenden Arbeit detektiert worden. Die einzige Ausnahme bildet die mCLCA1-mRNA-Expression, bei der keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den vier Stämmen zu detektieren waren. Die allgemein niedrige mCLCA1-mRNA-Expressionsrate, die weder stammes- noch genotypspezifischer Regulation unterlag, lässt vermuten, dass das mCLCA1-Protein eine eher untergeordnete funktionelle Bedeutung im Dünndarm der untersuchten Mausstämme übernimmt im Vergleich beispielsweise zu dem hochexprimierten Homologen mCLCA4.

Weiterhin fällt bei der stammestypischen Expression die niedrige mCLCA2-mRNA-Expressionsrate der WT-NMRI-Mäuse auf sowie die hohe mCLCA3-mRNA-Expressionsrate der WT-DBA/2J-Mäuse. Zugleich besaßen die WT-DBA/2J-Mäuse einen sehr hohen Anteil an PAS-positiven Zellen im Stammesvergleich. In einer früheren Studie wurde eine hochregulierte mCLCA3-mRNA-Expression im Lungengewebe von BALB/cJ-*cfr*^{tm1Unc}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J-*cfr*^{tm1Unc}-Mäusen im Zusammenhang mit einer den CF-Phänotyp kompensierenden Funktion bei den BALB/cJ-Mäusen detektiert (CHUNG et al. 2001). Ein ähnliches Verhältnis im Dünndarm konnte in der vorliegenden Arbeit bei diesen beiden Mausstämmen mit der Mutation *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} nicht bestätigt werden. Dagegen fiel hier bei den WT-BALB/cJ-Mäusen im Stammesvergleich die hohe mCLCA4-mRNA-Expressionsrate auf.

Die mCLCA4-mRNA-Expression war bei drei der untersuchten Mausstämme im Jejunum höher als im Ileum (BALB/cJ, C57BL/6J, NMRI), nur bei den DBA2/J-Mäusen war das Verhältnis umgekehrt. Da bekannt ist, dass die Muskularis im Ileum stärker ausgeprägt ist als im Jejunum, hätte man erwarten können, dass die Expressionsrate für mCLCA4 im Ileum höher als im Jejunum ausfällt, was sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen lässt.

Vorstellbar ist aber auch, dass dieser Unterschied durch die größere Zottenlänge im Jejunum und damit größere Epithelfläche ausgeglichen wird, zumal das Villusepithel mehr mCLCA4-mRNA zu synthetisieren scheint als die Muskularis (ELBLE et al. 2002). Die eher niedrige mRNA-Expressionsrate bei den CF-Mäusen des Stammes NMRI gegenüber den übrigen Stämmen spricht eher gegen eine Funktion als alternativer Cl-Kanal bei diesem Stamm, wie bereits erläutert wurde. Insgesamt ist zu vermuten, dass mCLCA4 als hoch exprimiertes Protein im Darm eine wichtige physiologische Funktion übernimmt und eventuell bei den intestinalen Sekretionsmechanismen eine Rolle spielt, nicht aber bei der Zystischen Fibrose als kompensierender Cl-Kanal hochreguliert wird.

Wie diese starken mRNA-Expressionsunterschiede unter den Stämmen anhand der bekannten Expressionsmuster zu erklären sind, bleibt nur zu vermuten. Es ist bekannt, dass Mausstamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Expression von modifizierenden, alternativen Ca^{2+} -aktivierbaren Cl-Leitfähigkeiten existieren, die für den phänotypischen CF-Ausprägungsgrad in Lungen- und Darmgewebe verantwortlich sind (ROZMAHEL et al. 1996; KENT et al. 1997; CHUNG et al. 2001).

Eventuell könnten stammesgenetisch unterschiedlich ausgeprägte Verhältnisse der sonstigen histologischen Zusammensetzung des Darmes für derartige Unterschiede verantwortlich sein. So können sich beispielsweise die Anteile von Muskularis, Bindegewebe der Submukosa und Lymphfollikel im Verhältnis zum Epithel stammestypisch unterscheiden, was sich auch auf die mCLCA-mRNA-Verhältnisse auswirken würde, indem jede Zelle EF-1 α , aber nur die Epithelzellen mCLCA2 exprimieren würden. Vielleicht unterscheiden sich die Stämme aber auch einfach in der genetischen Regulation der mCLCA-Expression. So ist bisher zum Beispiel nicht untersucht, ob stammesspezifische Unterschiede in regulatorischen Abschnitten der CLCA-Gene existieren (z.B. Promoter, Palindrome, repetitive Sequenzen). Dies ist beim *cftr*-Gen der Maus bekannt: In der Promoterregion existieren Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen, die sich auf die Regulation der Genexpression auswirken (ULATOWSKI et al. 2004). Dass die mRNA-Expression sogar hochvariabel auch innerhalb eines Mausstammes sein kann, zeigt das Beispiel der Restexpression von WT-CFTR-mRNA bei den *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen (LARBIG et al. 2002), die im Vergleich zu den WT-Tieren von 2-74% im Darm der CF-Mäuse schwankt. Geschlechts- oder altersassoziierte mRNA-

Expressionsschwankungen können in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da die Tiere alle weiblich waren und in der 9.-11. Lebenswoche untersucht wurden.

