

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

Moduliert mCLCA3 den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?

**Pathomorphologische, -morphometrische und molekularbiologische
Phänotypisierung eines neuen doppelt transgenen Lungen-Mausmodells
für Mukoviszidose**

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

vorgelegt von
Kathleen Lange
Tierärztin aus Neuruppin

Berlin 2012
Journal-Nr.: 3613

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cystic fibrosis, respiratory diseases, animal models, mice, ion transport, gene expression, polymerase chain reaction, phenotypes

Tag der Promotion: 17.09.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-378-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für

Fenno und Fabian

Diese Promotionsarbeit wurde gefördert durch ein
Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Mukoviszidose	2
2.1.1 Vorkommen und Bedeutung beim Menschen.....	2
2.1.2 Symptome und klinischer Verlauf	3
2.1.3 Pathophysiologie.....	4
2.1.3.1 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei Mukoviszidose.....	4
2.1.3.2 Die Rolle des epithelialen Natriumkanals „ENaC“ bei der Mukoviszidose....	5
2.1.3.3 Die mukoziliäre Clearance in der gesunden Lunge	6
2.1.3.4 Hypothesen über den Zusammenhang der Mutationen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator und dem Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp	7
2.1.3.4.1 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei der Entstehung eines epithelialen Entzündungssyndroms.....	7
2.1.3.4.2 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator als Vermittler der Förderung der epithelialen Clearance und bei der Abtötung von Bakterien.....	8
2.1.3.4.3 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei der Kontrolle der Salzkonzentration der Atemwegsflächen- feuchtigkeit.....	8
2.1.3.4.4 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei einer gestörten Funktion submuköser Drüsen	9
2.1.3.4.5 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei einer gestörten mechanischen Selbstreinigung	9
2.1.3.5 Die mukoziliäre Clearance in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten	10
2.1.3.6 Weitere Folgen der Reduktion der Atemwegsflächenfeuchtigkeit bei Mukoviszidose-Patienten.....	10

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.3.7	Beweise für die Reduktion der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit bei Mukoviszidose-Patienten.....	11
2.1.3.8	Weitere Faktoren bei der Entstehung der Reduktion der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit	12
2.1.3.9	Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie der Mukoviszidose in der Lunge.....	15
2.1.4	Diagnose.....	15
2.1.5	Therapie und Prognose.....	16
2.1.5.1	Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten	17
2.2	Murine Mukoviszidose-Modelle	18
2.2.1	CFTR-Modelle.....	18
2.2.1.1	CFTR-Knock-out-Modelle.....	18
2.2.1.2	CFTR-Modelle mit spezifischen Mutationen	19
2.2.1.3	Phänotypen der CFTR-Modelle.....	20
2.2.1.3.1	Intestinaler Phänotyp	20
2.2.1.3.2	Pankreatischer Phänotyp	20
2.2.1.3.3	Hepatischer Phänotyp.....	20
2.2.1.3.4	Vas deferens-Dysfunktion	21
2.2.1.3.5	Pulmonaler Phänotyp.....	21
2.2.1.4	Beurteilung der CFTR-Modelle bei dem Lungenphänotyp der Mukoviszidose	22
2.2.2	ENaC-transgene Mäuse.....	22
2.2.2.1	Mukusobstruktion	23
2.2.2.2	Epithelzellschwellung und -nekrose	23
2.2.2.3	Allergische Entzündungsreaktion	23
2.2.2.4	Emphyseme	24
2.2.2.5	Erhöhte Sterblichkeitsrate	24
2.2.2.6	Muzingenexpression	24
2.2.2.7	Zeitlicher Verlauf der Ausprägung Mukoviszidose-typischer Symptome....	25

INHALTSVERZEICHNIS

2.3 Die Rolle von Modulatorgenen bei der Mukoviszidose	26
2.3.1 Die Mitglieder der CLCA-Genfamilie und ihre Rolle als Modulatoren der Mukoviszidose	27
2.3.1.1 mCLCA3-knock-out-Modelle	29
2.3.1.1.1 mCLCA3-knock-out-Modell nach Long.....	29
2.3.1.1.2 mCLCA3-knock-out-Modell nach Robichaud.....	30
2.3.1.1.3 mCLCA3-ko-Modell nach Patel	30
2.3.2 Weitere mögliche Modulatoren der Mukoviszidose.....	31
2.3.3 Probleme und Aussichten bei der Identifikation von Modulatorgenen.....	31
3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung	33
4 Material und Methoden.....	34
4.1 Mäuse	34
4.1.1 Genetischer Hintergrund und Zuchtstrategie	34
4.1.2 Tötung, Bestimmung des Gewichtes, Organentnahme und -konservierung	35
4.2 Genotypisierung der Mäuse	37
4.2.1 Isolierung der genomischen DNA.....	37
4.2.2 Reinheitskontrolle und Konzentrationsmessung der genomischen DNA ...	37
4.2.2.1 Funktionsprinzip der photometrischen Messung	37
4.2.2.2 Durchführung der Messung.....	38
4.2.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion	38
4.2.3.1 Primerdesign.....	39
4.2.3.2 Bestimmung des Status des epithelialen Natriumkanals (β -ENaC) mittels Polymerase-Kettenreaktion	41
4.2.3.3 Bestimmung des m3-Status mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	42
4.2.3.4 Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion-Produkte mittels Agarose- Gelelektrophorese.....	44
4.3 Histologische Präparate	47
4.3.1 Makroskopische Schnittführung der Trachea und der Lunge.....	47
4.3.2 Herstellung der Schnittpräparate.....	48

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.3	Hämalaun-Eosin-Färbung	49
4.3.4	Perjodsäure-Schiff-Reaktion	49
4.3.5	Alcianblau-PAS-Färbung.....	51
4.4	Durchführung und Kriterien der lichtmikroskopischen Beurteilung	52
4.4.1	Bestimmung der intraluminalen Mukusakkumulation (<i>mucus plugging</i>)....	52
4.4.2	Bestimmung der Mukusmenge in den Atemwegen (<i>mucus volume density</i>)	53
4.4.3	Bestimmung der Becherzellzahl pro mm Basalmembran (Becherzellhyperplasie / -metaplasie).....	54
4.4.4	Bestimmung der Epithelhöhen (Epithelzellhypertrophie)	54
4.4.5	Detektion von Entzündungszellen (Entzündung)	55
4.5	Differenzielle Genexpressionsanalyse	55
4.5.1	RNA-Isolierung.....	55
4.5.1.1	Durchführung der RNA-Isolierung aus Lungengewebe	55
4.5.1.2	Quantitative RNA-Analytik-Messung der Reinheit und Konzentration am NanoDrop®	56
4.5.1.3	Qualitative RNA-Analytik-Messung der Reinheit und Konzentration mittels Bioanalyzer	56
4.5.2	Reverse Transkription	57
4.5.2.1	Grundprinzip der reversen Transkription	57
4.5.2.2	Durchführung der reversen Transkription	57
4.5.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	58
4.5.3.1	Grundprinzip der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	58
4.5.3.2	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit SYBR Green I	58
4.5.3.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit Taqman	59
4.5.3.4	Auswahl der Primer für die quantitative Echtzeit-Polymerase- Kettenreaktion.....	59
4.5.3.4.1	Primer-Test mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion.....	62
4.5.3.4.2	Primer-Test mittels SYBR Green I.....	63
4.5.3.4.3	Sequenzierung der Amplifikate.....	63

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.3.5	Standardreihen für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion ..	64
4.5.3.5.1	Grundprinzip der Standardreihen	64
4.5.3.5.2	Durchführung der Standardreihen	64
4.5.3.6	Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	64
4.5.3.7	Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mittels geNorm	65
4.5.4	DNA-Microarray	66
4.5.4.1	Funktionsprinzip des DNA-Microarrays	66
4.5.4.2	Durchführung des DNA-Microarrays	66
4.5.4.3	Auswertung des DNA-Microarrays	68
4.6	Statistische Auswertung	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Einfluss der Genotypen auf das Körpergewicht	69
5.1.1	Juvenile Tiere	69
5.1.2	Adulte Tiere	70
5.2	Einfluss der Genotypen auf pathomorphologische und -morphometrische Parameter im Respirationstrakt	71
5.2.1	Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt	71
5.2.1.1	Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der juvenilen Tiere	72
5.2.1.1.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt	72
5.2.1.1.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	72
5.2.1.1.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt	73
5.2.1.1.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt	73
5.2.1.2	Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der adulten Tiere	73
5.2.1.2.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt	74
5.2.1.2.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	74
5.2.1.2.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt	74

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.1.2.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	74
5.2.1.3	Zusammenfassende Betrachtung der intraluminalen Mukusakkumulation	75
5.2.2	Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge	77
5.2.2.1	Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge in den Atemwegen der juvenilen Tiere.....	78
5.2.2.1.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/ mCLCA3-wt.....	78
5.2.2.1.2	Vergleich: ENaC-tg/ m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	78
5.2.2.1.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/ m3-wt.....	78
5.2.2.1.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	79
5.2.2.2	Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge in den Atemwegen der adulten Tiere.....	79
5.2.2.2.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	79
5.2.2.2.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	79
5.2.2.2.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	80
5.2.2.2.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	80
5.2.2.3	Zusammenfassende Betrachtung der Mukusmenge	80
5.2.3	Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran.....	82
5.2.3.1	Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran bei den juvenilen Tieren.....	82
5.2.3.1.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	83
5.2.3.1.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	83
5.2.3.1.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	84
5.2.3.1.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	84
5.2.3.2	Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran bei den adulten Tieren	84
5.2.3.2.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	85
5.2.3.2.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	85
5.2.3.2.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	85

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.3.2.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	86
5.2.3.3	Zusammenfassende Betrachtung der Becherzellanzahl.....	86
5.2.3.4	Die Becherzellzahlen pro mm Basalmembran der Einzeltiere	88
5.2.3.5	Weiterführende statistische Auswertung der Becherzellanzahl	88
5.2.4	Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen.....	88
5.2.4.1	Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen des Respirationstraktes der juvenilen Tiere.....	89
5.2.4.1.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	89
5.2.4.1.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	90
5.2.4.1.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	90
5.2.4.1.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	90
5.2.4.2	Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen des Respirationstraktes der adulten Tiere.....	90
5.2.4.2.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	90
5.2.4.2.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	91
5.2.4.2.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	91
5.2.4.2.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	91
5.2.4.3	Zusammenfassende Betrachtung der Epithelhöhen.....	91
5.2.4.4	Die Epithelhöhen der Einzeltiere	94
5.2.4.5	Weiterführende statistische Auswertung der Epithelhöhen.....	94
5.2.5	Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen	94
5.2.5.1	Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen der juvenilen Tiere.....	94
5.2.5.1.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	94
5.2.5.1.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	95
5.2.5.1.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	95
5.2.5.1.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	95
5.2.5.2	Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen der adulten Tiere.....	95
5.2.5.2.1	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	95

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.5.2.2	Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko	96
5.2.5.2.3	Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt.....	96
5.2.5.2.4	Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	96
5.2.5.3	Zusammenfassende Betrachtung der Entzündungsreaktion	96
5.3	Einfluss der Genotypen auf die Expression der Muzingene <i>muc4</i> , <i>muc5ac</i> und <i>muc5b</i> sowie des Becherzellmarkers <i>mCLCA3</i>	98
5.3.1	Muzingen <i>muc4</i>	99
5.3.2	Muzingen <i>muc5ac</i>	100
5.3.3	Muzingen <i>muc5b</i>	101
5.3.4	Becherzellmarker <i>mCLCA3</i>	102
5.4	Einfluss der Genotypen auf die Genregulation (DNA-Microarray).....	103
5.4.1	ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	104
5.4.2	ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko.....	105
5.4.3	ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt	106
5.4.4	ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	107
5.5	Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse dieser Arbeit.....	108
5.5.1	ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt.....	108
5.5.2	ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko.....	109
5.5.3	ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt	110
5.5.4	ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt.....	110
6	Diskussion	113
6.1	Moduliert der <i>mCLCA3</i> -Status den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?	113
6.1.1	Moduliert der <i>mCLCA3</i> -Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?	114
6.1.1.1	Wie moduliert der <i>mCLCA3</i> -Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?	115
6.1.1.1.1	Hypothese: Der <i>mCLCA3</i> -Status spielt eine Rolle bei der Ausbildung eines zäheren Schleimes	115
6.1.1.1.2	Hypothese: <i>mCLCA3</i> induziert direkt eine Becherzellhyperplasie	116

INHALTSVERZEICHNIS

6.1.1.1.3	Hypothese: Der mCLCA3-Status nimmt einen Einfluss auf die lokale Immunabwehr in den Atemwegen	116
6.1.2	Moduliert der mCLCA3-Status im juvenilen Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?	117
6.1.2.1	Warum moduliert der mCLCA3-Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose und nicht im juvenilen Modell?	118
6.2	Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Daten aus der Literatur.....	118
6.2.1	Schweregrad des Phänotyps und statistische Signifikanzen	118
6.2.2	Körpergewicht	119
6.2.3	Intraluminale Mukusakkumulation	120
6.2.4	Mukusmenge / <i>Mucus volume density</i>	120
6.2.5	Becherzellanzahl pro mm Basalmembran	121
6.2.6	Epithelhöhe	123
6.2.7	Entzündungszellen in den Atemwegen.....	124
6.2.8	Genregulation der Becherzellmarker <i>muc4</i> , <i>muc5ac</i> , <i>muc5b</i> und <i>mCLCA3</i>	126
6.2.9	Globale Genexpressionsanalyse.....	127
6.2.9.1	Auffallende Aufregulation des Epidermal growth factor receptors.....	128
6.2.9.2	Angedeutet erhöhte Expression von Zink Finger-Proteinen.....	128
6.2.9.3	Tendenz einer Abregulation des Angiotensin II Rezeptors Typ 1b	128
6.2.9.4	Deutliche Aufregulation der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals	129
6.2.9.5	Aufregulation des Gamma-Aminobuttersäure Rezeptors	129
6.2.9.6	Abregulation der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie	129
6.3	Zusammenfassende Methodenkritik.....	130
6.4	Ausblick auf mögliche zukünftige Therapieansätze und weiterführende Arbeiten ...	130
7	Zusammenfassung	132
8	Summary	134
9	Abbildungsverzeichnis	136

INHALTSVERZEICHNIS

10 Tabellenverzeichnis	138
11 Literaturverzeichnis	142
12 Anhang.....	168
12.1 Zusammenstellung der detaillierten Untersuchungsergebnisse	168
12.1.1 Deskriptive Statistik der Körpergewichte	168
12.1.2 Deskriptive Statistik der <i>Mucus volume density</i> (nl/mm ²).....	168
12.1.3 Deskriptive Statistik der Becherzallanzahl pro mm Basalmembran	170
12.1.4 Deskriptive Statistik der Epithelhöhen	173
12.1.5 Graphische Darstellung der Becherzellzahlen der Einzeltiere	176
12.1.5.1 Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere	176
12.1.5.1.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko.....	176
12.1.5.1.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt.....	177
12.1.5.1.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko	178
12.1.5.1.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt	179
12.1.5.2 Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere	180
12.1.5.2.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko.....	180
12.1.5.2.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt.....	181
12.1.5.2.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko	182
12.1.5.2.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt	183
12.1.6 Graphische Darstellung der Epithelhöhen.....	184
12.1.6.1 Darstellung der Epithelhöhen der juvenilen Einzeltiere	184
12.1.6.1.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko.....	184
12.1.6.1.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt.....	185
12.1.6.1.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko	186
12.1.6.1.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt	187
12.1.6.2 Darstellung der Epithelhöhen der adulten Einzeltiere.....	188
12.1.6.2.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko.....	188
12.1.6.2.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt.....	189
12.1.6.2.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko	190

INHALTSVERZEICHNIS

12.1.6.2.4	Genotyp: ENaC-wt/m3-wt	191
12.1.7	Statistische Kennzahlen für die Anzahl der Becherzellen und die Epithelhöhen.....	192
12.1.7.1	Mann-Whitney-Test	192
	Danksagung.....	211
	Selbständigkeitserklärung	213