Lediglich die NMRI-Tiere erhielten im Unterschied zu den übrigen Mäusen ein orales Laxativum ab der dritten Lebenswoche. Ein eventueller Einfluss dieser Arzneimittelapplikation auf die intestinale mRNA-Expressionsrate wurde jedoch bisher noch nicht beschrieben und ist nicht auszuschließen.

Die hier untersuchten Mausmodelle *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} und *cftr*^{tm1Cam} zeichnen sich durch charakteristische, für Zystische Fibrose-Mausmodelle typische, pathophysiologische Veränderungen des Gastrointestinaltraktes aus, die durch Ansammlung eines zähen Schleimes im Darmlumen, Kryptdilatation, Becherzellhypertrophie- und -plasie sowie Mukus-Ileus gekennzeichnet sind (DORIN et al. 1992; RATCLIFF et al. 1993; KENT et al. 1996). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden bei allen vier untersuchten Mausstämmen, unabhängig vom CF-Mausmodell, diese Charakteristika angetroffen. Mit Hilfe der immunhistochemischen Detektion von mCLCA3 sollte zusätzlich zur quantitativen mRNA-Expressionsanalyse eine semi-quantitative Erfassung der mCLCA3-Proteinexpression, ausgedrückt durch die prozentualen Anteile mCLCA3-positiver Zellen im Zotten- und Kryptepithel, durchgeführt werden. Ziel war es, festzustellen, ob Zunahmen der beschriebenen mCLCA3-mRNA-Expression, wie sie mit weitgehender Konstanz bei allen vier untersuchten Mausstämmen in beiden Dünndarmlokalisationen aufgetreten ist, lediglich durch Zunahmen der mCLCA3-positiven Becherzellen verursacht wurden, oder ob die mRNA-Synthese der Einzelzelle gezielt durch die CF-Mutation hochreguliert wird. Zusätzlich wurde eine in der Diagnostik routinemäßig angewandte Färbung zur Darstellung von Muzinen eingesetzt und der Anteil der PAS-positiven Becherzellen, der für die Gesamtheit der Becherzellen im Darm steht, ebenfalls im Zotten- und Kryptepithel erfasst. Durch den Vergleich der Anteile an mCLCA3-Protein-positiven Zellen mit denen an PAS-positiven Zellen sollte festgestellt werden, ob Verschiebungen dieser Anteile parallel im Rahmen von Genotyp- und Stammeseinflüssen erfolgen.

Zunächst einmal fiel auf, dass der Anteil PAS-positiver Zellen in den meisten Fällen höher war als der der mCLCA3-positiven Zellen, was auf eine höhere Sensitivität der PAS-Reaktion in Bezug auf die Detektion von Muzinen bzw. mCLCA3-Protein in Becherzellen gegenüber

der mCLCA3-Immunhistochemie schliessen lässt. Dies könnte auch eine Folge davon sein, dass Becherzellen erst nach einer gewissen Migrations- und damit Reifungsphase entlang der Krypt-Villus-Achse mCLCA3-Protein enthalten, während mit der PAS-Reaktion detektierbare Muzine schon früh in der Becherzellendifferenzierung von der Zelle synthetisiert werden. Dafür spricht auch, dass in dieser sowie in vorangehenden Arbeiten die mCLCA3-positiven Zellen erst vermehrt ab dem oberen Kryptdrittel auftraten (LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002). Im Zottenepithel waren anteilig weniger PAS- und mCLCA3-positive Zellen als im Kryptepithel vorhanden. Auch waren mehr Zellen im Ileum PAS- und mCLCA3-positiv als im Jejunum, korrelierend mit der zunehmenden Anzahl an Becherzellen in den distalen Darmabschnitten.