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
ASL	dünner Flüssigkeitsfilm auf der Atemwegsoberfläche (engl. <i>airway surface liquid</i>)
ATP	Adenosin triphosphat
bp	Basen paar(e)
CaCC	bisher auf molekularer Ebene unidentifizierte, Calcium-aktivierte Chloridleitfähigkeit (engl. <i>Calcium-activated Chloride Conductance</i>)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat (engl. <i>cyclic Adenosinemonophosphate</i>)
CCSP	engl. <i>Clara cell secretory protein</i>
CF	Zystische Fibrose (engl. <i>Cystic Fibrosis</i>)
CFTR	CFTR-Kanal (engl. <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
CLCA	Calcium-aktiverter Chloridkanal Regulator (engl. <i>calcium-activated chloride channel regulator</i>)
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung (engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
Ct-Wert	Schwellenwert in der exponentiellen Phase der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), (engl. <i>cycle threshold</i>)
DIDS	4,4'- Di isothiocyano-2,2'-stilbene di sulfonic acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleinacid</i>)
ENaC	epithelialer Natriumkanal (engl. <i>epithelial sodium [Na⁺] channel</i>)
EZ	Entzündungs zellen
FRET	Förster-Resonanz energie tr ansfer
HE-Färbung	Häm alaun- E osin-Färbung
IL	I nterleukin
kb	Kilob ase(n)
kDa	Kilodal ton
k.o.	engl. knock out
LPS	Lipopolysaccharid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

m3	hier: Kurzform für „ mCLCA3 “, Calcium-aktivierter Chloridkanal Regulator bei der Maus, (engl. <i>calcium-activated chloride channel regulator, murine</i>)
MBL	M annose b indendes L ektin
min	M inute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger Ribonucleic Acid</i>)
N	Statistisches Symbol für die Größe einer Stichprobe
Nr.	N ummer
NTC	Negativkontrolle bei der PCR bzw. qPCR, bei der statt (c)DNA Wasser eingesetzt wird (engl. <i>no template control</i>)
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (engl. <i>Periodic acid-Schiff reaction</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RIN	Qualitätslabel bzw. Maß der Unversehrtheit von Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleinacid Integrity Number</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleinacid</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
sec	Sekunde(n) (engl. <i>second</i>)
SPSS	Programm für die statistische Datenanalyse (engl. <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>)
Std	S tunde(n)
Tab.	T abelle
tg	t ransgen
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, (engl. <i>transforming growth factor</i>)
TLR	T oll-like- R ezeptor
TNF	T umor- N ekrose- F aktor
wt	W ildtyp

1 Einleitung

Die Mukoviszidose oder zystische Fibrose (engl. *Cystic Fibrosis*, CF) ist die häufigste letale angeborene Lungenerkrankung des Menschen, beruhend auf Mutationen im Bereich des *CFTR*-Gens (engl. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Bei der Mukoviszidose kommt es zu einer verminderten Chloridsekretion, einer erhöhten Natrium- und Wasserabsorption, einer Verminderung des Flüssigkeitsfilms auf der Atemwegsoberfläche (engl. *airway surface liquids*, ASL), einer Dehydration des Schleims in den Atemwegen und einer gestörten mukoziliären Reinigung (engl. *clearance*). Ein bedeutendes Kennzeichen der Lungenpathologie ist die Verlegung der Atemwege durch Schleimansammlungen und eine massiven Vermehrung von schleimproduzierenden Becherzellen. Die genaue Pathogenese dieser unheilbaren Erkrankung ist bislang unklar, daher sind geeignete Mukoviszidose-Tiermodelle unentbehrlich für die Erforschung der Mechanismen dieser Erkrankung und die Entwicklung von neuen, innovativen therapeutischen Strategien. Das „ENaC-Modell“ (engl. *epithelial sodium channel*), eine transgene Maus, die in den Atemwegen den epithelialen Natriumkanal überexprimiert, ist das einzige Mukoviszidose-Mausmodell, das mit einer Verminderung des ASL, einer erhöhten Schleimkonzentration, einem verzögerten Schleimtransport, Obstruktionen der Atemwege mit Schleim sowie einer Becherzellhyperplasie und -metaplasie den Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp zeigt.

Besondere Bedeutung haben in den letzten Jahren sogenannte Modulatorgene erlangt, die den Phänotyp der Erkrankung verändern. Eine gezielte Beeinflussung dieser Gene und ihrer Genprodukte stellt einen hoffnungsvollen therapeutischen Ansatz dar. Zu den eben genannten Modulatorgenen gehört die CLCA-Gen-Familie (engl. *calcium-activated chloride channel regulator*), von denen beim Menschen insbesondere hCLCA1 und sein orthologer Vertreter bei der Maus mCLCA3 (hier kurz: „m3“) mögliche Kandidaten für die Modulation des Mukoviszidose-Phänotyps darstellen. Das Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin hält und züchtet m3-ko-Mäuse, die selbst jedoch keinen Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp zeigen. In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Mausmodell phänotypisch untersucht, welches bereits vorab in der Arbeitsgruppe durch Melanie Bothe und Dr. Lars Mundhenk durch Kreuzung der vorgestellten Modelle generiert werden konnte. Diese Tiere sind sowohl durch eine atemwegsspezifische Natriumkanalüberexpression (ENaC-tg) als auch durch die fehlende Expression von m3 (m3-ko) charakterisiert und wurden in dieser Arbeit pathomorphologisch, -morphometrisch und molekularbiologisch phänotypisiert. Dabei sollte gezeigt werden, ob und in welchem Ausmaß m3 den Lungenphänotyp moduliert.

2 Literaturübersicht

2.1 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose (auch zystische Fibrose genannt) wird namentlich durch die lateinischen Wörter „mucus“ (der Schleim) und „viscidus“ (zäh) gebildet. Bereits durch diese Namensgebung wird die Hauptcharakteristik der Erkrankung deutlich beschrieben. Bei der Mukoviszidose handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung, die auf Grund eines Gendefektes mit einem erhöhten Salz- und Wasserentzug auf der Oberfläche der Schleimhäute von vor allem Lunge und Darm einhergeht, welches zu der Ausbildung eines besonders „trockenen“ und zähen Schleimes führt (MATSUI *et al.*, 1998).

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung beim Menschen

Bei der Mukoviszidose handelt es sich um eine bisher unheilbare, weltweit verbreitete, angeborene, autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung des Menschen, die nicht spontan bei Tieren beobachtet wird. Sie ist charakterisiert durch eine systemische Exokrino-pathie, die durch die Ausbildung eines zähen Schleimes zu Veränderungen in vielen exokrinen Organen führt, einschließlich der Atemwege und der Lunge, des exokrinen Pankreas, der Leber und des Darmtraktes. Außerdem gibt es Veränderungen des Samenleiters sowie eine Dysfunktion der Schweißdrüsen (COLLINS, 1992; WELSH und SMITH, 1993). In Deutschland sind zurzeit etwa 8.000 Menschen an Mukoviszidose erkrankt, wobei jährlich rund 200 Neugeborene mit dieser Erkrankung zur Welt kommen (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Die Erkrankungsquote liegt in Nordamerika und Europa zwischen 1:2.500 und 1:1.600. Menschen afrikanischer Abstammung erkranken mit einem geringeren Risiko von etwa 1:17.000. Für asiatische Bevölkerungsgruppen ist das Risiko an Mukoviszidose zu erkranken mit etwa 1:100.000 am geringsten (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Ursächlich liegen der Erkrankung Mutationen des verantwortlichen *CFTR*-Gens zu Grunde, wobei inzwischen mehr als 1.500 verschiedene Mutationen bekannt sind (RIORDAN *et al.*, 1989). Da diese Erkrankung autosomal rezessiv vererbt wird, zeigt sich deren klinische Manifestation nur, wenn beide Elternteile Träger der Mutation sind (REINHARDT und KRAEMER, 2001). In Deutschland sind etwa vier Millionen Menschen Träger des erkrankten Gens (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Die genaue Pathogenese der Erkrankung ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Auch eine Heilung der Mukoviszidose ist bislang nicht möglich. Verschiedene Therapieansätze ermöglichen jedoch eine Verbesserung der Lebensqualität, eine Milderung der Symptome und eine Verlängerung der Lebenszeit auf inzwischen etwa vier Jahrzehnte. Mit der Erforschung der genauen Pathogenese erhofft man

sich ein besseres Verständnis der Erkrankung mit neuen Therapieansätzen und langfristig eine Heilung der tödlichen Erbkrankheit.

2.1.2 Symptome und klinischer Verlauf

Neben der Pankreasinsuffizienz stellen chronische Infektionen der Lunge die Kardinalsymptome der Mukoviszidose dar (PROESMANS *et al.*, 2008), wobei die progressive Erkrankung der Lunge für etwa 95 % der Morbidität und Mortalität verantwortlich ist (SCHOLTE *et al.*, 2004). Zum Zeitpunkt der Geburt besteht die Beeinträchtigung der Lunge noch nicht. Sie entwickelt sich zunehmend in der Folge sich verschlimmernder akuter Infektionen mit bestimmten Pathogenen, vor allem *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* sowie durch chronische mikrobielle Besiedlung und gewebezerstörende Entzündungen bis zu einem irreversiblen Verlust der Lungenfunktionen (GOVAN und NELSON, 1992; MEARN, 1992; OPPENHEIMER, 1976). Die Lungensymptome sind charakterisiert durch Husten, Auswurf, Keuchatmung, Bluthusten, Brustenge und Atemlosigkeit, während die systemischen Folgen vor allem durch Fieber und Unwohlsein gekennzeichnet sind (GEDDES und SHINER, 1989). Neben der Lunge sind vor allem das Pankreas mit pankreatogenem Diabetes mellitus und chronischen Pankreatitiden, das Gallengangsepithel mit sekundärer biliärer Zirrhose und Gallensteinen, der Samenstrang mit resultierender Infertilität sowie der Dünndarm mit Obstipationen und Mekoniumileus betroffen (MAITRA und KUMAR, 2005; ROWNTREE und HARRIS, 2003). Dabei ruft das Zusammenspiel respiratorischer und intestinaler Symptome zusätzlich Schwäche und Unwohlsein hervor, was wiederum einen großen Einfluss auf die psychischen und sozialen Probleme der betroffenen Patienten nimmt (GEDDES und SHINER, 1989). Vor allem Frustration, Depression, Traurigkeit und Schlafstörungen zeigen sich als emotionale Auswirkungen der Mukoviszidose (GOSS *et al.*, 2009). Des Weiteren nimmt die veränderte Zusammensetzung sämtlicher Sekrete bei der Mukoviszidose einen Einfluss auf die Augengesundheit, wobei insbesondere Xerophthalmie, mangelhafte Ausbildung des Tränenfilms, funktionelle Veränderungen der Sehnerven, Papillenödeme, Nachtblindheit (Nyktalopie) und retinale Blutungen beschrieben werden (MRUGACZ und MINAROWSKA, 2002).

2.1.3 Pathophysiologie

2.1.3.1 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) bei der Mukoviszidose

Bereits im Jahr 1989 konnte die Ursache der Mukoviszidose als Mutation des verantwortlichen Genes begründet werden (KEREM *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989). Dabei handelt es sich um das *CFTR*-Gen auf dem Chromosom 7 in der q31.2-Region. Es hat eine Größe von 250 kb und besteht aus 27 Exons. Dieses Gen codiert für das CFTR-Protein, welches als zellmembranständiger Chlorid-Kanal (HULL und THOMSON, 1998) und als Hemmer des epithelialen Natriumkanals (ENaC) fungiert (BOUCHER, 2007). Mutationen des *CFTR*-Gens führen zu einer fehlenden oder einer fehlerhaften Ausbildung des CFTR-Proteins. Inzwischen sind mehr als 1500 verschiedene Mutationen des *CFTR*-Gens bekannt, wobei sie je nach deren Auswirkung auf die Funktion als Chlorid-Kanal und die Synthese von CFTR-Protein in fünf Gruppen eingeteilt werden (WELSH und SMITH, 1993). Mutationen im Bereich des Stop-Codons (Klasse 1) führen zu der Bildung eines nicht funktionsfähigen CFTR-Proteins. Mutationen der Klasse 2 resultieren in ein fehlgefaltetes CFTR-Protein, das von der internen Qualitätskontrolle der Zellen als solches erkannt und abgebaut wird. Die Mutationen der Klasse 3 führen zu einer defekten Regulation des CFTR-Proteins und damit zu einem vollständigen Verlust der CFTR-Funktionen. Die Mutationen dieser drei Klassen führen in der Regel zu den klassischen Symptomen der Mukoviszidose. In Klasse 4 werden die Mutationen zusammengefasst, die zu einer verminderten Chlorid-Leitfähigkeit führen, wobei die Mutationen der Klasse 5 die normale Transkription lediglich behindern und dadurch zu einer verminderten Menge eines normalen CFTR-Proteins führen. Die Mutationen der Klassen 4 und 5 sind in den meisten Fällen mit einer mildereren Form der Mukoviszidose vergesellschaftet (PROESMANS *et al.*, 2008). Die Häufigkeiten des Auftretens der einzelnen Mutationen unterscheidet sich signifikant, wobei etwa 85 % der Mukoviszidose-Patienten an der Mutation p.Phe508del (früher $\Delta F508$) leiden (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Bei dieser Mutation fehlt an Stelle 508 die Aminosäure Phenylalanin. Kommt es nun zu Mutationen im Bereich des *CFTR*-Gens, so kann das CFTR-Protein nicht entsprechend gefaltet werden (Klasse 2 Mutation), es kommt zu Störungen des Reifeprozesses innerhalb der Zelle und schließlich zu dessen Degradierung bevor es in die Plasmamembran eingebunden werden kann (CHENG *et al.*, 1990; GUGGINO und STANTON, 2006; RIORDAN, 2005). Folglich kommt es zu einem Fehlen der *CFTR*-vermittelten Chlorid-Sekretion und zu einer gesteigerten Natrium-Absorption auf Grund der fehlenden *CFTR*-vermittelten Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC).

2.1.3.2 Die Rolle des epithelialen Natriumkanals „ENaC“ bei der Mukoviszidose

Die der Mukoviszidose zugrunde liegende gesteigerte Natrium-Absorption wird durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) reguliert. Dieser Kanal wird in einer Vielzahl epithelausgekleideter Organe exprimiert und ist dabei vor allem in der Lunge, den Nieren, dem Colon und den Schweißdrüsen von funktionaler Bedeutung (DONALDSON und BOUCHER, 2007). ENaC ist als Heteromultimer aus zwei α -Untereinheiten und jeweils einer β - und γ -Untereinheit aufgebaut (FIRSOV *et al.*, 1998), wobei Variabilitäten in der Anzahl der Untereinheiten sowie das Auftreten einer δ -Untereinheit möglich sind und vermutlich funktionell wichtigen Unterschieden hinsichtlich der Kanalaktivität bzw. -regulation in den verschiedenen Lungenregionen zugrunde liegen (JI *et al.*, 2006). Die Regulation von ENaC erfolgt in Organen, die an der Volumenhomöostase des ganzen Körpers beteiligt sind, teilweise über systemische Spiegel von Mineralokortikoiden und deren nachgeschalteten Effektoren. In den Atemwegen erfolgt die Regulation von ENaC über lokale Faktoren, die den aktuellen Status des ASL widerspiegeln (DONALDSON und BOUCHER, 2007; KNOWLES *et al.*, 1997). Dazu gehört die Konzentration an Purinnukleotiden, wie Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosin (ADO) im ASL (DONALDSON und BOUCHER, 2007), wobei sie in hohen Konzentrationen die Aktivität von ENaC hemmen (DEVOR und PILEWSKI, 1999; MALL *et al.*, 2000; STUTTS *et al.*, 1995). Weiterhin wird die Aktivität von ENaC durch extrazelluläre Serin-Proteasen und endogene Antiproteasen gesteuert (BRIDGES *et al.*, 2001; CALDWELL *et al.*, 2004). Bei der Mukoviszidose führt die Abwesenheit von *CFTR* als cAMP-gesteuerten Chlorid-Kanal über eine erhöhte cAMP-Konzentration zu einer gesteigerten Aktivität des ENaC und verschlimmert zusätzlich durch die dysregulierte Natriumabsorption die ASL-Volumenabnahme (BOUCHER *et al.*, 1986; DONALDSON und BOUCHER, 2007; STUTTS *et al.*, 1997). Messungen des Ionen-Transports im Respirationstrakt lieferten mit *in vivo* Studien den Beweis für eine verminderte Chloridpermeabilität und eine stark erhöhte Natriumabsorption bei der Mukoviszidose (KNOWLES *et al.*, 1981). ENaC reguliert die Natriumabsorption des Atemwegepithels und stellt dadurch in der Pathophysiologie der Mukoviszidose den entscheidenden Schritt für die Volumenabnahme des ASL dar, in dessen Folge die mukoziliäre Clearance als angeborener Immunabwehrmechanismus der Lunge außer Kraft gesetzt wird (DONALDSON und BOUCHER, 2007). Für das Verständnis der bei der Mukoviszidose fehlgesteuerten Prozesse ist die Kenntnis der Abwehrmechanismen der gesunden Lunge von essentieller Bedeutung.