Die CF-Tiere besaßen insgesamt alle bis auf wenige Ausnahmen eine höhere Anzahl PAS-positiver und mCLCA3-positiver Zellen. Bei der mCLCA3-Immunhistochemie zeigten sich signifikant höhere Anteile positiver Zellen ausschließlich im Jejunum- und Ileumkryptepithel aller drei Mausstämme, die die *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mutation trugen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Tieren. Im Zottenepithel waren diese Zunahmen im Ileum bei allen Mausstämmen ebenfalls deutlich ausgeprägt, ohne statistische Signifikanz zu erreichen, während im Jejunumzottenepithel nur beim Stamm DBA/2J ein ähnlicher Trend vorlag, der bei den übrigen drei Stämmen nicht nachzuvollziehen war. Bei der PAS-Reaktion waren dagegen eher signifikante Zunahmen PAS-positiver Zellen im Zottenepithel (BALB/cJ-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}, NMRI-*cftr*^{tm1Cam}) zu beobachten, nur im Ileumkryptepithel der CF-C57BL/6J-Mäuse zeigten sich signifikante Zunahmen der PAS-positiven Zellen. In nahezu allen übrigen Fällen, unabhängig von Mausstamm und Lokalisation, waren Zunahmen der PAS-positiven Zellen bei den CF-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren zu bemerken, die meistens, evtl. aufgrund zu kleiner Mausgruppen und zu hoher Standardabweichungen, nicht statistisch signifikant wurden. Dass die Zunahmen an PAS- und mCLCA3-positiven Zellen bei den CF-Mausgruppen nicht identisch sind, kann, wie bereits erwähnt, mit der unterschiedlichen Sensitivität dieser beiden Methoden erklärt werden. Damit ist anzunehmen, dass die erhöhte mCLCA3-mRNA-Expression, die bei allen CF-Mausmodellen beobachtet wurde (wie auch die Zunahmen an mCLCA3-positiven Zellen bei allen CF-Mausmodellen beobachtet wurde), als Folge einer Vermehrung (Hyperplasie) an mCLCA3-positiven Becherzellen zu interpretieren ist und nicht tatsächlich auf einer hochregulierten mRNA-Synthese beruht. Trotzdem kann ein

erhöhter Anteil mCLCA3-positiver Zellen für die Vermittlung einer alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit verantwortlich sein, allein aufgrund einer Oberflächenvergrößerung, auf der dieses Protein bei CF-Mäusen auftritt.

Beim Vergleich der Ergebnisse der semi-quantitativen mCLCA3-Immunhistochemie und der quantitativen mCLCA3-mRNA-Expression sind sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede zu bemerken: Wie bei der mCLCA3-Immunhistochemie war die mCLCA3-mRNA-Expressionsrate im Jejunum und Ileum der BALB/cJ-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu den WT-Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigten die NMRI- *cftr*^{tm1Cam}-Mäuse eine signifikant erhöhte mCLCA3-mRNA-Expressionsrate im Jejunum, jedoch keine signifikanten Zunahmen an mCLCA3-positiven Zellen gegenüber dem Wildtyp. Keine erhöhte mCLCA3-mRNA-Expression war dagegen bei den Stämmen C57BL/6J-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} und DBA/2J- *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} im Jejunum oder Ileum zu detektieren im Vergleich zu den WT-Stämmen, dafür aber eine signifikante Zunahme an mCLCA3-positiven Zellen im Kryptepithel beider Lokalisationen. Dass eine erhöhte mRNA-Kopienzahl nicht unbedingt mit einer erhöhten Anzahl an positiven Zellen, die das Protein exprimieren, einhergehen muss, ist leicht vorstellbar, wenn die Transkriptionsleistung der Einzelzelle gesteigert wird. Umgekehrt sind die mCLCA3-mRNA-Expressionsdaten bei den C57BL/6J- *cftr*^{TgH(neoim)1Hgu} und DBA/2J-*cftr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen im Vergleich zur mCLCA3-Proteinexpression geringer ausgefallen als erwartet. Diese Verhältnismäßigkeiten zeigen, dass die Erfassung der mCLCA3-positiven Zellen lediglich eine semi-quantitative Aussage erlaubten und keine Aussage über die Kopienzahlen des Proteins. Derartige Differenzen können eventuell auch mit einer Art negativen Rückkoppelungseffekt auf die mRNA-Expression erklärt werden. Dieser Mechanismus ist für die mRNA- und Proteinexpression von bestimmten Defensinen, die in Panethzellgranula vorkommen, im Darm von CF-C57BL/6J-Mäusen beschrieben worden, die die Mutation *cftr*^{tm1Unc} besaßen. Aufgrund der Ansammlungen an zähem Schleim in den Kryptlumina kam es zu einer Akkumulation der Panethzellgranula in den Krypten. Dort bewirkten die in den Panethzellgranula gespeicherten Proteine eine Herunterregulation ihrer jeweiligen mRNA (CLARKE et al. 2004) im Vergleich zum WT. Eine ebensolche Interaktion zwischen postsekretorischer Akkumulation eines in zytosolischen Granula gespeicherten Proteins und mRNA-Herunterregulation im gastrointestinalen Epithel ist für Pepsinogen im Magen von Proton/Kalium-ATPase-Knockout-Mäusen beschrieben worden (SPICER et al. 2000). Auch

das mCLCA3-Protein kommt in sekretorischen Muzingranula von Becherzellen im Darm vor (LEVERKOEHNE u. GRUBER 2002), so dass dieser negative Rückkoppelungsmechanismus als Folge eines Zellstaus durchaus vorstellbar erscheint.