2.1.3.3 Die mukoziliäre Clearance in der gesunden Lunge

Die mechanische Reinigung der Lunge stellt einen Mechanismus der primären, angeborenen Abwehr in den Atemwegen dar (KNOWLES und BOUCHER, 2002; MATSUI *et al.*, 1998). Dabei wird die Atemwegsoberfläche von einer zweiphasigen Gelschicht bedeckt (ASL, engl. *airway surface liquid*), wobei die periziliäre Schicht als poly-anionisches Gel (RANDELL und BOUCHER, 2006) von der Zelloberfläche bis zum Ende der ausgestreckten Zilien reicht und die Mukusschicht oberhalb der Zilien liegt (KNOWLES und BOUCHER, 2002). Dieses zweiphasige Gel bietet optimale Voraussetzungen für einen effektiven Zilienschlag und verhindert gleichzeitig durch die Ausbildung eines Gleitfilmes die Anheftung des Mukus an der Epithelzelloberfläche (RAVIV *et al.*, 2003). Die Mukusschicht oberhalb der Zilien wird durch sezernierte Muzine gebildet, die aus extrem langen Polymeren bestehen. Sie besteht vor allem aus einer Mischung der Muzine *muc5ac* und *muc5b*, die bei gesunden Organismen in den Becherzellen und submukösen Drüsen gebildet werden (ROSE und VOYNOW, 2006). Funktionell ist die Mukusschicht netzartig aufgebaut, wobei die Maschen eine optimale Größe für das Einfangen und Aufbewahren inhalierter Partikel besitzen (MATSUI *et al.*, 2006). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Hydratation des ASL den bedeutendsten Faktor des effektiven Schleimtransportes darstellt (MALL *et al.*, 2004). Diese wird in gesundem Epithel durch dessen Fähigkeit zur Absorption und Sekretion von Salzen gewährleistet, in deren Folge es zu osmotischen Wasserbewegungen kommt (TARRAN *et al.*, 2001a; TARRAN *et al.*, 2006). Dabei stellt der Transport von Natrium-Ionen den dominanten Ionentransportvorgang in gesunden Organismen dar, wobei der aktive Natrium-Transport durch einen elektrogenen Kanal in der apikalen Membran (ENaC, epithelialer Natriumkanal) vermittelt wird. Natrium-Ionen werden dabei nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion in das Zellinnere transportiert, wobei die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase durch die Ausschleusung der Natrium-Ionen aus der Zelle als treibende Kraft fungiert. Chlorid-Ionen werden *CFTR*-vermittelt an der apikalen Membran aus der Zelle transportiert, wobei Wasser dem Konzentrationsgefälle der Ionen osmotisch folgen kann und den Mukus auf der Atemwegsepitheloberfläche hydratisiert. Das Atemwegsepithel mit seinen Ionen-Transportmechanismen ist in der Lage geringfügige Abweichung der Hydratation des ASL selbst zu korrigieren, indem bei ASL-Mangel auf der Oberfläche der epitheliale Natriumkanal (ENaC) und damit die Natrium-Ionen-Absorption gehemmt wird. In der Folge wird die Sekretion von Chlorid-Ionen forciert, wobei sie durch zwei verschiedene Kanäle in der apikalen Membran aus der Zelle erfolgt (BOUCHER, 2007). Der *CFTR*-Chlorid-Kanal vermittelt die basale Aktivität, wohingegen der Calcium-aktivierte Chlorid-Kanal

(CaCC) auf die elektrochemischen Differenzen reagiert (TARRAN *et al.*, 2005). Das CFTR-Protein nimmt eine Schlüsselposition bei der Aufrechterhaltung der ungestörten Hydratation des ASL ein, zum einen durch seine Fähigkeit als cAMP-gesteuerten Chlorid-Kanal Chlorid-Ionen aus der Zelle zu transportieren, zum anderen durch seine Möglichkeit ENaC und damit die Absorption von Natrium-Ionen über hohe Konzentrationen an Purinnukleotiden wie Adenosintriphosphat (ATP) indirekt zu hemmen (DEVOR und PILEWSKI, 1999; MALL *et al.*, 2000; STUTTS *et al.*, 1995). Die Schlüsselfrage bei der Mukoviszidose ist jedoch weiterhin, wie die Mutationen des *CFTR*-Gens und die damit verbundene Fehlfunktion des CFTR-Proteins zu den entsprechenden Störungen in den bei der Mukoviszidose betroffenen Organen und insbesondere in der Lunge führen können (BOUCHER, 2007).

2.1.3.4 **Hypothesen über den Zusammenhang der Mutationen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator und dem Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp**

Im Folgenden werden die verschiedenen Hypothesen über den Zusammenhang der *CFTR*-Mutationen mit dem bei Mukoviszidose typischen Lungenphänotyp dargestellt, wobei sie in der Reihenfolge nach zunehmender Wahrscheinlichkeit vorgestellt werden.

2.1.3.4.1 **Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei der Entstehung eines epithelialen Entzündungssyndroms**

Perez und Mitarbeiter untersuchten die Entstehung der Entzündungsreaktion des Atemweg-epithels bei der Mukoviszidose, indem sie ein Mukoviszidose-Modell mit Hilfe eines CFTR-Inhibitors (CFTR(inh)-172) in der Zellkultur entwickelten (PEREZ *et al.*, 2007). Dieses Modell erlaubte ohne störende genetische Variationen von CFTR die Untersuchung, ob allein die fehlende CFTR-vermittelte Chlorid-Leitfähigkeit ausreicht, um eine Mukoviszidose-typische Entzündungsreaktion zu initialisieren. Dabei stellten sie fest, dass die Hemmung von CFTR über 3-5 Tage unter anderem zu einem signifikanten Anstieg der Interleukin-8 Sekretion führte, ohne dass die Aktivität von ENaC gesteigert wurde. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die fehlende Chlorid-Leitfähigkeit allein den Entzündungsphänotyp des Atemwegepithels bei der Mukoviszidose imitieren kann (PEREZ *et al.*, 2007). Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Ergebnisse von Studien, die an Stelle des CFTR-Inhibitors mit Atemwegsepithel-Zellkulturen von Mukoviszidose-Patienten und gesunden Kontrollen arbeiteten und dabei keine Prädisposition für Infektionen des Epithels mit der CFTR-Mutation im Ver-

gleich zu normalem Epithel nachweisen konnten (BECKER *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005).

2.1.3.4.2 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator als Vermittler der Förderung der epithelialen Clearance und bei der Abtötung von Bakterien

Nach Pier und Mitarbeitern nimmt das CFTR-Protein eine Funktion als Vermittler für die Förderung der epithelialen Clearance und die Tötung von Bakterien ein, wobei diese Aufgaben bei der *CFTR*-Mutation der Mukoviszidose nicht mehr erfüllt werden können (PIER *et al.*, 1996). Sie untersuchten Zellkulturen aus humanen Atemwegsepithelzellen mit der Mutation p.Phe508del (früher $\Delta F508$) des *CFTR*-Gens und stellten fest, dass diese Epithelzellen verglichen mit dem Wildtyp-Allel nicht in der Lage waren, *Pseudomonas aeruginosa* abzuwehren. Daher kamen sie zu dem Ergebnis, dass CFTR zu einem wichtigen Abwehrmechanismus beitragen könnte, der für die Bekämpfung von *Pseudomonas aeruginosa* im Respirationstrakt von Bedeutung ist (PIER *et al.*, 1996). An dieser Hypothese wird jedoch kritisiert, dass andere Mutationen des *CFTR*-Gens, beispielsweise G551D, bei denen mutiertes CFTR-Protein an der apikalen Membran vorliegt, einen ähnlichen Phänotyp der Mukoviszidose in der Lunge zeigen wie bei der untersuchten Mutation p.Phe508del (früher $\Delta F508$), die durch komplett fehlendes CFTR-Protein gekennzeichnet ist (BOUCHER, 2007), sodass die Rolle von CFTR bei der Abwehr von bakteriellen Erregern vermutlich als untergeordnet angesehen werden sollte.

2.1.3.4.3 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei der Kontrolle der Salzkonzentration der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit

Smith und Mitarbeiter sowie Zabner und Mitarbeiter untersuchten die Rolle des CFTR-Proteins bei der Kontrolle der Salzkonzentration (NaCl) des ASL (SMITH *et al.*, 1996; ZABNER *et al.*, 1998). Dabei stellten sie fest, dass Mukoviszidose-typische Bakterien auf gesundem Epithel abgetötet wurden, sich jedoch auf Mukoviszidose-Epithel stark vermehrten, obwohl eine antimikrobielle Wirkung des ASL, sowohl bei Mukoviszidose-Epithel, als auch bei gesundem Epithel nachgewiesen werden konnte. Der antimikrobielle Effekt des ASL beruht dabei auf der Wirkung körpereigener Defensine, die der angeborenen Immunabwehr zugehörig sind und vor allem von Epithelzellen, aber auch von Leukozyten gebildet werden. Es konnte festgestellt werden, dass eine niedrige Salzkonzentration (NaCl) des ASL notwendig ist, um Bakterien nachhaltig abzutöten. Das ASL bei Mukoviszidose besitzt allerdings

eine relativ höhere Salzkonzentration (NaCl) als bei gesunden Individuen, die eine Bekämpfung der Bakterien verhinderte. Bei Korrektur der NaCl-Konzentration nach unten zeigte auch das Mukoviszidose-Epithel eine deutliche bakterizide Wirkung. Daher stellten sie die Hypothese auf, dass das CFTR-Protein die Salzzusammensetzung des ASL kontrolliert und folglich durch das Fehlen des CFTR-Proteins ein hypertonisches ASL produziert wird und somit der Defensin-vermittelte antimikrobielle Effekt des Atemwegepithels verloren geht (SMITH *et al.*, 1996; ZABNER *et al.*, 1998). Gegen diese Hypothese sprechen allerdings die Ergebnisse anderer Studien, die keinen Unterschied in der Ionen-Zusammensetzung des ASL bei Mukoviszidose-Patienten und gesunden Kontrollen detektieren konnten (KNOWLES *et al.*, 1997; KOTARU *et al.*, 2003).

2.1.3.4.4 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei einer gestörten Funktion submuköser Drüsen

Diverse Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Hypothese, dass Mutationen im *CFTR*-Gen zu einer gestörten Funktion der submukösen Drüsen und damit zu einer verminderten Sekretion eines hyperviskösen Mukus führt (INGLIS und WILSON, 2005; JOO *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2006; VERKMAN *et al.*, 2003; WINE und JOO, 2004; WU *et al.*, 2007). Zugrunde liegt die Tatsache, dass die submukösen Drüsen den vorherrschenden CFTR-Expressionsort in der normalen Lunge darstellen und als sehr frühe Anzeichen der Mukoviszidose eine Hyperplasie dieser Drüsen im histologischen Bild gefunden werden kann (INGLIS und WILSON, 2005). Dabei scheinen die submukösen Drüsen mit einer gestörten Sekretion von Flüssigkeit auf cAMP-gesteuerte Agonisten zu reagieren. Daher stellten sie die Hypothese auf, dass eine Fehlfunktion dieser submukösen Drüsen eine entscheidende Rolle in der frühen Pathophysiologie der Mukoviszidose spielen könnte. Nach Boucher ist es auf Grund des Fehlens der submukösen Drüsen in den kleinen Atemwegen jedoch unwahrscheinlich, dass deren Dysfunktion zu der Pathogenese der Mukoviszidose in den kleinen Atemwegen führt (BOUCHER, 2007), die die Hauptlokalisation der Erkrankung darstellen (DAVIS, 2006; ZUELZER und NEWTON, 1949).

2.1.3.4.5 Die Rolle des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator bei einer gestörten mechanischen Selbstreinigung

Nach Matsui resultiert die Mukoviszidose-typische Erkrankung der Atemwege aus einer gestörten mechanischen Selbstreinigung (*Clearance*) des Atemwegepithels, die eine angeborene Form der Abwehr gegen Bakterien darstellt (MATSUI *et al.*, 1998). Eine effiziente Mu-

kus-Clearance kann nur bei optimal hydratisierten Atemwegsoberflächenepithelien erfolgen. In Folge des bei der Mukoviszidose mutierten *CFTR*-Gens kommt es zu einem dysregulierten Chlorid-Ionen- und Natrium-Ionen-Transport, der wiederum zu einer Dehydratation des ASL und schließlich zu einer gestörten Mukus-Clearance mit massiver bakterieller Besiedlung führt (TARRAN *et al.*, 2001b).

2.1.3.5 Die mukoziliäre Clearance in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten

Im Gegensatz zu gesundem Epithel wird bei vorhandenen Mutationen des *CFTR*-Gens das CFTR-Protein gar nicht oder in defekter Form ausgebildet (wie bereits unter 2.1.3.1 beschrieben wurde), sodass es weder seiner Funktion als Chlorid-Kanal, noch als Hemmer der Natrium-Ionen-Absorption nachkommen kann. Der Natrium-Ionen-Transport findet ungehemmt statt und die CFTR-vermittelte Chlorid-Ionen-Sekretion entfällt vollständig. In der Folge verändern sich die Eigenschaften des ASL maßgeblich. Die Atemwegsoberfläche trocknet aus, die periziliäre Gelschicht kollabiert, die Muzinkonzentration in der Mukusschicht steigt drastisch an und der Schleim heftet sich an die Zelloberfläche (MATSUI *et al.*, 1998). Diese Adhäsion des Mukus an die Epithelzelloberfläche kann die Merkmale der Mukoviszidose, insbesondere Entzündung, chronische Infektion und Obstruktion der Atemwege hervorrufen (BOUCHER, 2007).

2.1.3.6 Weitere Folgen der Reduktion der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit bei Mukoviszidose-Patienten

Einzigartig bei der Mukoviszidose ist die Persistenz der bakteriellen Infektion der Bronchien, wobei es zu einer lebenslangen Besiedlung mit *Pseudomonas species* kommen kann (SMITH *et al.*, 2006). Bakterien wachsen physiologisch und morphologisch in Biofilmen (BALTIMORE *et al.*, 1989; SRIRAMULU *et al.*, 2005) und sind daher schwierig mittels sekundärer Abwehrmechanismen und antimikrobiellen Agentien zu bekämpfen (MOSKOWITZ *et al.*, 2005). In normal hydratisiertem Mukus befinden sich die Bakterien schwimmend innerhalb der Gelschicht. Bei Dehydratation des ASL sinkt die Maschenweite von 0,5 bis 10 μm auf nur noch weniger als 100 nm und die Bakterien auf der Oberfläche des Mukus bei Mukoviszidose werden in ihrer Bewegung eingeschränkt und vermehren sich rasant vor Ort. Folglich kommt es bei Mukoviszidose-Patienten zu einer starken bakteriellen Besiedlung innerhalb der Atemwege (COSTERTON *et al.*, 1999; DAVIES *et al.*, 1998), sodass dehydratisierter Mukus die Entstehung von Biofilmen scheinbar begünstigt (MATSUI *et al.*, 2006). Zusätzlich kommt es auf Grund der Dehydratation des ASL zu einer reduzierten

Wirksamkeit sekundärer Abwehrmechanismen gegen bakterielle Besiedlung der Atemwege. Lösliche antimikrobielle Agentien, wie beispielsweise Lactoferrin und Lysozyme sowie einwandernde neutrophile Granulozyten sind in der gesunden Lunge in der Lage Bakterien abzutöten. Bei der veränderten Konzentration des Mukus in Mukoviszidose-Epithelien verlieren diese Substanzen an Wirksamkeit, da sie den veränderten Schleim schlechter durchdringen und folglich das bakterielle Wachstum nicht begrenzen können (MATSUI *et al.*, 2006). Auch für die neutrophilen Granulozyten stellt der veränderte Mukus ein unüberwindbares Hindernis dar, sodass sie ihre Fähigkeit der Bakterienbekämpfung verlieren (MATSUI *et al.*, 2005).

2.1.3.7 **Beweise für die Reduktion der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit bei Mukoviszidose-Patienten**

Die Hypothese der Atemwegsdehydratation bei Mukoviszidose konnte auf verschiedenen Nachweisebenen bestätigt werden. In Zellkulturen war gesundes Epithel im Gegensatz zu Mukoviszidose-Epithel in der Lage ein adäquates ASL-Volumen unter statischen Bedingungen aufrechtzuerhalten (MATSUI *et al.*, 1998; TARRAN *et al.*, 2005). In bioelektrischen Studien konnte an Zellkulturen der fehlgesteuerte Ionen-Transport nachgewiesen werden (BUTTON *et al.*, 2007; MATSUI *et al.*, 1998). Dabei kam es in dem Mukoviszidose-Epithel zu einer verminderten Chlorid-Ionen-Sekretionsfähigkeit und zu einer unregulierten Natrium-Ionenabsorption, sodass auch in diesen Studien die fehlende adäquate Hydratation der Atemwegsoberflächen bei Mukoviszidose-Epithelien mit einem vollständigen Verlust der Fähigkeit des Schleimtransportes und schließlich der Adhäsion des Mukus an die Zelloberfläche gezeigt werden konnte. Neben den *in vitro* Daten konnten auch *in vivo* Daten aus Mausmodellen gewonnen werden. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass in der normalen Mäuselunge nur wenig CFTR exprimiert wird. In der Folge zeigen Mäuse, bei denen das *CFTR*-Gen gezielt ausgeschaltet wurde, nur einen minimalen bzw. keinen Mukoviszidose-Phänotyp in der Lunge (GRUBB und BOUCHER, 1999). Um jedoch trotzdem den Effekt der ASL-Dehydratation in den murinen Atemwegen testen zu können, musste die gesteigerte Natriumabsorption auf alternativem Wege hervorgebracht werden. Dieses gelang Mall und Mitarbeitern durch gezielte Überexpression der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC), wobei diese Tiere eine Abnahme des ASL, Mukusakkumulationen und Tod durch Asphyxie zeigten, wie im Folgenden unter Punkt 2.2.2 dargestellt wird (MALL *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme des ASL zu deutlichen Merkmalen der Mukoviszidose *in vivo* führen kann (BOUCHER, 2007). An klinischen Studien am

Menschen konnte die Bedeutung des ASL-Volumens bereits frühzeitig gezeigt werden. Dabei wurden im Jahr 1940 Mukusplaques in den Bronchiolen als erste Anzeichen der Mukoviszidose-bedingten Läsionen identifiziert (ZUELZER und NEWTON, 1949). Zwanzig Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass der Wassergehalt der Sekrete von Mukoviszidose-Patienten im Gegensatz zu gesunden Menschen reduziert war (MATTHEWS *et al.*, 1963; POTTER *et al.*, 1967; POTTER *et al.*, 1969).

2.1.3.8 Weitere Faktoren bei der Entstehung der Reduktion der Atemwegsoberflächenfeuchtigkeit

Die reine Hyperabsorption von Natrium-Ionen und die fehlende Sekretion von Chlorid-Ionen stellt nach verschiedenen Studien eine zu stark vereinfachte Version der Abläufe bei der Mukoviszidose dar. Es wird von zusätzlichen Signalmolekülen innerhalb des ASL ausgegangen, die dessen Volumen unter dem Einfluss von exogenem Stress durch beispielsweise Aspiration von Partikeln oder Viren kontrollieren (LAZAROWSKI *et al.*, 2004). Vor allem Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosin (ADO) könnten als extrazelluläre Signalmoleküle in der Lage sein, das ASL-Volumen und dessen optimale Hydratation zu kontrollieren (LAZAROWSKI und BOUCHER, 2001; PICHER *et al.*, 2004; STUTTS *et al.*, 1995), wie in der nachfolgenden Abbildung dargestellt wurde (Abb. 1). In gesundem Epithel wird ATP aus der Epithelzelle ins Lumen abgegeben, reagiert dort zum einen mit dem P2Y₂-Purinrezeptor, der wiederum die Hemmung des ENaC induziert und auch die Chlorid-Ionen-Sekretion durch Aktivierung des CFTR-Chlorid-Kanals und des CaCC forciert (LAZAROWSKI und BOUCHER, 2001). Zum anderen wird ATP durch Ektoenzyme an der Zelloberfläche zu ADO metabolisiert (PICHER *et al.*, 2004). ADO interagiert mit den im Lumen lokalisierten A_{2b} Rezeptoren, die cAMP-abhängig CFTR aktivieren und durch einen bislang unbekanntem Mechanismus CFTR dazu bringen, ENaC zu hemmen (STUTTS *et al.*, 1995). Dabei wird das ASL-Volumen scheinbar durch das Ausmaß der Stress-induzierten ATP-Freigabe reguliert (BOUCHER, 2007). In Mukoviszidose-Epithel wird kein funktionelles CFTR-Protein in der apikalen Membran ausgebildet. Es werden aber normale Mengen an ATP ins Lumen abgegeben, die dort effektiv die Hemmung von ENaC und die Aktivierung von CaCC durch das P2Y₂ Purinrezeptor-Signal regulieren (BUTTON *et al.*, 2007; LAZAROWSKI *et al.*, 2004; OKADA *et al.*, 2006; WATT *et al.*, 1998). Das luminale ADO kann jedoch nicht die Chlorid-Ionen-Sekretion aktivieren und ENaC hemmen, da CFTR als Ziel des A_{2b}-Signals fehlt. Folglich ist das Epithel bei Mutationen im *CFTR*-Gen in zwei Punkten empfindlicher im Hinblick auf das ASL-Volumen und dessen Hydratation. Grundsätzlich haben Mukoviszidose-

Epithelien weniger ASL-Volumen als gesunde Epithelien und sie sind einzig vom ATP abhängig, um die Produktion eines ausreichenden ASL für den Mukustransport zu gewährleisten (BOUCHER, 2007). So können exogene Einflüsse, die mit einer Reduktion des ATP einhergehen, zu einem Zusammenbruch des Mukustransportes bei der Mukoviszidose führen (TARRAN *et al.*, 2005). Stress, beispielsweise in Form einer Infektion mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RSV), führt zu einer gesteigerten Metabolisierung des ATP durch Hochregulation von Ektoenzymen, sodass die ATP-Konzentration im ASL gesenkt wird und es folglich bei Mukoviszidose-Epithel zu der Ausbildung eines zähflüssigen Mukus kommt. Dies erklärt auch die klinische Beobachtung, dass Mukoviszidose-Patienten gegenüber viralen Infektion mit einer größeren Empfindlichkeit als Gesunde reagieren (ABMAN *et al.*, 1988). Nach Tarran spielt auch die phasische Bewegung der Lunge bei der In- und Expiration eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des ASL. Er konnte zeigen, dass unter Versuchsbedingungen, welche die phasische Bewegung der Lunge imitieren, vermehrt ATP in das ASL abgegeben wird, der Ionen-Transport bei Mukoviszidose-Epithel rebalanciert wird und das ASL-Volumen auf ein Maß wiederhergestellt wird, das eine natürliche Abwehrkraft der Lunge gestattet (TARRAN *et al.*, 2005). Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit des Einschlusses kompensatorischer Mechanismen in die Ionen-Transportvorgänge zur Aufrechterhaltung des ASL-Volumens wird gegeben, wenn man die Verteilung der Mukoviszidosebedingten Schädigungen innerhalb der Lunge betrachtet. Dabei fällt auf, dass der Phänotyp bei Mukoviszidose nicht homogen in der ganzen Lunge anzufinden ist, sondern bevorzugt die oberen Lungenlappen betroffen sind, während die unteren Lungenbereiche noch unverändert sein können (LONG *et al.*, 2004; TOMASHEFSKI *et al.*, 1985). Auch die Qualität der mukoziliären Clearance ist heterogen in der Lunge verteilt (DONALDSON *et al.*, 2006). An dieser Stelle stellt sich nun die Schlüsselfrage: Wie kann die Clearance und die Symptomatik heterogen in der Lunge verteilt sein, wenn doch der genetische Defekt des *CFTR*-Gens homogen die ganze Lunge betrifft (BOUCHER, 2007)? Eine Hypothese geht davon aus, dass in den unteren Lungenlappen bei normaler Atmung größere Strömungen herrschen, da auf Grund der Gravitationskraft dort mehr als zwei Drittel der Ventilation stattfinden (TARRAN *et al.*, 2005). In Folge dieser gesteigerten Belastung wird in den unteren Lungenbereichen vermehrt ATP ausgeschüttet, es kommt zu einer stärkeren P2Y₂-vermittelte Hemmung der Natrium-Ionen-Absorption, zu der Induktion der CaCC-vermittelten Chlorid-Ionen-Sekretion und damit zu einem relativen Anstieg des ASL-Volumens (BOUCHER, 2007).

LITERATURÜBERSICHT

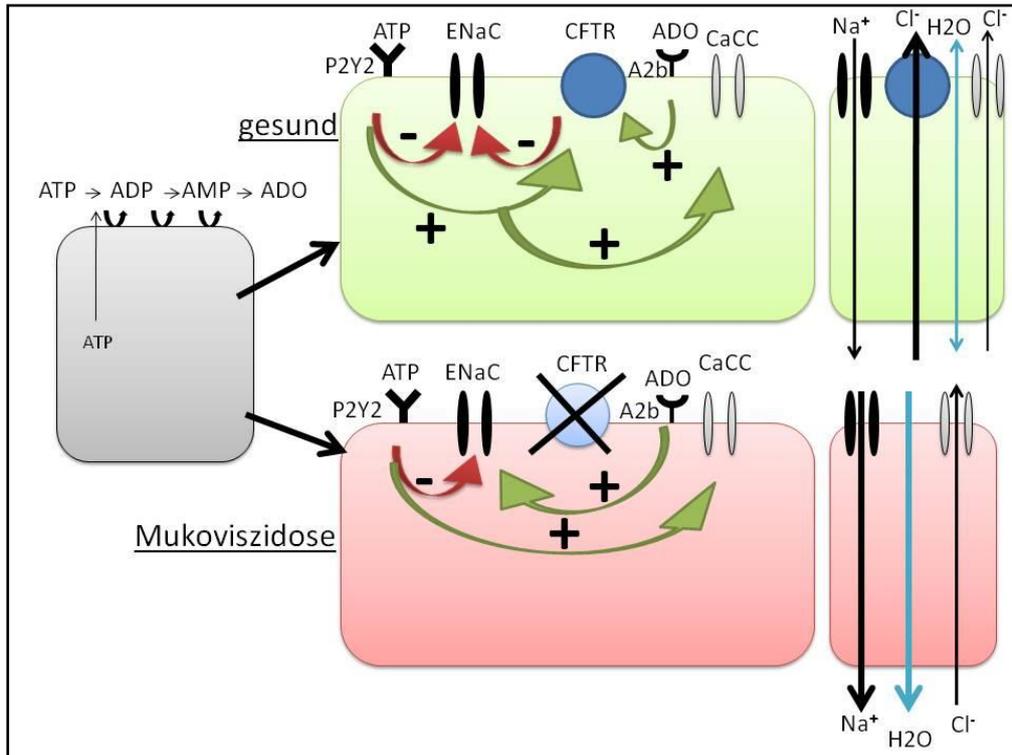


Abb. 1: Regulation der Volumenhomöostase des ASL durch ATP, modifiziert nach Boucher, 2007

Transport von ATP aus der Zelle und Metabolisierung über ADP und AMP zu ADO; gesunde Epithelzelle: Bindung von ATP an P2Y₂-Purinrezeptor, Chlorid-Ionen-Ausstrom über Aktivierung von CFTR und CaCC mit osmotisch folgender Wasserbewegung; gleichzeitige Hemmung des Natrium-Ionen-Einstromes über Hemmung von ENaC; ADO bindet an luminalen A_{2b} Rezeptor, der den cAMP-abhängigen CFTR-Kanal aktiviert und so zusätzlich den Chlorid-Ionen-Transport aus der Zelle stimuliert; Zusammenfassend führen hohe Konzentrationen von ATP und ADO in gesunden Epithelzellen der Atemwege zu einer Verflüssigung des ASL durch einen gesteigerten Chlorid-Ionen-Transport und einen gehemmten Natrium-Ionen-Transport. Epithelzelle bei Mukoviszidose: Bindung von ATP an den P2Y₂-Purinrezeptor führt zu einer Hemmung des ENaC und zu einer Aktivierung des CaCC, wobei der CFTR-Kanal als prominenter Chlorid-Ionen-Kanal fehlt; die Bindung des ADO an den A_{2b} Rezeptor kann bei fehlendem CFTR-Kanal nicht mehr aktivierend auf den Chlorid-Ionen-Transport wirken, stattdessen wird ENaC stimuliert. So führen hohe Konzentrationen von ATP und ADO bei fehlendem CFTR-Kanal zu einem gesteigerten Natrium-Ionen-Einstrom mit osmotisch folgender Wasserbewegung bei minimal ausgeprägtem Chlorid-Ionen-Ausstrom aus der Epithelzelle. ASL (engl. airway surface liquid), ATP (Adenosintri-phosphat), ADP (Adenosindiphosphat), AMP (Adenosinmonophosphat), ADO (Adenosin), CFTR (engl. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), CaCC (Kalzium-aktivierte Chloridleitfähigkeit), ENaC (epithelialer Natriumkanal)

2.1.3.9 Zusammenfassende Darstellung der Pathophysiologie der Mukoviszidose in der Lunge

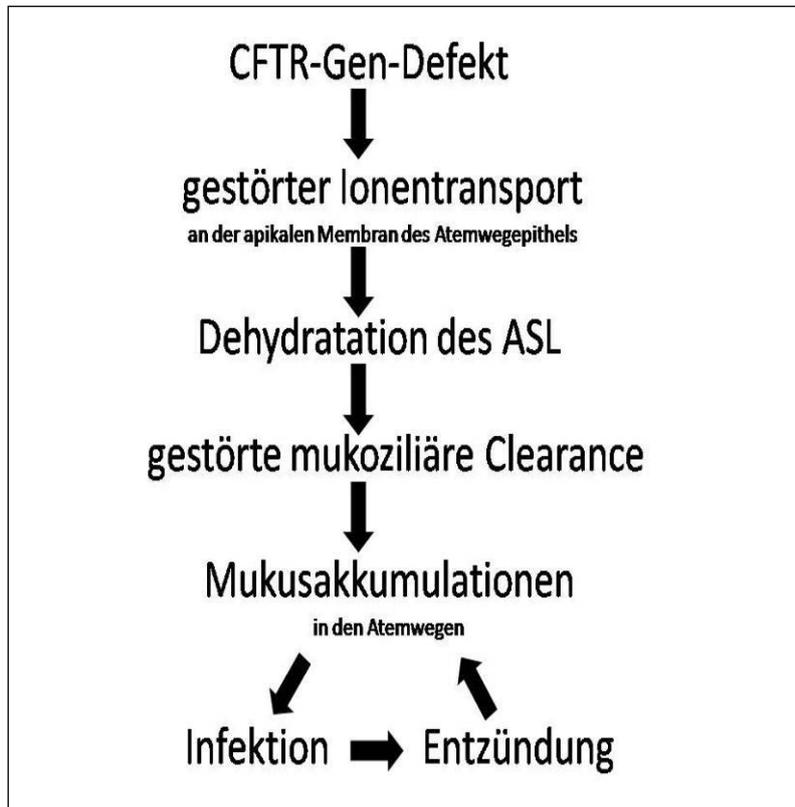


Abb. 2: Kaskade der Pathophysiologie der Mukoviszidose, modifiziert nach Ratjen, 2009

2.1.4 Diagnose

Eine frühzeitige Diagnose der Mukoviszidose ermöglicht einen frühzeitigen Therapiebeginn und verbessert folglich die Prognose für den Erkrankten, jedoch werden nur etwa 10 % der Mukoviszidose-Patienten bei der Geburt klinisch auf Grund eines Mekoniumileus erkannt. Die Mehrzahl der Patienten wird erst im Verlauf der Kindheit durch rezidivierende Atemwegsinfektionen und / oder Malnutrition auffällig. Heute erfolgt die Frühdiagnostik in der Regel fakultativ mit dem IRT-Test (immunreaktives Trypsin) mittels eines Enzymimmunoassays (LINDEMANN *et al.*, 2004), wobei erhöhte IRT-Werte im Blut auf eine mögliche Mukoviszidose hinweisen können (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Ein routinemäßiges Screening auf Mukoviszidose bei Neugeborenen erfolgt in Deutschland bislang jedoch noch nicht flächendeckend, wird allerdings bereits diskutiert (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Wird bei diesem Bluttest die Verdachtsdiagnose Mukoviszidose erhoben, so erfolgt anschließend eine Genanalyse mit der Sequenzierung des gesamten *CFTR*-Gens (PFORTE, 2002), die bei positivem Befund den Schweißtest nach sich zieht und die Enddiagnose Mukoviszidose

gestattet. Der Schweißtest stellt den Goldstandard bei der Diagnostik der Mukoviszidose dar, wobei die Konzentration der Chlorid-Ionen im Schweiß mittels Messung der elektrischen Leitfähigkeit bestimmt werden. Pilocarpin diffundiert dabei auf Grund eines langsam ansteigenden Gleichstromes von der Haut des Patienten zu dessen Schweißdrüsen, sodass eine starke Schweißsekretion induziert wird. Der austretende Schweiß wird aufgefangen und es erfolgt die Bestimmung der Chlorid-Ionen-Konzentrationen, wobei Konzentrationen von unter 40 mval/l als Normwerte gelten. Als eindeutig pathologisch gilt eine Chlorid-Ionen-Konzentrationen von über 60 mval/l bei Erwachsenen, bei Neugeborenen von über 90 mmol/l. Bereits pränatal kann der p.Phe508del Trägerstatus der Mutter bzw. des Vaters festgestellt werden und auch Chorionzottenbiopsien können auf Mutationen im *CFTR*-Gen untersucht werden (PFORTE, 2002).