Gute Übereinstimmung der signifikanten Unterschiede zwischen WT- und CF-Mäusen bei den Ergebnissen der mCLCA3-Immunhistochemie und der mCLCA3-mRNA-Expression sind also nur beim Stamm BALB/cJ zu beobachten. Kürzlich wurde bei dem Stamm BALB/cJ mit derselben Mutation, *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}, eine signifikant erhöhte DIDS-sensitive, Ca²⁺-aktivierbare Chloridleitfähigkeit bei den CF-Tieren festgestellt, die bei CF-Mäusen der Stämme DBA/2J und C57BL/6J nicht zu beobachten war (Bleich 2004). Eine erhöhte mCLCA3-mRNA-Expression in der Lunge von BALB/CJ/c-CF-Mäusen, die mit einem milden Phänotyp einhergeht, wurde ebenfalls beschrieben (CHUNG et al. 2001). Eine Rolle für *mclca3* als sogenanntes modifizierendes Gen im Sinne der Vermittlung einer alternativen Chloridleitfähigkeit bei der Zystischen Fibrose könnte beim Stamm BALB/cJ durch die hier ermittelten Daten für die mRNA- und Proteinexpression, die eine deutliche Heraufregulation bei den CF-Mäusen erfährt, ebenfalls vermutet werden. Die Zunahme der mCLCA3-positiven Zellen war vor allem im Krypt- und nicht im Zottenepithel ausgeprägt, was mit einer sekretorischen Funktion gut vereinbar erscheint. Es ist bekannt, dass auch der CFTR-Kanal vor allem in Becherzellen des Mäusedarmes (HAYDEN u. CAREY 1996) und stärker in den Krypten als im Villusepithel exprimiert wird (TREZISE u. BUCHWALD 1991). Die Kollokalisation des mCLCA3-Chloridkanals mit dem CFTR-Kanal in einem Zelltyp des Darmepithels lässt diesen CLCA-Vertreter als sehr vielversprechenden Kandidaten für die Vermittlung der erhaltenen Ca²⁺-aktivierbaren, nicht-CFTR-vermittelten Cl⁻-Leitfähigkeit bei der Zystischen Fibrose erscheinen, zumal bekannt ist, dass der intakte CFTR-Kanal eine inhibierende Wirkung auf die Ca²⁺-aktivierbare Cl⁻-Leitfähigkeit besitzt (WEI et al. 2001).

Beim Vergleich der Stämme fiel auf, dass die mCLCA3-mRNA-Expression bei den WT- und DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen in beiden Darmlokalisationen am höchsten und im Ileum der DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tiere signifikant höher als bei allen anderen Stämmen ausgeprägt war. Ansonsten war die mCLCA3-mRNA-Expression unter den Stämmen der unterschiedlichen Genotypen und Darmlokalisationen ähnlich hoch. Bei der mCLCA3-Immunhistochemie fielen sowohl die DBA/2J-als auch die NMRI-Mäuse durch ihre hohe

Anzahl mCLCA3-positiver Zellen auf, wobei letztere im WT-Ileumzotten- und -kryptepithel und im CF-Jejunumzotten- und -kryptepithel den DBA/2J-Stamm sogar übertrafen, mit signifikanten Unterschieden zu den C57BL/6J- und BALB/cJ-Mäusen. Bei den NMRI-Mäusen wird hier also eine große Diskrepanz zwischen hoher mCLCA3-Proteinexpression und zugleich niedriger mCLCA3-mRNA-Expression deutlich. Auch die signifikant erhöhte Anzahl an mCLCA3-positiven Zellen im Jejunumzottenepithel der WT- und BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse gegenüber den C57BL/6J-Tieren wird nicht durch die mCLCA3-mRNA-Expression wiedergespiegelt. Wie bereits erwähnt, muß dabei wieder berücksichtigt werden, dass keine normalisierten mCLCA3-Proteinkopienzahlen erfasst wurden, sondern lediglich die Anzahl positiver Zellen. Eventuell können derartige Phänomene auch durch negative Rückkoppelungsmechanismen auf die mRNA-Synthese erklärt werden, wie bereits erläutert wurde.