2.1.5 Therapie und Prognose

Mukoviszidose ist noch immer nicht heilbar, sodass die Therapie zurzeit vor allem aus einer adäquaten symptomatischen Behandlung besteht. Die Lebenserwartung betrug im Jahr 1940 nur ein Jahr, im Jahr 1960 betrug die mittlere Überlebenszeit bereits zehn Jahre, 1995 lag sie bei dreißig Jahren und heute werden 4 von 10 Patienten bereits 40 Jahre alt (MÜLLER, 2003). Dabei steht insbesondere die frühzeitige Diagnose der Erkrankung im Vordergrund, da eine frühzeitige Behandlung einen signifikanten Einfluss auf die Lebenserwartung nimmt (MÜLLER, 2003). Therapeutisch nehmen Mukoviszidose-Patienten, die an Pankreasinsuffizienz leiden Pankreasenzyme und Vitamine ein, um die Verdauungsvorgänge zu unterstützen (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Der Therapieschwerpunkt bei der Lungensymptomatik wird momentan auf die Inhalation mit schleimlösenden, weitstellenden und antibiotisch wirksamen Substanzen gelegt. Ziel ist dabei die Verflüssigung des zähen Sekrets in den Atemwegen, die Rehydratation der Atemwegsoberflächen sowie die Bekämpfung bakterieller Infektionen (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Es konnte übereinstimmend mittels *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden, dass eine Steigerung der Rehydratation der Atemwege zu einer deutlichen klinischen Verbesserung der Mukoviszidose führen kann (DONALDSON *et al.*, 2006; ELKINS *et al.*, 2006). Dabei wurden therapeutische Versuche mit aerosolisierten hypertonen Salzen durchgeführt (DONALDSON *et al.*, 2006; ELKINS *et al.*, 2006). Die inhalierten Salze riefen dabei eine transiente Hypertonizität der Atemwegsoberfläche hervor und provozierten so eine osmotische Rehydrierung. Bei einer viermal täglichen Inhalation verbesserte sich bereits nach zwei Wochen der Mukutransport, die Lungenfunktion und folglich die Lebensqualität der

Probanden. Der positive Effekt basierte dabei auf der Wiederherstellung der Höhe des ASL (PROESMANS *et al.*, 2008). Zusätzlich zu der Inhalationstherapie kann der Schleim mit Hilfe physiotherapeutischer Behandlungen aus den Atemwegen mobilisiert werden (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Auch sportliche Betätigungen in Form von Ausdauer- und Kraftsport können einen guten therapeutischen Beitrag leisten, indem sie die Lungenfunktion und Muskulatur des Patienten stärken (REINHARDT und KRAEMER, 2001). Eine Lungentransplantation sollte bei Patienten im Endstadium ebenfalls als therapeutische Option in Betracht gezogen werden, wobei die Wahl des optimalen Transplantationszeitpunktes sehr schwierig ist. Das zur Verfügung stehende Zeitfenster ist sehr klein. Eine zu frühe Transplantation verkürzt die verbleibende Lebenszeit, wohingegen ein zu spät gewählter Zeitpunkt dazu führen kann, dass der schwer erkrankte Patient auf Grund eines Mangels an Spenderorganen auf der Warteliste verstirbt (PROESMANS *et al.*, 2008).

2.1.5.1 **Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten**

Im Mausmodell „ENaC-tg“ (2.2.2) gibt es erste Erfolge hinsichtlich der Inhalationstherapie mit Amilorid (MALL, 2009). Dabei zeigen Mäuse, denen ab den ersten Tagen nach der Geburt Amilorid in die Lunge gesprüht wurden keine Mukusakkumulation in den Bronchien. Auch Entzündungen und chronische Lungenschädigungen bleiben nach Amilorid-Inhalation im Mausmodell aus. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine präventive Therapie der Mukoviszidose im Mausmodell möglich ist. Amilorid hemmt dabei die „hyperaktiven“ epithelialen Natriumkanäle (ENaC), in dessen Folge sich das ASL-Volumen verbessert und Lungenschäden verhindert werden können. Jedoch ist dieses nur der Fall, wenn Amilorid bereits vor der Manifestation der Symptome verabreicht wird. Auf bereits bestehende Symptome nimmt die pulmonale Applikation von Amilorid im Mausmodell keinen Einfluss mehr (PONS *et al.*, 2000), scheinbar begründet in der kurzen Halbwertszeit und geringen Potenz des Amilorids (HIRSH *et al.*, 2008). Möglicherweise deutet das Ausbleiben eines therapeutischen Effektes bei manifestierter Symptomatik auch auf die Irreversibilität der Lungenveränderungen hin (MALL, 2009). Nach Mall könnte Amilorid jedoch eine vorbeugende Therapie der Mukoviszidose darstellen, die direkt am Basisdefekt angreift (MALL, 2009). Eine Studie an neonatalen ENaC-tg Mäusen identifizierte bei dreimaliger intranasaler Applikation von Amilorid über einen Zeitraum von zwei Wochen beginnend am ersten Lebenstag eine Senkung der spontanen, Lungen-bedingten Mortalität um 70 % sowie eine signifikante Abnahme der Mukusakkumulation in den Atemwegen, der Becherzellmetaplasie, der Mukushypersekretion, der Epithelzellnekrose in den Atemwegen und der Entzündungs-

reaktion in der Lunge (ZHOU *et al.*, 2008). Die Voraussetzung für einen effektiven Einsatz des Natriumkanal-Blockers Amilorid ist allerdings die frühzeitige Identifikation der Patienten und damit ein frühzeitiger Therapiebeginn, da es sich bei der ASL-Depletion um ein perinatales und damit sehr frühes Ereignis handelt (MALL, 2009). Hier wird die enorme Wichtigkeit eines zuverlässigen Frühtests deutlich, da sich die Symptome der Mukoviszidose oft erst nach einigen Jahren zeigen.

2.2 Murine Mukoviszidose-Modelle

Zellkulturen gestatten der Forschung die Durchführung einer Vielzahl wichtiger Studien auf dem Feld der Mukoviszidose. Jedoch fehlt ihnen die Komplexität intakter Organe. Daher sind Tiermodelle bei der näheren Untersuchung der Pathogenese und neuer Therapieansätze der Mukoviszidose unerlässlich (SCHOLTE *et al.*, 2004). Nachdem das *CFTR*-Gen im Jahr 1989 identifiziert werden konnte (RIORDAN *et al.*, 1989) liefen die ersten Versuche an, ein Mausmodell mit Mutation im *CFTR*-Gen zu generieren. Ermöglicht wurde dieses mit einer neu entwickelten Technik, die die homologe Rekombination muriner embryologischer Stammzellen nutzte, um eine gezielte Mutation in das Genom der Maus zu induzieren (LEDERMANN, 2000). Anschließend wurden diese Stammzellen in Blastozysten injiziert und so die ersten chimären Mäuse produziert, die wiederum Grundlage für einen mutierten Stamm bildeten, der die Mutation weitergeben konnte (SCHOLTE *et al.*, 2004).

2.2.1 CFTR-Modelle

2.2.1.1 CFTR-Knock-out-Modelle

Die ersten Mausmodelle für die Mukoviszidose wurden mit einem vollständigen Funktionsverlust des *CFTR*-Gens generiert, in dem eine „Ersatz-Strategie“ (engl. *replacement strategy*) zu dessen Unterbrechung genutzt wurde (SCHOLTE *et al.*, 2004). Diese vollständigen Knock-out-Modelle, die sich durch die fehlende Produktion einer nachweisbaren Menge an *CFTR*-mRNA auszeichnen, wurden von verschiedenen Forschungsgruppen entwickelt. Darunter waren beispielsweise die Gruppen aus North Carolina, deren Modell *CFTR*^{tm1Unc} durch ein Stopcodon im Exon 10 gekennzeichnet war (SNOUWAERT *et al.*, 1992), Cambridge, wobei bei deren Modell *CFTR*^{tm1Cam} das Exon 10 ausgetauscht wurde (RATCLIFF *et al.*, 1993), Toronto mit einer Unterbrechung im Exon 1 bei Modell *CFTR*^{tm1Hsc} (ROZMAHEL *et al.*, 1996) und Baylor mit Modell *CFTR*^{tm3Bay}, das durch einen Austausch des Exon 2 gekennzeichnet war (HASTY *et al.*, 1995). Zusätzlich wurden sogenannte „Rest-Funktionsmodelle“ durch Insertion entwickelt, die trotz der Unterbrechung des *CFTR*-Gens

eine Restmenge an CFTR-mRNA produzieren, beispielsweise durch Forschungsgruppen aus Edinburgh mit einer Insertion in Exon 10 (CFTR^{tm1Hgu}); (DORIN *et al.*, 1992) und Baylor mit einer Duplikation des Exon 3 (CFTR^{tm1Bay}); (O'NEAL *et al.*, 1993). In allen diesen Modellen konnten die mutierten Tiere durch ihren bioelektrischen Phänotyp identifiziert werden und leisteten damit einen fundamentalen Beitrag zu der klassischen Charakterisierung der Mukoviszidose des Menschen (DAVIDSON und DORIN, 2001; GRUBB und BOUCHER, 1999). Zwischen den einzelnen Modellen zeigten sich jedoch Unterschiede in deren bioelektrischen Eigenschaften und den organspezifischen Phänotypen, die in einigen Fällen auf deren jeweilige Mutation zurückgeführt werden konnten.

2.2.1.2 CFTR-Modelle mit spezifischen Mutationen

Daraufhin wurden neue Mausmodelle mit spezifischen, klinisch relevanten *CFTR*-Mutationen entwickelt. Die häufigste Mutation ist die p.Phe508del (früher $\Delta F508$) -Deletion, bei der die Aminosäure Phenylalanin an Stelle 508 fehlt und es folglich zu einer fehlerhaften intrazellulären Signalübertragung mit Produktion einer hohen Menge des mutierten CFTR-Proteins kommt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das mutierte Protein funktional sein kann, wenn es die Plasmamembran erreicht (SCHOLTE *et al.*, 2004). Durch diese Erkenntnis ergeben sich neue Therapieansätze für die Mukoviszidose, indem entweder die intrazelluläre Degradierung verhindert oder aber der Transport zur Plasmamembran verbessert wird. Daraufhin wurden drei verschiedene Modelle mit einer p.Phe508del-Deletion generiert. Bei den Modellen CFTR^{tm2Cam} (COLLEDGE *et al.*, 1995) und CFTR^{tm1Kth} (ZEIHER *et al.*, 1995) wurde dieses ermöglicht, indem eine Exon 10 betreffende Ersatz-Strategie genutzt wurde, bei der ein selektiver Marker in eines der Introne eingebaut wurde. Dabei führte das eingebaute Marker-Gen zu einer Beeinflussung der Transkriptionsaktivität des mutierten Allels, jedoch wurde die Proteinproduktion davon nicht beeinflusst (SCHOLTE *et al.*, 2004). CFTR^{tm1Eur} als drittes Modell verfügte nur über ein mutiertes Exon, wobei die Transkriptionsaktivität dieses mutierten Allels identisch zu der des normalen Allels ist (FRENCH *et al.*, 1996; VAN DOORNINCK *et al.*, 1995). Auch für die humanen Mutationen G480C und G551D wurden durch Insertion von G480C in Exon 10 (CFTR^{tm2Hgu}) bzw. durch Ersatz des Exon 11 (CFTR^{tm1G551D}) Mausmodelle entwickelt (DELANEY *et al.*, 1996; DICKINSON *et al.*, 2002), die zusammen mit den vielfältigen Modellen für Mukoviszidose relevante *in vivo* Systeme für weitere klinische Prüfungen darstellen.

2.2.1.3 Phänotypen der CFTR-Modelle

2.2.1.3.1 Intestinaler Phänotyp

Der intestinale Phänotyp ist die prominenteste Eigenschaft der Mausmodelle, wobei der Charakter des Phänotyps im Modell vergleichbar mit dem des Menschen ist. Die Knock-out-Tiere werden den Mendelschen Regeln folgend geboren, sterben jedoch oft frühzeitig mit den Anzeichen intestinaler Obstruktionen (SCHOLTE *et al.*, 2004). Zwischen den unterschiedlichen Modellen schwankt der Schweregrad der intestinalen Symptome erheblich. Dabei gibt es Modelle mit geringer Ausprägung und Mortalität, wie beispielsweise CFTR^{tm1Eur} und CFTR^{tm2Hgu}, aber auch Modelle mit schwerwiegenden intestinalen Obstruktionen und einer Mortalität von 95 % bei CFTR^{tm1Unc}, CFTR^{tm1Cam} und CFTR^{tm2Cam} (DAVIDSON und DORIN, 2001). Das Modell CFTR^{tm1G551D} zeigt interessanterweise einen weniger stark ausgeprägten intestinalen Phänotyp als die Knock-out-Modelle, wobei auch bei der humanen Mutation G551D ein reduziertes Vorkommen des Mekoniumileus beobachtet werden konnte (DELANEY *et al.*, 1996; HAMOSH *et al.*, 1992). Neben den intestinalen Obstruktionen zeigen Mukoviszidose-Mäuse ein reduziertes Körpergewicht in unterschiedlich starker Ausprägung, begründet in einer gestörten Lipolyse und einer verminderten Resorptionsfähigkeit des Darmes für Fettsäuren (BIJVELDS, 2003).

2.2.1.3.2 Pankreatischer Phänotyp

Pankreasinsuffizienz stellt eines der Hauptprobleme von Mukoviszidose-Patienten dar, konnte jedoch in den meisten Maus-Modellen nicht entsprechend gezeigt werden (SCHOLTE *et al.*, 2004). In einer Studie an CFTR^{tm1Unc}-Mäusen konnte eine Dilatation des Lumens und eine Einlagerung von Zymogengranula in den apikalen Polen duktaler Epithelzellen nachgewiesen werden (DE LISLE, 1995). Anhand dieses Phänotyps konnten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Rolle diätetischer Fettsäuren bei der Mukoviszidose durchgeführt werden (FREEDMAN *et al.*, 1999). Begründet liegt der weniger ausgeprägte Phänotyp des Pankreas möglicherweise in der generell geringeren Expression von CFTR in der murinen Bauchspeicheldrüse. Auch das Vorhandensein einer alternativen Chloridleitfähigkeit im Pankreas, die durch intrazellulären Calcium-Anstieg aktiviert wird, kommt ursächlich für den weniger stark ausgeprägten Phänotyp in Frage (GRAY *et al.*, 1995).

2.2.1.3.3 Hepatischer Phänotyp

Das Epithel der Gallenblase bei Maus und Mensch exprimiert CFTR und ist in den iso-osmotischen Wassertransport integriert (SCHOLTE *et al.*, 2004). Der cAMP-abhängige Transport

von Chlorid-Ionen mit osmotisch folgender Flüssigkeitsbewegung fehlt in dem Gallenblasenepithel von CFTR-Knock-out-Mäusen, wohingegen die Resorption normal verläuft (PETERS *et al.*, 1997). Möglicherweise finden ähnliche Bedingungen in den intrahepatischen Gallengängen von Mukoviszidose-Patienten statt und gestatten so die Erklärung der typischen Gallengangsobstruktionen und -zirrhose bei Mukoviszidose-Patienten (CASTALDO *et al.*, 2001; KINNMAN *et al.*, 2000).

2.2.1.3.4 Vas deferens-Dysfunktion

Männliche Mukoviszidose-Patienten leiden unter Unfruchtbarkeit, da bei ihnen beidseits die Samenleiter bzw. das Samenleiterepithel nicht ausgebildet wird, für dessen vollständige Funktion CFTR benötigt wird (SCHOLTE *et al.*, 2004). Auch mutierte männliche CFTR-Mäuse zeigen eine hochgradig reduzierte Fertilität, wobei Verlegungen mit Mukus und der vollständige Zusammenbruch der Samenleiter in homozygoten knock-out-Tieren der Modelle CFTR^{tm1Eur} und CFTR^{tm1Cam} beobachtet werden konnten (REYNAERT *et al.*, 2000). Jedoch zeigten diese Tiere nicht in Homologie zum Menschen das vollständige Fehlen der Samenleiter, wie es sogar bereits bei sehr milden CFTR-Dysfunktionen vorkommt (GILLJAM *et al.*, 2004).

2.2.1.3.5 Pulmonaler Phänotyp

Die progressive Erkrankung der Lunge ist bei Mukoviszidose-Patienten für etwa 95 % der Morbidität und Mortalität verantwortlich. Zugrunde liegt dabei die erhöhte Infektanfälligkeit der Lunge gegenüber verschiedenen Erregern, wobei vor allem die chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* von großer klinischer Bedeutung ist (PARAD *et al.*, 1999). Bei der Charakterisierung der verschiedenen Maus-Modelle hinsichtlich ihrer Lungenveränderungen konnten in keinem Modell schwerwiegende Beeinträchtigungen der Lunge festgestellt werden. Möglicherweise liegt das begründet in der fehlenden Beteiligung bakterieller, pathogener Erreger im Maus-Modell (SCHOLTE *et al.*, 2004). Histologisch konnten jedoch auch ohne scheinbare Infektion der Lunge Veränderungen ermittelt werden. Dabei zeigten CFTR^{tm1Hgu}-Mäuse exzessive Entzündungsvorgänge (ZAHM *et al.*, 1997). Eine abnormale mukoziliäre Clearance konnte bei CFTR^{tm1Hgu} und CFTR^{tm1Unc}-Mäusen gezeigt werden (COWLEY *et al.*, 1997; ZAHM *et al.*, 1997) sowie eine erhöhte Becherzellzahl in Verbindung mit einer reduzierten Menge an ASL des Nasenepithels im Modell CFTR^{tm1Unc} (TARRAN *et al.*, 2001b) und eine weiter nach distal reichende Ausdehnung submuköser Drüsen in den Atemwegen in den Modellen CFTR^{tm1Hgu} und CFTR^{tm1G551D} (BORTHWICK *et al.*, 1999). Diese Entdeckungen er-

wecken den Eindruck, dass subtilere Phänotypen als sekundäre Folge der *CFTR*-Mutation stattfinden, die möglicherweise die ersten Stadien der Erkrankung widerspiegeln (SCHOLTE *et al.*, 2004). Der problematischste Phänotyp, der im Mausmodell etabliert werden sollte, ist die pulmonale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Im Gegensatz zu der Mukoviszidose-Lungenerkrankung des Menschen konnte in verschiedenen *CFTR*-Modellen keine unnormale Antwort auf die Pathogene festgestellt werden (CRESSMAN *et al.*, 1998; MCCRAY *et al.*, 1999). Trotz einiger Ähnlichkeiten zwischen der Mukoviszidose-Lungenerkrankung des Menschen und Veränderungen im Maus-Modell gibt es signifikante Unterschiede, sodass *CFTR*-Modelle zur Zeit keine idealen Modelle für den Lungenphänotyp der Mukoviszidose darstellen (SCHOLTE *et al.*, 2004). Trotzdem konnten einige der beschriebenen Modelle bereits als *in vivo* Systeme zur Prüfung neuer therapeutischer Ansätze genutzt werden (KOEHLER *et al.*, 2003; VAN HEECKEREN *et al.*, 2004).

2.2.1.4 Beurteilung der *CFTR*-Modelle bei dem Lungenphänotyp der Mukoviszidose

Die *CFTR*-Mausmodelle zeigen hinsichtlich ihres Lungenphänotyps teilweise deutliche Unterschiede zu der Lungensymptomatik beim Menschen, sodass sich die bestehenden *CFTR*-Modelle nicht als optimal geeignete Modelle zur Darstellung und weiteren Erforschung des Mukoviszidose-Lungenphänotyps erweisen (SCHOLTE *et al.*, 2004).

2.2.2 ENaC-transgene Mäuse

Nachdem sich die verschiedenen murinen *CFTR*-Modelle als suboptimal bei der Ausbildung des Mukoviszidose-Lungenphänotyps darstellten, gelang es der Arbeitsgruppe um Mall mit dem „ENaC-Modell“ ein Maus-Modell zu entwickeln, das den Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp ausbildet (MALL *et al.*, 2004). Dieses Mausmodell wurde durch Mikroinjektion einer Expressionskassette mit dem CCSP (engl. *Clara cell secretory protein*) Promoter-Element der Ratte und den codierten Regionen für die drei Untereinheiten α , β oder γ des ENaC in einem pTG1-Vektor in befruchtete C3H x C57BL/6 (C3B6) F1-Oozyten generiert (MALL *et al.*, 2004). Die Gründertiere wurden mit C3B6-Mäusen verpaart und so unabhängige transgene Linien der drei Untereinheiten entwickelt. Die hier vorgestellten Mäuse zeichnen sich durch eine atemwegsspezifische Hyperexpression der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (β -ENaC) aus, die mit einer gesteigerten Natrium-Absorption des Atemwegsepithels einhergeht. In der Folge kommt es nun im Mausmodell zu der Mukoviszidose-typischen Dehydratation des ASL mit einer Abnahme der mukoziliären Clearance. Dabei zeigen die Mäuse die Mukoviszidose-typischen Lungensymptome wie Mukusakkumulation in

den Atemwegen, Becherzellmetaplasie, chronische Entzündungsreaktionen in den Atemwegen, verminderte Abwehr gegenüber bakteriellen Noxen und eine hohe Sterblichkeitsrate, bedingt durch die ausgeprägte Lungensymptomatik (MALL *et al.*, 2004; MALL, 2008).

2.2.2.1 Mukusobstruktion

Bei den neonatalen β -ENaC-tg Mäusen zeigten sich ausnahmslos als sehr frühe Anzeichen Mukusobstruktionen in der Trachea, wobei weder eine Becherzellmetaplasie noch eine gesteigerte Expression der Muzingene detektiert werden konnte (MALL *et al.*, 2008). Mall schlussfolgerte daraufhin, dass die Mukusobstruktionen in Folge einer verminderten Clearance bei basaler Schleimsekretion auftraten. So konnte mit diesem Modell gezeigt werden, dass die alleinige ASL-Depletion ohne eine gesteigerte Sekretion von Mukus zu Mukusobstruktionen mit Beeinträchtigung der Luftzirkulation, systemischer Hypoxie und hoher Sterblichkeitsrate führen kann. Auch bei Mukoviszidose-Patienten treten Mukusobstruktionen unabhängig von Becherzellmetaplasien als sehr frühe Anzeichen der Erkrankung auf (ZUELZER und NEWTON, 1949).

2.2.2.2 Epithelzellschwellung und -nekrose

In den Atemwegen der neonatalen β -ENaC-tg Mäuse konnte eine sehr früh auftretende Schwellung und Nekrose der Epithelzellen identifiziert werden (MALL *et al.*, 2008). Nach Mall liegt vermutlich ein intrazellulärer Sauerstoffmangel zu Grunde, der einerseits durch den erhöhten Sauerstoffbedarf der Epithelzellen in Folge der gesteigerten Natriumabsorption, andererseits durch eine verminderte Sauerstoffversorgung in Folge der Mukusobstruktionen in den Atemwegen hervorgerufen wurde (MALL, 2009). Möglicherweise werden die Entzündungsreaktionen in den Atemwegen sowohl bei den β -ENaC-tg Mäusen als auch bei jungen Mukoviszidose-Patienten bei fehlenden bakteriellen Infektionen durch die Epithelzellnekrosen induziert, die als Folge der gesteigerte Natrium-Absorption ausgelöst werden (MALL, 2009), da Nekrosen potente Auslöser von Entzündungsreaktionen darstellen können (CHEN *et al.*, 2007).

2.2.2.3 Allergische Entzündungsreaktion

In juvenilen β -ENaC-tg Mäusen konnte Mall neben einer chronischen neutrophilen Entzündung eine vorübergehende, allergische Atemwegsentszündung mit deutlicher Eosinophilie und einer gesteigerten Expression von Interleukin-13 als Signalmolekül für T2-Helferzellen identifizieren (MALL *et al.*, 2008). Dabei könnte die in Folge der ASL-Depletion reduzierte

Clearance von inhalierten Partikeln mit allergischem Potential ursächlich zugrunde liegen, wobei auch Mukoviszidose-Patienten häufig allergische Entzündungen der Atemwege entwickeln, beispielsweise die allergische bronchopulmonale Aspergillose (MALL, 2009).

2.2.2.4 **Emphyseme**

Die β -ENaC-transgenen Mäuse wiesen in der Lunge deutliche Emphyseme mit vergrößerten Lufträumen in den distalen Bereichen sowie eine gesteigerte Lungencompliance auf (MALL *et al.*, 2008). Nach Mall kommen verschiedene Mechanismen für die Ausbildung der Emphyseme in Frage, beispielsweise Defekte in den Alveolarsepten, das Einfangen von Luft in der Lunge in Folge der Mukusobstruktionen in den Atemwegen (engl. *air trapping*), wobei es zu einer Überdehnung der distalen Lufträume kommt (MALL, 2009) und der proteolytische Abbau der Alveolarwände in Folge eines Ungleichgewichtes zwischen Proteasen und Anti-proteasen, hervorgerufen durch chronische Entzündungsreaktionen in der Lunge (CHURG und WRIGHT, 2005). Auch in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten finden sich Emphyseme in Zusammenhang mit Mukusobstruktionen als stetige, früh auftretende Krankheitssymptome (ZUELZER und NEWTON, 1949).

2.2.2.5 **Erhöhte Sterblichkeitsrate**

Neugeborene β -ENaC-transgene Mäuse zeigten mit 50 % eine deutlich erhöhte Sterblichkeitsrate, beginnend ab dem dritten Lebenstag bis zur vollendeten zweiten Lebenswoche, wobei Asphyxie durch die Verlegung des Kehlkopfes und der Trachea mit Mukus sowie eine erhöhte Schleimmenge als Todesursache diskutiert wurden (MALL *et al.*, 2008).

2.2.2.6 **Muzingenexpression**

Mall und Mitarbeiter bestimmten in den Lungen von β -ENaC-transgenen Mäusen die Expression der Muzingene *muc5ac*, *muc5b* und *muc4* sowie den Becherzellmarker *mCLCA3*, um deren Zusammenhang mit den Mukusobstruktionen und der Becherzellmetaplasie zu untersuchen (MALL *et al.*, 2008). Als Kontrollgruppe dienten Wurfgeschwister des Genotyps ENaC-wt, die im Alter von einer Woche eine signifikant erhöhte Expression von *Muc5ac* und *mCLCA3* sowie im Alter von drei Wochen eine signifikant erhöhte Expression von *Muc5b* und *Muc4* im Vergleich zu neugeborenen Mäusen zeigten. Die β -ENaC-transgenen Mäuse zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Muzingenexpression mit signifikant erhöhten Werten gegenüber den Wildtyp-Kontrolltieren in einem Alter von drei Wochen.

2.2.2.7 Zeitlicher Verlauf der Ausprägung Mukoviszidose-typischer Symptome

Um den zeitlichen Verlauf der Entwicklung Mukoviszidose-typischer Symptome zu verfolgen, untersuchten Mall und Mitarbeiter verschiedene Altersgruppen: fetale (18,5 Trächtigkeitstage), neugeborene (0,5 Lebenstage), neonatale (3,5 Lebenstage), juvenile (1-3 Lebenswochen) und adulte Tiere in einem Alter von 6 Lebenswochen (MALL *et al.*, 2008), wobei die Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle dargestellt wurden (Tabelle 1). Die Neugeborenen und Neonatalen unterlagen dabei einer mit 50 % deutlich erhöhten Sterblichkeitsrate in Folge von Asphyxie durch Mukusobstruktionen des Kehlkopfes und der Trachea, ohne jedoch gleichzeitig Mukusobstruktionen in der Lunge und Becherzellhyperplasien zu zeigen. Bei den überlebenden juvenilen Tieren dehnten sich die Mukusobstruktionen im Alter von zwei Wochen bis in die Lunge aus, wobei vor allem die Hauptbronchien, aber auch kleinere Atemwege betroffen waren. Diese Veränderungen blieben auch bei den adulten Tieren bestehen. Wohingegen die frühen Mukusobstruktionen der Trachea ohne begleitende Becherzellhyperplasie auftraten, fanden sich nun signifikant erhöhte Becherzellzahlen in den Hauptbronchien und den kleineren Bronchien. Zeitgleich mit der im Lebensalter von zwei Wochen einsetzenden Becherzellhyperplasie konnte die Ausbildung einer Epithelzellhypertrophie mit Zunahme der Epithelhöhe detektiert werden, die auch bei den Adulten bestehen blieb. Die Höhe der Expression der Muzingene *muc5ac*, *muc5b* und *muc4* sowie des Becherzellmarkers *mCLCA3* folgten dem altersabhängigen Verlauf der Kontrolltiere, wobei signifikante Unterschiede in deren Ausprägung bei den β -ENaC-transgenen Mäusen gegenüber den ENaC-wt-Tieren identifiziert wurden.

Tabelle 1: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Ausprägung Mukoviszidose typischer Symptome nach (MALL *et al.*, 2008)

	Mukus-obstruktion		Becherzell-hyperplasie	Epithel-zell-hyper-trophie	Epithel-zell-nekrosen	Muzingenexpression gegenüber ENaC-Wildtyp-Mäusen			
	Trachea	Lunge				<i>muc5ac</i>	<i>muc5b</i>	<i>muc4</i>	<i>mCLCA3</i>
Fetal	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	-	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Neugeboren	+	-	-	-	+	→	→	↑	→
Neonatal	+	-	-	-	++	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Juvenil	+	+	+	+	+	↑	↑	↑	↑
Adult	+	+	+	+	+	↑	↑	↑	↑

„+“ kennzeichnet das Auftreten des Merkmals in der jeweiligen Altersstufe. „++“ signalisiert die Altersstufe mit der maximalen Ausprägung des Merkmals. „-“ kennzeichnet das Fehlen der Merkmalsausprägung in der jeweiligen Altersstufe. → stellt eine gleichbleibende Gen-Expression gegenüber ENaC-Wildtyp-Mäusen dar, wohingegen ↑ eine erhöhte Expression signalisiert. ↑ zeigt eine signifikante Erhöhung der Expression gegenüber den ENaC-Wildtyptieren an. „k.A.“ = keine Angabe in der Literatur in dieser Altersgruppe.