Bei der PAS-Reaktion wiesen die Stämme WT-NMRI (gegenüber WT-C57BL/6J) und NMRI-*cfr*^{tm1Cam} (gegenüber BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}) sowie DBA/2J-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} (gegenüber BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu} und C57BL/6J *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}) im Ileumkryptepithel einen signifikant erhöhten Anteil an PAS-positiven-Zellen auf. Im Ileumzottenepithel war der Anteil PAS-positiver Zellen nur bei den DBA/2J-Mäusen signifikant höher gegenüber den WT-BALB/cJ- und WT-C57BL/6J- sowie den BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Tieren. Die Ergebnisse der PAS-Reaktion waren also im Ileumkryptepithel der CF- und WT-Mäuse mit den Ergebnissen der mCLCA3-Immunhistochemie vergleichbar. Im Ileumzottenepithel zeigten nur die DBA/2J-Mäuse, nicht der Stamm NMRI, einen signifikant erhöhten Anteil PAS-positiver Zellen, was sich gegensätzlich zur Immunhistochemie verhielt, bei der sogar im Ileumzottenepithel der WT-NMRI-Mäuse der Anteil mCLCA3-positiver Zellen höher war als bei dem Stamm DBA/2J. Auch zeigten die Ergebnisse der PAS-Reaktion im Jejunum keine parallelen Verhältnismäßigkeiten bei den Mausstämmen im Vergleich zu den Ergebnissen der mCLCA3-Immunhistochemie. Die Anteile an PAS-positiven Zellen waren bei allen Stämmen sehr ähnlich ausgeprägt, nur im Jejunumzottenepithel der WT-Tiere waren signifikante Unterschiede aller drei übrigen Stämme gegenüber dem Stamm NMRI festzustellen, der hier den niedrigsten Anteil an PAS-positiven Zellen zeigte. Letzteres stand sogar im direkten Gegensatz zu den Beobachtungen bei der mCLCA3-Immunhistochemie, wo dieser Stamm in dieser Lokalisation den höchsten Anteil an mCLCA3-positiven Zellen besaß.

Der signifikant erhöhte Anteil an mCLCA3-positiven Zellen im Jejunumzottenepithel der WT- und BALB/CJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäuse gegenüber dem Stamm C57BL/6J wurde durch die Ergebnisse der PAS-Reaktion nicht wiedergespiegelt. Beim Vergleich der beiden histologischen Auswertungen fiel also auf, dass zwar Überlappungen bei den genotyp- und stammesspezifischen Anteilen der PAS- und mCLCA3-positiven Zellen existieren, dass aber auch unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Verteilungsmuster der PAS- und mCLCA3-positiven Becherzellen bei demselben Genotyp oder Stamm beobachtet werden. Diese Unterschiede können zum großen Teil mit der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Methoden der Becherzelldetektion erklärt werden, zumal die Differenzen prozentual gesehen sehr gering sind und eventuell auch zum Teil als Artefakte, bedingt durch eine geringe Gruppengröße, zu interpretieren sind. Es deutet eventuell aber auch darauf hin, dass es sich um zwei relativ eigenständige Zellpopulationen mit spezifischen biologischen Aufgaben und Verteilungsmustern handelt, die unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen sind. Weiterhin fiel auf, dass insgesamt bei der mCLCA3-Immunhistochemie wesentlich mehr signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen auftraten als bei der PAS-Reaktion. Die Regulation des Anteils an mCLCA3-positiven Zellen im Darmepithel könnte eventuell also stärker von stammesgenetischen Einflüssen abhängig sein als der Anteil aller Becherzellen an sich.

Bei den CF-Mäusen war im Mittel aller Stämme in beiden untersuchten Darmlokalisationen eine relative Zunahme sowohl an PAS- als auch an mCLCA3-positiven Zellen zu beobachten, die bei den Stämmen BALB/cJ (mCLCA3-IHC: Jejunum und Ileum, PAS: Jejunum), C57BL/6J (mCLCA3-IHC: Jejunum und Ileum, PAS: Ileum), DBA/2J (mCLCA3-IHC: Jejunum und Ileum) und NMRI (PAS:Jejunum) signifikant gegenüber dem WT ausgeprägt war. Auch bei den stammesspezifischen Auswertungen wurden signifikante Unterschiede bei den Anteilen an PAS- und mCLCA3-positiven Zellpopulationen herausgestellt, wobei der Stamm DBA/2J bei der PAS-Reaktion und der Stamm NMRI bei der mCLCA3-Immunhistochemie jeweils die höchsten Anteile positiver Zellen aufwiesen. Auch in einer früheren Studie wurde ein stärker ausgeprägter Phänotyp beim Stamm DBA gegenüber den Mausstämmen BALB/cJ und C57BL/6J festgestellt (ROZMAHEL et al. 1996). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese Zu- oder Abnahmen der hier untersuchten Zellpopula-