2.3 Die Rolle von Modulatorgenen bei der Mukoviszidose

Da sich der Schweregrad der Lungenerkrankung bei der Mukoviszidose zwischen Patienten mit gleichen genetischen Mutationen und gleichen Lebensbedingungen stark unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass neben der Mutation des *CFTR*-Gens andere modulierende, genetische Faktoren von erheblicher Bedeutung für die klinische Ausprägung insbesondere der Lungensymptomatik sind (KOCH *et al.*, 2001). Die Identifizierung dieser Faktoren ist ausschlaggebend für die Entwicklung von Therapien und anderen Eingriffsmöglichkeiten, um die Morbidität und Mortalität dieser Erkrankung zu senken. Dabei erfolgte die Auswahl der zu testenden Kandidaten entweder auf Grund ihrer Funktion in den Signalwegen der Erkrankung oder weil sie bei ähnlichen Erkrankungen bereits als Modulatoren identifiziert werden konnten (COLLACO und CUTTING, 2008). Diverse veröffentlichte Studien haben vor allem Gene, die bei Immun- und Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, in Zusammenhang mit der Mukoviszidose untersucht, unter anderem den Transforming growth factor β 1 (TGFB1), der mit seinen Funktionen als Zytokin und Mediator den Schweregrad und die Entwicklung fibrotischer Lungenerkrankungen (AWAD *et al.*, 1998; XAUBET *et al.*, 2003),

von Asthma (LI *et al.*, 2007; MAK *et al.*, 2006; PULLEYN *et al.*, 2001) und COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*); (CELEDON *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2004) modifiziert. Einen weiteren möglichen Modulator der Mukoviszidose stellt das Mannose-bindende Lektin 2 (MBL2) dar, wobei es eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität einnimmt, indem die Phagozytose in infektiösen Geweben gefördert wird (EISEN und MINCHINTON, 2003). Polymorphismen im Bereich des *MBL2*-Gens sind mit einer unterschiedlich hoch ausgeprägten Produktion von MBL assoziiert (BOUWMAN *et al.*, 2006), wobei ein MBL-Mangel mit einem erhöhten Auftreten von Infektion, inklusive Pneumonien und Sepsis und somit mit einer verminderten Lungenfunktion verknüpft ist (EISEN und MINCHINTON, 2003). Auch der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) als inflammatorisches Zytokin konnte in verschiedenen Metaanalysen mit der Entstehung von Asthma (CASTROGINER *et al.*, 2008) und COPD (HU *et al.*, 2007) assoziiert werden. Polymorphismen führen zu einer unterschiedlich hohen Produktion von TNF α , wobei höhere TNF α -Konzentrationen im Sputum von Mukoviszidose-Patienten mit einer verminderten Lungenfunktion assoziiert sind (GREALLY *et al.*, 1993). Die Rolle der TNF α -Varianten ist jedoch bislang auf Grund mangelnder Replikation unklar (COLLACO und CUTTING, 2008). Weiterhin werden α_1 -Antitrypsin (DORING *et al.*, 1994; DRUMM *et al.*, 2005), Glutathion S-Transferase M1 (BARANOV *et al.*, 1996; DRUMM *et al.*, 2005) und Glutathion S-Transferase P1 (FLAMANT *et al.*, 2004) sowie der β -Adrenergic Rezeptor (ADR β 2) (DRUMM *et al.*, 2005; STEAGALL *et al.*, 2007) als mögliche Modulatoren diskutiert. Neben diesen genannten Faktoren wird eine Calcium-aktivierte Chloridleitfähigkeit als Modulator des Schweregrads der Mukoviszidose diskutiert (CLARKE *et al.*, 1994; GRAY *et al.*, 1994; ROZMAHEL *et al.*, 1996; WILSCHANSKI *et al.*, 1996), die den Defekt des CFTR-Kanals zu mindestens zum Teil kompensieren könnte. Die molekulare Identität dieser „alternativen“ Chloridleitfähigkeit ist bislang ungeklärt. Zahlreiche Gene werden als direkte Kandidaten (z.B. TMEM16A, TMEM16F (ROCK *et al.*, 2009), mBest1, mBest2 (BARRO-SORIA *et al.*, 2008) diskutiert. Weiterhin werden Gene diskutiert, die indirekt beispielsweise als Signalmoleküle diese „alternative“ Chloridleitfähigkeit beeinflussen können. Zu diesen gehören Mitglieder der CLCA-Genfamilie, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.3.1 Die Mitglieder der CLCA-Genfamilie und ihre Rolle als Modulatoren der Mukoviszidose

Die CLCA-Proteine stellen eine große Familie dar, laut NCBI Gen-Datenbank bei mindestens 30 verschiedenen Spezies (WHEELER *et al.*, 2008). Auf Grund der Vielzahl der Mitglieder

der Genfamilie und der unterschiedlichen Arbeitsgruppen, die an deren Erforschung arbeiteten, bestand bei der CLCA-Genfamilie lange Zeit eine uneinheitliche Nomenklatur, die jedoch nach einem einheitlichen Schema weitgehend vereinfacht werden konnte (GRUBER *et al.*, 2000). CLCA stand ursprünglich für „chloride channel, calcium-activated“. Da *in vitro* nach heterologer Transfektion von Säugetierzelllinien eine Calcium-aktivierbare Chloridleitfähigkeit gemessen wurde, ging man ursprünglich davon aus, dass es sich um echte Kanalproteine handelt (GRUBER *et al.*, 2000). Jüngere biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich um vollständig sezernierte Proteine (GIBSON *et al.*, 2005; HAMANN *et al.*, 2009; MUNDHENK *et al.*, 2006; PLOG *et al.*, 2009) oder membranständige Proteine mit einer carboxyterminalen Transmembrandomäne handelt (BOTHE *et al.*, 2008; ELBLE *et al.*, 2006; PLOG *et al.*, 2012). Mitglieder der CLCA-Genfamilie bilden keine eigenständigen Kanäle, scheinen aber in der Lage zu sein, andere, bislang molekularbiologisch nicht identifizierte Chloridkanäle zu modulieren (HAMANN *et al.*, 2009; LOEWEN *et al.*, 2004), so dass neuerdings der Begriff „*calcium-activated chloride channel regulator*“ genutzt wird. Das Präfix bei den einzelnen Mitgliedern steht für die jeweilige Spezies: h für human, m für murin, p für porzin, e für equin, etc. Da in einer Spezies mehrere Mitglieder beschrieben sind, wird zur Unterscheidung eine Zahl herangezogen, die die Reihenfolge ihrer Entdeckung beschreibt, somit ist hCLCA1 der erste entdeckte Vertreter beim Menschen (GRUBER *et al.*, 1998a), hCLCA4 der vierte entdeckte (AGNEL *et al.*, 1999), mCLCA3 der dritte entdeckte Vertreter bei der Maus (BOTHE *et al.*, 2008; EVANS *et al.*, 2004; KOMIYA *et al.*, 1999; LEVERKOEHNE und GRUBER, 2002) und mCLCA6 der sechste bei der Maus (BOTHE *et al.*, 2008; EVANS *et al.*, 2004). Neben ihrer putativen Funktion Chloridkanäle zu modulieren, werden CLCA-Proteine als Adhäsionsmoleküle (ABDEL-GHANY *et al.*, 2003), Modulatoren anderer Kanalproteine (GREENWOOD *et al.*, 2002; LOEWEN *et al.*, 2004), Apoptoseinduktoren (ELBLE und PAULI, 2001), Proteaseaktivität (BOTHE *et al.*, 2012; PAWLOWSKI *et al.*, 2006) und Bicarbonat-Kanal-Aktivität (THEVENOD *et al.*, 2003) diskutiert. Mehrere experimentelle Daten sprechen für eine wichtige Rolle einiger CLCA-Proteine bei der Mukoviszidose. So induzieren nahezu alle Mitglieder, die bislang elektrophysiologisch untersucht wurden, eine Calcium-aktivierbare Anionenleitfähigkeit, die DIDS sensitiv ist (GRUBER *et al.*, 2000). Diese Leitfähigkeit zeigt einige Charakteristiken der alternativen Chloridleitfähigkeit, die in Mukoviszidose-Patienten beschrieben sind. Weiterhin werden einige Mitglieder in Mukoviszidose-relevanten Geweben wie den Luftwegen und dem Darm exprimiert (GRUBER *et al.*, 2000). Für mCLCA6 konnte sogar eine intestinale Ko-Lokalisation mit dem murinen CFTR gezeigt werden (BOTHE *et al.*,

2008). Der Genlokus *hCLCA1/hCLCA4* beim Menschen konnte als Modifikator des Defektes der Chlorid-Ionen-Sekretion in Rektumbiopsien von Mukoviszidose-Patienten identifiziert werden (RITZKA *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine *hCLCA1*-Variante mit dem Mekoniumileus bei Mukoviszidose assoziiert ist (VAN DER DOEF *et al.*). Im Mukoviszidose-Mausmodell verbesserte eine Überexpression von *m3* den intestinalen Phänotyp und verlängerte die Überlebenszeit der Mäuse (YOUNG *et al.*, 2007). Aus den zahlreichen CLCA-Mitgliedern scheinen somit neben *hCLCA4* beim Menschen und dessen orthologem Vertreter bei der Maus, *mCLCA6*, der humane *hCLCA1* bzw. sein Mausorthologe *m3* eine bedeutende Rolle bei der Mukoviszidose zu spielen.

Sowohl *hCLCA1* als auch *mCLCA3* werden von muzinproduzierenden Zellen, vorwiegend Becherzellen nahezu im gesamten Organismus, unter anderem dem Respirationstrakt, exprimiert und mit Muzinen sezerniert. Die physiologische Rolle dieser Proteine ist noch ungeklärt. Eine Beteiligung bei der Muzinsynthese und der Muzinsekretion wird diskutiert (BROUILLARD *et al.*, 2005; GRUBER *et al.*, 1998b; LEVERKOEHNE und GRUBER, 2002; NAKANISHI *et al.*, 2001). Weiterhin wird angenommen, dass diese CLCA-Vertreter bei der Entwicklung von Becherzellmetaplasien eine wichtige Rolle spielen (PATEL *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2006). Um die Rolle der Proteine aufzuklären, wurden zahlreiche *m3*-ko-Modelle generiert, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.3.1.1 **mCLCA3-knock-out-Modelle**

2.3.1.1.1 **mCLCA3-knock-out-Modell nach Long**

Long und Mitarbeiter generierten ein *m3*-ko-Modell auf einem 129SvJ-Hintergrund, wobei das *m3*-ko-Konstrukt aus einem 8 kb Fragment des *mCLCA3*-Gens mit einem 3 kb-Kurzarm und 5 kb-Langarm flankierenden Exon 7 und einem Neomycin resistenten selektiven Marker-gen gebildet wurde (LONG *et al.*, 2006). Dabei identifizierten sie *m3* als ein entscheidendes Molekül bei der Regulierung der Reaktion des Atemwegsepithels auf allergische Noxen sowie bei den Entzündungsvorgängen in der Lunge. *m3* scheint daran beteiligt zu sein, die Entzündungsantwort des Lungengewebes als Antwort auf eine allergische Stimulation im Vergleich zu *m3*-wt-Tieren zu modulieren. Die *m3*-ko-Mäuse zeigten nach einer Stimulation mit inhaliertem Ovalbumin eine verminderte perivaskuläre Entzündungsreaktion des Lungengewebes bei gleichzeitig signifikant erhöhter neutrophiler Entzündungsreaktion in der Bronchoalveolarlavage (BAL) im Vergleich zu Ovalbumin stimulierten *m3*-wt-Tieren. Außerdem zeigten die *m3*-ko-Tiere eine geringer ausgeprägte Becherzellhyperplasie und eine reduzierte Muzinproduktion im Vergleich zu *m3*-wt-Tieren nach allergischer Stimulation mit

Ovalbumin, die jedoch nicht vollständig fehlte. Vermutlich scheinen daher neben m3 weitere Faktoren bei der Auslösung einer Becherzellmetaplasie von Bedeutung zu sein. Neben der Reaktion der m3-ko-Tiere auf Ovalbumin wurde die Reaktion auf intranasale Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) als einem Toll-like-Rezeptor-4- (TLR-4) Agonisten untersucht. Die Zunahme der Epithelhöhe, die nach Stimulation mit LPS in den m3-wt-Tieren identifiziert werden konnte, fehlte in den m3-ko-Tieren vollständig. m3 scheint daher bei der Entwicklung einer Epithelzellhypertrophie involviert zu sein. Einen Effekt bei der Becherzellhyperplasie und der Muzinproduktion konnte nach LPS Stimulation im Vergleich der m3-ko-Tiere mit m3-wt-Tieren nicht identifiziert werden.

2.3.1.1.2 **mCLCA3-knock-out-Modell nach Robichaud**

Robichaud und Mitarbeiter generierten ein m3-ko-Modell auf einem gemischten C57/BL6-129 Hintergrund, wobei ein 244 bp Segment der für m3 codierenden Region Exon 7 und Exon 8 übergreifend entfernt und stattdessen eine LacZ-Neo Reporter-Kassette eingesetzt wurde (ROBICHAUD *et al.*, 2005). Sowohl bei fehlendem proinflammatorischen Stimulus als auch nach allergischer Stimulation mit Ovalbumin oder intranasaler Applikation von Interleukin-13 konnte kein phänotypischer Unterschied zwischen den m3-ko-Tieren und den m3-wt-Tieren festgestellt werden. Daher kamen sie zu der These, dass m3 im Mausmodell für die Überproduktion von Mukus nicht notwendig ist. Den Knock-out kompensierende Mechanismen anderer Gene wurden mittels Genexpressionsanalyse Array nicht identifiziert.

2.3.1.1.3 **mCLCA3-ko-Modell nach Patel**

Patel und Mitarbeiter generierten ein m3-ko-Mausmodell auf einem C57BL/6-Hintergrund, wobei der m3-knock-out durch homologe Rekombination mit einem mutierten *mCLCA3*-Gen generiert wurde (PATEL *et al.*, 2006). Dieses war durch die Deletion eines Drittels des Exon7 sowie der Exone 8-11 mit dazugehörigen Intronen charakterisiert, an deren Stelle eine Neomycin-Kassette integriert wurde. Dabei zeigten die m3-ko-Mäuse denselben Grad der Becherzellmetaplasie wie die m3-wt-Kontrolltiere. Weiterhin reagierten die m3-ko-Mäuse in dem gleichen Ausmaß mit einer Hyperreaktivität der Atemwege auf eine Inhalation mit Methacholin, wie die Kontrolltiere. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Expression von m3 für die Ausbildung einer Becherzellmetaplasie und Hyperreaktivität der Atemwege als Folge einer viralen oder allergischen Stimulation allein nicht notwendig ist, wobei möglicherweise weitere CLCA-Mitglieder neben m3 daran beteiligt sind, insbesondere mCLCA5. Diese Hypothese wurde in jüngsten Untersuchungen untermauert, indem gezeigt werden konnte,

dass m3 nach IL-13 Stimulation sowohl in Wildtyp- als auch m3-ko-Tieren in respiratorischen Becherzellen exprimiert wird (MUNDHENK *et al.*, 2012). Dieses von Patel und Kollegen generierte m3-ko-Modell liegt der vorliegenden Arbeit zu Grunde.

Zusammenfassend kann für m3 gesagt werden, dass dessen Rolle bei der Entwicklung einer Becherzellhyperplasie, einer gesteigerten Muzinsekretion und einer Hyperreaktivität der Atemwege in Form von Entzündungsvorgängen bislang nicht einheitlich geklärt werden konnte, da verschiedene Studien basierend auf ko-Modellen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen zu kontroversen Ergebnissen gekommen sind, sodass hier weiterer Klärungsbedarf besteht.

2.3.2 Weitere mögliche Modulatoren der Mukoviszidose

Neben den Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen Genen wurden auch die Gen-Umwelt-Interaktionen als potentielle Modulatoren näher untersucht, da diese vor allem therapeutisch von großer Bedeutung sind. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass nachteilige Effekte, die bei bestimmten Polymorphismen gesehen werden, unter nachteiligen Umwelteinflüssen noch verstärkt werden (COLLACO und CUTTING, 2008). Bislang konnten erst wenige Interaktionen zwischen Umwelt und Genen entdeckt werden, so beispielsweise zwischen MBL2 und *Pseudomonas species* (GARRED *et al.*, 1999; TREVISIOL *et al.*, 2005) sowie zwischen MBL2 und *Staph. aureus* (CARLSSON *et al.*, 2005), die beide zu einer zusätzlichen Verschlechterung der Lungenfunktion führen. Der Zusammenhang zwischen passivem Rauchen und TGFB1 sowie CFTR wurden identifiziert (COLLACO *et al.*, 2008), wohingegen Luftverschmutzung keinen nennenswerten Einfluss auf die Mukoviszidose nimmt (GOSS *et al.*, 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen einen Großteil der Variationen des Schweregrades der Mukoviszidose bedingten Lungenerkrankung erklären können und deren weitere Erforschung wahrscheinlich neue Optionen für die Therapie der Erkrankung hervorbringt (COLLACO und CUTTING, 2008).