tionen auf einem unspezifischen Effekt eines allgemein erhöhten oder erniedrigten Zellturnovers beruhen oder ob es sich um spezifische Einflüsse des Genotyps oder Stammes auf das Zelldifferenzierungsmuster im Darmepithel handelt, wurden die Apoptose- und Mitoseraten sowie die durchschnittliche Zahl der epithelbildenden Zellen der Krypt-Villus-Achse erfasst. Durch den Vergleich der durchschnittlichen Zahl epithelbildender Zellen im Jejunum und Ileum von CF- und WT-Tieren konnten die mRNA-Expressionsdaten von mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4 außerdem in Relation zu eventuellen Veränderungen in der Anzahl an Darmepithelzellen gesetzt werden. Die Detektion von phosphoryliertem Histon3 zur Identifizierung proliferierender Zellen ist anderen Systemen wie dem injizierbaren S-Phase-Marker Bromodesoxyuridin (BrdU) oder dem immunhistochemischen Nachweis von *Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)* in seiner Spezifität weit überlegen (MANDYAM et al. 2004). Es werden hochselektiv nur Zellen markiert, die sich in der späten G2- bis zum Ende der M-Phase befinden, während mit den beiden bekannten anderen Techniken praktisch jede Zelle, die sich nicht in der G0-Phase befindet, markiert wird. Die selektive Phosphorylierung des nukleären Proteins Histon3 am Serin10 ist offensichtlich mit der Kondensation und Relaxation des Chromatins assoziiert (PRIGNET u. DIMITROV 2003).

Die immunhistochemische Detektion von aktivierter Caspase3 stellt eine hochspezifisches Detektionsverfahren für Zellen dar, die irreversibel in die Enzymkaskade des programmierten Zelluntergangs eingetreten sind. Caspasen liegen im Zytoplasma als inaktive Proenzyme vor, die ihr Substrat hinter Aspartatresten spalten und sich so gegenseitig in einer bestimmten Reihenfolge, beginnend mit Caspase9 aktivieren, sobald die Zelle ein apoptotisches Signal vom Extrazellulärraum erhalten hat. Ist Caspase3 einmal aktiviert, findet ein positives Rückkoppelungs-Signal an Caspase 9 statt, so dass die Kaskade verstärkt wird und nicht mehr aufzuhalten ist (SLEE et al. 1999).

Mit Ausnahme des Mausstammes WT-DBA/2J, bei dem im Jejunum eine signifikant erhöhte Darmepithelzellzahl im Vergleich zum Stamm WT-NMRI gezeigt werden konnte, wurden keine Unterschiede bei den durchschnittlichen Zellzahlen zwischen Genotypen oder Stämmen beobachtet. Dies ist ein Hinweis, dass die Hochregulation der mCLCA2-mRNA im Jejunum der CF-BALB/cJ- und CF-C57BL/6J-Mäuse vermutlich auf eine tatsächlich signifikant gesteigerte mRNA-Synthese der Einzelzellen zurückzuführen ist, da der Anteil der exprimierenden Zellen bei WT- und CF-Tieren gleich blieb. Sie beruhte also nicht wie bei der

mCLCA3-mRNA-Expression auf einer offensichtlichen Zellhyperplasie. Im Stammesvergleich zeigen die WT-DBA/2J-Mäuse nur eine signifikant gesteigerte mCLCA2-mRNA-Expression gegenüber den WT-NMRI-Mäusen, während mCLCA1- und mCLCA4-mRNA eine ähnliche Expressionshöhe bei diesem Vergleich zeigen. Ersteres kann also auch ein Effekt einer signifikant höheren Darmepithelzellzahl sein gegenüber dem Stamm WT-NMRI. Es wurden insgesamt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellteilungshäufigkeit zwischen den Genotypen beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen, bei denen eine erhöhte Zellteilungsrate im Darmepithel von CF-Mäusen festgestellt wurde im Vergleich zu WT-Tieren (GALLAGHER u. GOTTLIEB 2001). Auch im Bronchialepithel von CF-Patienten wurde eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate ermittelt (LEIGH et al. 1995). Jedoch wurden beide Untersuchungen mit dem weniger spezifischen BrdU- und PCNA-Labeling durchgeführt. Eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate wurde im Ileum der WT- und BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen gegenüber den übrigen Stämmen festgestellt, ohne dass sich dadurch die Darmepithelzellzahl signifikant verändert hätte. Auch eine signifikant erhöhte Apoptoserate wurde im Ileum der CF- und WT-Tiere dieses Mausstammes festgestellt. Die BALB/cJ-Mäuse scheinen also im Vergleich zu den übrigen Stämmen einen schnelleren Zellturnover des Darmepithels aufzuweisen. Eine signifikant erhöhte Apoptoserate wurde außerdem bei den BALB/cJ-*cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mäusen im Ileum gegenüber dem WT dieses Stammes in dieser Lokalisation festgestellt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde von anderen Autoren eine gewisse Apoptoseresistenz in CF-Epithelien des Menschen beschrieben (GOTTLIEB u. DOSANJH 1996). Dieses Phänomen soll im Zusammenhang mit einem relativ hohen intrazellulären pH stehen, der aufgrund der reduzierten Bikarbonat-Sekretion durch mangelndes CFTR-Kanalprotein auftreten soll. Dadurch wird die durch sauren pH aktivierte DNase weniger effektiv aktiviert und die Apoptoseresistenz ausgelöst. Die bei den BALB/cJ-Mäusen beobachteten Apoptosen zeigten sich vor allem an den äußersten Villusspitzen. Es ist bekannt, dass neben der bloßen Zellabschilferung auch insbesondere an den Zottenspitzen der programmierte Zelltod zu beobachten ist (HALL et al. 1994). Mittels *in situ end labelling* (ISEL), einer Technik, bei der die freien Enden fragmentierter DNA untergehender Zellen markiert werden, wurde außerdem gezeigt, dass verzögerte Fixierung von Darmgewebe zu einer starken Zunahme an markierten Zellen im Villusbereich führten (HALL et al. 1994). Enterozyten sind aufgrund ihrer hohen

Stoffwechselaktivität extrem vulnerabel, so dass trotz Gewährleistung einer raschen Asservierung ein derartiger Artefakt nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der CF-Genotyp nicht grundsätzlich mit Veränderungen der Darmepithelzellzahl, Mitose- und Apoptosehäufigkeit gekoppelt ist und dass damit die signifikanten anteilmäßigen Unterschiede der mCLCA3- und PAS-positiven Zellen, die zwischen WT- und CF-Tieren deutlich geworden sind, nicht aufgrund von erhöhten Zellteilungsraten ergeben haben, sondern dass es bei konstanter Zellzahl und -teilungsrate offensichtlich zu einer spezifisch häufigeren Differenzierung der Stammzellen zu Becherzellen kommt.

Beim Menschen wurde kürzlich beschrieben, dass die Häufigkeit bestimmter Allelvarianten der Mikrosatellitensequenzen des *hclca1*-Locus signifikant mit einer erhöhten Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Leitfähigkeit im Rektumepithel von CF-Patienten korreliert sind (RITZKA et al. 2004). In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeichnete sich ab, dass der entsprechende murine orthologe Vertreter des humanen CLCA1, mCLCA3, bei dem Mausstamm BALB/cJ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Darm von CF-Mäusen hochreguliert ist. Elektrophysiologische Studien einer anderen Arbeitsgruppe haben zusätzlich kürzlich gezeigt, dass bei CF-Mäusen dieses Stammes eine erhöhte DIDS-sensitive Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Leitfähigkeit im Vergleich zu anderen Mausstämmen vorliegt (BLEICH 2004). Aufgrund dieser Daten stellt sich die Frage, ob in Analogie zu den Verhältnissen beim Menschen bestimmte genetische Hintergründe bei Mäusen mit bestimmten Allelvarianten im *mclca3*-Gen assoziiert sind. Daraus ließe sich die Hypothese ableiten, dass diese Allelvarianten eine kompensierende alternative Cl^- -Leitfähigkeit hervorrufen könnten und deswegen mCLCA3 bei den CF-Tieren des Trägerstammes dieses Allels hochreguliert werden müsste. Zu diesem Zweck wurde der gesamte offene Leserahmen der mCLCA3-PCR-Produkte von WT-Tieren aller vier genetischen Hintergründe an eine kommerzielle Firma zur Sequenzierung gegeben. Es wurde festgestellt, dass alle vier Sequenzen vollkommen identisch waren. Ungeklärt bleibt, ob Allelvarianten in den nichtkodierenden Abschnitten des *mclca3*-Gens existieren, also z. B. in den Sequenzen des Promoters, der Mikrosatelliten oder anderer repetitiver Sequenzen, die ja eine hohe Mutagenität aufweisen, also mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen verschiedenen inge-

züchteten Mausstämmen differieren. Allelvariationen in diesen Abschnitten können Auswirkungen auf die Bindung genregulatorischer Proteine haben und auf diese Weise zu unterschiedlicher mRNA- und Proteinexpression führen. Auch die Untersuchungen von RITZKA et al. (2004) wurden mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Für das *cfr*-Gen der Maus konnten ebenfalls stammesspezifische Variationen in der Promoterregion detektiert werden, die die Transkription beeinflussen (ULATOWSKI et al. 2004).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass im Dünndarm der untersuchten CF-Mausmodelle eine Zunahme an PAS- und mCLCA3-positiven Zellen zu beobachten war. Die Zunahmen an mCLCA3-positiven Zellen waren bei allen *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mausmodellen im Kryptepithel signifikant. Auch die mCLCA3-mRNA-Expressionsrate war bei allen CF-Mausmodellen leicht erhöht im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren, was in drei Fällen statistische Signifikanz erreichte. Bei allen bisher charakterisierten CF-Mausmodellen ist eine Becherzellhypertrophie und -plasie im Darm als zentrales Kennzeichen des Phänotyps beschrieben worden (GRUBB u. BOUCHER 1999), was in der vorliegenden Arbeit zu einer Zunahme an mCLCA3-mRNA und -Protein geführt hat. Es konnte hier also nicht gezeigt werden, dass die beobachteten Zunahmen an mCLCA3-mRNA die Folge einer gesteigerten Transkription ist. Dagegen beruhte die bei allen CF-Mausmodellen beobachtete, leicht erhöhte mCLCA2-mRNA-Expression vermutlich auf einer Regulation auf Transkriptionsebene. Die Enterozytenzahl der Krypt-Villus-Achse zeigte nämlich keine Zunahmen bei den CF-Mausmodellen und ist als der mCLCA2-exprimierende Zelltyp anzusehen. Damit kommen mCLCA2 und mCLCA3 als potentielle Kandidaten für die Vermittlung einer alternativen Cl⁻-Leitfähigkeit bei den untersuchten CF-Mausmodellen in Betracht. Weiterhin war festzustellen, dass die CLCA-Homologen eine starke stammestypisch beeinflusste Expression aufwiesen, die bereits in den WT-Stämmen ausgeprägt war. Hierbei wies der Mausstamm DBA/2J unabhängig von Lokalisation und Genotyp eine ausgeprägte Expression der Homologen mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA3 auf, während der Stamm BALB/cJ am stärksten mCLCA4 exprimierte.

Der Phänotyp der *cfr*^{tm1Cam}-Mäuse im genetischen Hintergrund NMRI erscheint in der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit dem Phänotyp der *cfr*^{TgH(neoim)1Hgu}-Mausmodelle, betrachtet man die anteiligen Zunahmen an PAS-positiven Zellen bei den CF-Tieren, und war

wesentlich milder als im Ursprungsstamm beschrieben wurde (RATCLIFF et al. 1993). Dies bestätigt die Theorie, dass Gene außerhalb des *cftr*-Locus einen starken modifizierenden Einfluss auf den Phänotyp der Erkrankung ausüben müssen. Ob dies eventuell durch eine CLCA-vermittelte alternative Cl⁻-Leitfähigkeit verursacht werden könnte, müsste durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Die mCLCA3-mRNA-Expression war im Jejunum und Ileum der NMRI-*cftr*^{tm1Cam}-Mäuse leicht erhöht im Vergleich zu den WT-Mäusen, erreichte jedoch nur im Jejunum statistische Signifikanz. Auch die mCLCA2-mRNA Expression war im Jejunum der NMRI-*cftr*^{tm1Cam}-Mäuse deutlich erhöht, war jedoch nicht statistisch signifikant.

Ziel zukünftiger Untersuchungen wäre, eine Quantifizierung auf mRNA- und Proteinebene aller mCLCA-Vertreter im CF-Mausmodell durchzuführen, auch der mCLCA-Vertreter mCLCA5 und mCLCA6. Aufgrund der engen Sequenzhomologie innerhalb dieser Genfamilie und der oftmals geringen Redundanz stellt dies eine hohe Herausforderung an die Etablierung sicher diskriminierender Essays auf mRNA- und Proteinebene dar. Da zur Zeit nur ein spezifischer Antikörper gegen das mCLCA3-Protein existiert, wären zukünftige Untersuchungen mit weiteren homologspezifischen Antikörpern, auch zur zelltypspezifischen Lokalisation von mCLCA1, -2 und -4 von besonderem Interesse. Jedoch nicht nur die Quantifizierung sondern nur die begleitende funktionelle Studie der CLCA-Proteine in CF-Mausmodellen im Vergleich zum Wildtyp mittels elektrophysiologischer Methoden könnten möglicherweise Erkenntnisse darüber erbringen, ob CLCA-Proteine bei der Generierung alternativer Cl⁻-Leitfähigkeiten bei der Zystischen Fibrose eine Rolle spielen. Die Generierung von CLCA-Knockout-Mausmodellen und deren Kreuzung mit CF-Mausmodellen stellt ebenso einen vielversprechenden Versuchsansatz für die Zukunft dar.