2.3.3 Probleme und Aussichten bei der Identifikation von Modulatorgenen

Obwohl einige Modulatoren bereits identifiziert werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass Modulatoren in Isolation bzw. in Studien einen weitaus geringeren Effekt auf den Phänotyp zeigen als im Zusammenspiel mit weiteren bisher nicht bekannten Faktoren, wie es im lebenden Patienten als ein komplexes System der Fall ist. Bisher haben die meisten Studien über Modulatorgene nur *CFTR* in Interaktion mit wenigen anderen Polymorphismen untersucht.

LITERATURÜBERSICHT

Dank der neuen Technologien, mit der Genom-weite Untersuchungen durchgeführt werden können, wird sich jedoch in Kürze die Menge der untersuchten Gene vermutlich exponentiell vermehrt haben (COLLACO und CUTTING, 2008).

3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung

Arbeitshypothese: mCLCA3 moduliert den Lungenphänotyp der Mukoviszidose-ähnlichen Veränderungen im β -ENaC-transgenen Mausmodell.

Zur Bearbeitung der Arbeitshypothese wurden Mäuse durch Kreuzung generiert, die eine atemwegsspezifische Natriumkanalüberexpression (β -ENaC-tg) und damit den Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp zeigen, wobei zusätzlich ein m3-knock-out vorliegt. Diese neuartige Maus sollte mittels klassischer pathomorphologischer und -morphometrischer Analysen (Bestimmung der Becherzellanzahl, Messung der Epithelhöhen, Berechnung der Schleimmenge (engl. *mucus volume density*), Einteilung der Mukusakkumulation und Quantifizierung der Entzündungszellen), sowie an Hand differenzieller Expressionsanalyse auf Genomebene phänotypisiert werden, um zu klären, ob mCLCA3 den Mukoviszidose-Phänotyp im Respirationstrakt moduliert.

4 Material und Methoden

4.1 Mäuse

4.1.1 Genetischer Hintergrund und Zuchtstrategie

Die schon vor Beginn des Promotionsvorhabens von Melanie Bothe und Dr. Lars Mundhenk begonnene Zucht der doppelt transgenen Maus auf einem C57BL/6-Hintergrund mit der Zuchtstrategie

β -ENaC-Wildtyp/mCLCA3-heterozygot X β -ENaC-tg/m3-heterozygot

wurde weitergeführt (Abb. 3), wobei die β -ENaC-tg-Mäuse aus einer Reinzucht auf einem C57BL/6-N Hintergrund freundlichst von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Markus Mall, Heidelberg, bereitgestellt wurden (siehe auch 2.2.2). Charakteristisch für die ENaC-tg Tiere ist deren Hemizygotie, da sie nur auf einem Allel transgen sind. Die genutzten m3-Mäuse aus einem m3-ko-Modell wurden auf einem C57BL/6-J Hintergrund generiert (PATEL *et al.*, 2006).

Die Zucht und die Haltung der Mäuse erfolgte in Kooperation mit der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin. In dieser Studie wurden zwei Altersgruppen untersucht: juvenile Tiere im Alter von 14 Tagen und adulte, 9 Wochen alte Tiere. Dabei wurden alle Tiere der laufenden Zucht im Alter von drei Wochen mittels PCR einer Schwanzspitzenbiopsie auf ihren Genotyp hin untersucht und in Gruppen eingeteilt, um die Fortführung der Zucht gewährleisten und entsprechende Zuchtpaare zusammenstellen zu können. Die in dieser Arbeit untersuchten juvenilen Tiere wurden erstmalig nach deren Tötung genotypisiert, wohingegen die adulten Tiere bereits auf Grund ihrer Genotypisierung im Alter von drei Wochen ausgewählt, getötet und zur Kontrolle erneut genotypisiert wurden.

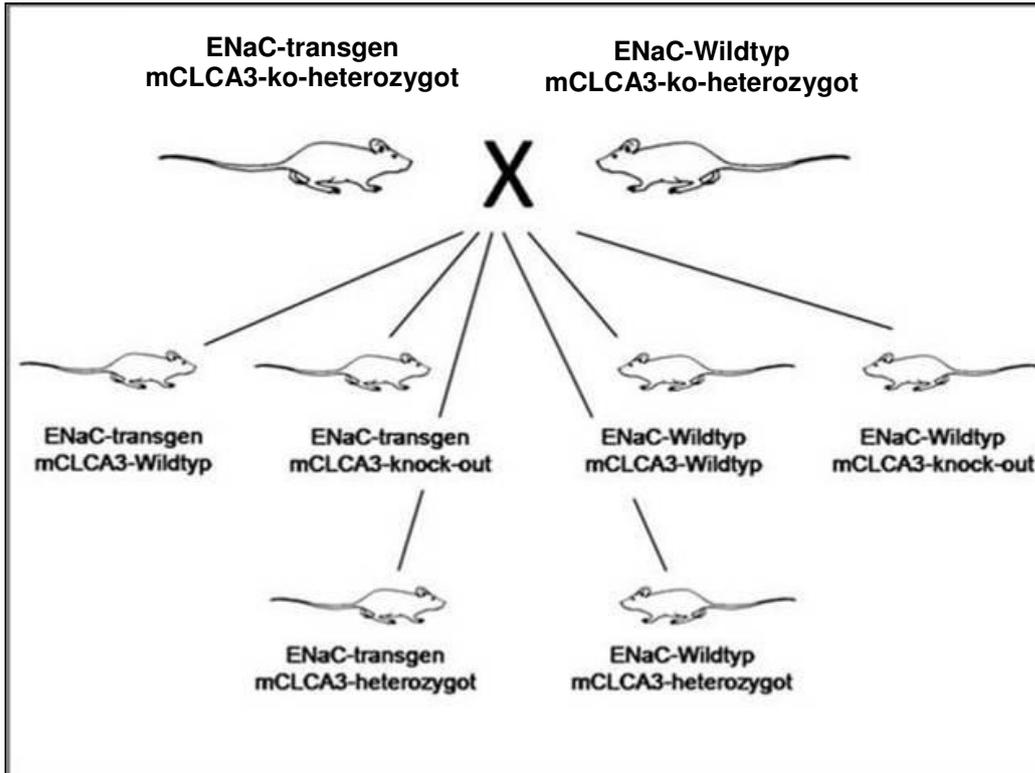


Abb. 3: Darstellung der Zuchtstrategie der doppelt transgenen Maus und Aufspaltung der Genotypen in der F1-Generation

Die Elterngeneration besteht aus einem Tier mit dem Genotyp *ENaC-tg/m3-ko-heterozygot* und einem Tier mit dem Genotyp *ENaC-wt/m3-ko-heterozygot*, da nur bei dieser Verpaarung alle sechs möglichen Genotypen erzeugt werden. Die Tochtergeneration (F1) spaltet sich in sechs verschiedene Genotypen auf, wobei nur die Genotypen *ENaC-tg/m3-wt*, *ENaC-tg/m3-ko*, *ENaC-wt/m3-wt* und *ENaC-wt/m3-ko* in dieser Arbeit untersucht wurden. Da die Tiere mit den Genotypen *ENaC-tg/m3-heterozygot* und *ENaC-Wildtyp/m3-heterozygot* jeweils ein *m3*-Wildtyp-Allel sowie ein *m3*-knock-out-Allel besitzen und demzufolge vermutlich *m3* exprimieren, sind sie für diese Arbeit nicht von wissenschaftlichem Interesse und wurden für das Erlernen der Methoden zu Beginn der Untersuchungen bzw. für die Aufrechterhaltung der Zucht genutzt.

4.1.2 Tötung, Bestimmung des Gewichtes, Organentnahme und -konservierung

Die Mäuse wurden nach erfolgter Tötungsanzeige bei dem Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (Tötungsanzeigenummer 01404/06) und unter Berücksichtigung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen getötet, wobei die adulten Tiere mittels zervikaler Dislokation und die juvenilen Tiere mittels Inhalation von Isofluran euthanasiert wurden. Bis zum Zeitpunkt der Tötung hatten sie uneingeschränkten Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die

MATERIAL UND METHODEN

Bestimmung des Körpergewichtes der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Tötung (*Acculab VICON, Sartorius, Göttingen, Deutschland*), wobei anschließend die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen wurden. Dabei wurde der Thorax eröffnet und der komplette Respirationstrakt entnommen. Die rechte Lungenhälfte wurde an der Eintrittsstelle des rechten Hauptbronchus feinpräparatorisch abgetrennt und nach der unmittelbaren Fixation in mit Trockeneis bzw. flüssigem Stickstoff gekühlten 2-Methylbutan (*Merck, Darmstadt, Deutschland*) in sterile und mit der Probenidentifikationsnummer beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße (*SafeSeal Reagiergefäße, Sarstedt, Nümbrecht*) überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die linke Lungenhälfte inklusive Trachea wurde für 24 Stunden in 4 %igem, neutral gepufferten Formalin (*Applichem, Darmstadt, Deutschland*) fixiert. Die anschließende Entwässerung und Einbettung der Organe in flüssiges Paraffin erfolgte mittels eines Einbettautomaten nach folgendem Protokoll (*Tissue-Tek® VIP, Sakura Finetek Germany, Heppenheim*):

Tabelle 2: Programm der Entwässerung und Paraffineinbettung im Tissue-Tek® VIP

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	Formalin 10 %	60 min	40 °C
2	Wasser	50 min	40 °C
3	Ethanol 70 %	50 min	40 °C
4	Ethanol 80 %	50 min	40 °C
5	Ethanol 96 %	50 min	40 °C
6	Ethanol 96 %	50 min	40 °C
7	Ethanol 100 %	50 min	40 °C
8	Ethanol 100 %	50 min	40 °C
9	Xylol	50 min	40 °C
10	Xylol	50 min	40 °C
11	Paraffin	50 min	60 °C
12	Paraffin	50 min	60 °C
13	Paraffin	50 min	60 °C
14	Paraffin	50 min	60 °C

4.2 Genotypisierung der Mäuse

Bei der vorgestellten Zuchtstrategie der Mäuse treten nach Mendel in der F1-Tochtergeneration sechs verschiedene Genotypen auf, wobei lediglich vier Genotypen in dieser Arbeit untersucht wurden (Abb. 3): ENaC-tg/m3-wt, ENaC-tg/m3-ko, ENaC-wt/m3-wt und ENaC-wt/m3-ko. Da die Genotypen ENaC-tg/m3-heterozygot und ENaC-wt/m3-heterozygot mit jeweils einem m3-wt-Allel und einem m3-ko-Allel noch eine Restmenge an m3 exprimieren, waren sie für diese Arbeit nicht von Bedeutung und wurden vorbereitend als Übungstiere für die Optimierung der Methodik genutzt. Um eine Einordnung der Tiere in Genotypgruppen zu ermöglichen, musste jedes Tier an Hand seiner genomischen DNA einer Schwanzspitzenbiopsie eindeutig bezüglich seines Genotyps identifiziert werden.

4.2.1 Isolierung der genomischen DNA

Die Isolierung der genomischen DNA aus einer Schwanzspitzenbiopsie, welche bei den adulten Tieren von Mitarbeitern des FEM im Alter von 3 Wochen entnommen wurde, erfolgte mit Hilfe des Kits *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden laut Arbeitsvorschriften des Herstellers durchgeführt und können im Informationsblatt im Detail eingesehen werden.

4.2.2 Reinheitskontrolle und Konzentrationsmessung der genomischen DNA

Um eine gute Qualität der isolierten genomischen DNA für die weitere Nutzung sicher zu stellen, musste eine Reinheits- und damit Qualitätskontrolle stattfinden. Auch die genaue Kenntnis der jeweiligen DNA-Konzentration war für die Herstellung definierter Verdünnungen essentiell.

4.2.2.1 Funktionsprinzip der photometrischen Messung

Die Reinheitskontrolle und Konzentrationsmessung der genomischen DNA erfolgte mittels NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer, Serial number: 5573, Firma: peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland), einem Spezialphotometer zur Bestimmung der Lichtabsorption. Das grundsätzliche Funktionsprinzip eines Photometers beruht auf einer Intensitätsmessung des Lichts, welches eine Probe passiert, verglichen mit der Lichtintensität bevor es durch die Probe gelangt. Das Verhältnis dieser beiden Messungen bildet die Grundlage für die Bestimmung der Extinktion, welche sich logarithmisch aus der gemessenen Transmission errechnet. Die Kombination der errechneten Extinktion des UV-Lichts mit dem Konzentrationsfaktor

doppelsträngiger DNA ermöglicht die Kalkulation der Probenkonzentration, sowie zusätzlich die Bestimmung der Reinheit. Dabei entspricht eine Extinktionseinheit doppelsträngiger DNA bei der Wellenlänge 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml (einzelsträngige DNA 33 µg/ml). Die Reinheit der isolierten DNA bezieht sich auf mögliche Rückstände durch Proteine. DNA und Proteine absorbieren UV-Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen, DNA bei 260 nm und Proteine bei 280 nm, begründet vor allem in Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten in den Proteinen. Die Reinheit lässt sich aus dem Verhältnis der Messungen bei 260 und 280 nm errechnen. Dabei sprechen Werte um 1,8 für reine DNA, geringere Werte hingegen geben Hinweise auf Verunreinigungen mit Proteinen.

4.2.2.2 Durchführung der Messung

Zu Beginn wurde der Probenhalter mit 2 µl Nuklease-freiem Wasser gereinigt. Anschließend wurden 1,5 µl des reinen Lösungspuffers, in dem die isolierte DNA eluiert wurde auf den Probenhalter pipettiert, um den Nullpunkt entsprechend des verwendeten Lösungsmittels einzustellen. Jeweils 1 µl der zu kontrollierenden DNA-Proben wurde auf den Probenhalter pipettiert und gemessen. Die Ausgabe der Messergebnisse der einzelnen Proben erfolgte graphisch in Form einer Kurve, wobei die Wellenlängen (x-Achse) und die 10 mm - Absorption (y-Achse) gegeneinander aufgetragen wurden. Dabei wird das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm dargestellt. In diesem Wellenlängenbereich können Substanzen, die die Absorption messung beeinflussen, detektiert werden. Weiterhin erfolgte die Ausgabe der Konzentration (ng/µl) und des 260/280-Quotienten als Reinheitsparameter.

4.2.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die effiziente, exponentielle Amplifikation von DNA in mehreren Zyklen unter Nutzung des Enzyms DNA-Polymerase. Initial wird die doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen (üblicherweise um 95 °C) denaturiert. An die nun vorliegenden Einzelstränge lagern sich sequenzspezifische Primer an (engl. *primer annealing*). Ausgehend von diesen Primern erfolgt die Synthese des jeweilig komplementären Stranges durch die DNA-Polymerase (Elongation), sodass die DNA erneut in doppelsträngiger Form vorliegt. Nach diesem Prinzip schließen sich mehrere Zyklen an, sodass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der eingesetzten DNA kommt. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit Hilfe verschiedener PCR, bei denen die isolierte genomische DNA der Schwanzspitzenbiopsie als Matrize eingesetzt wurde.

4.2.3.1 Primerdesign

Primer bestehen aus kurzen Nukleotidsequenzen, die komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt sind. Dabei stellen sie den Ansatzort der DNA-Polymerase dar. Primer werden vor allem durch ihre Länge und ihrer Zusammensetzung charakterisiert. Die Länge, in der Regel zwischen 18 und 30 Basenpaare, nimmt einen Einfluss auf die Schmelztemperatur der Primer, bei der 50 % der Primer eine Bindung an die DNA eingegangen sind. Auch die Zusammensetzung, dabei vor allem der Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) beeinflusst die Schmelztemperatur, da diese Basen über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind und somit mehr Energie für deren Aufspaltung notwendig ist, als für die Lösung der beiden Wasserstoffbrücken zwischen den Basen Adenin (A) und Thymin (T). Die Sequenzen der ENaC-Primer sowie die ENaC-tg Mäuse wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe um Markus Mall (Heidelberg, Deutschland) und die Primersequenzen für die „gob-5“-PCR wurden freundlicherweise zusammen mit den m3-ko-Mäusen von Karim Dabbagh (Roche, Palo Alto, CA, USA) bereitgestellt. Das Design der Primer der „mCLCA3“-PCR wurde von Frau Jana Enders aus dem Institut für Tierpathologie, FU Berlin entwickelt. In den nachfolgenden Abbildungen kann die Lage der m3-Primer in einer Genkarte eingesehen werden (Abb. 4 und Abb. 5). In Tabelle 3 wurden die Sequenzen und Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer dargestellt, in Tabelle 10 die Längen der erwarteten Produkte.

MATERIAL UND METHODEN

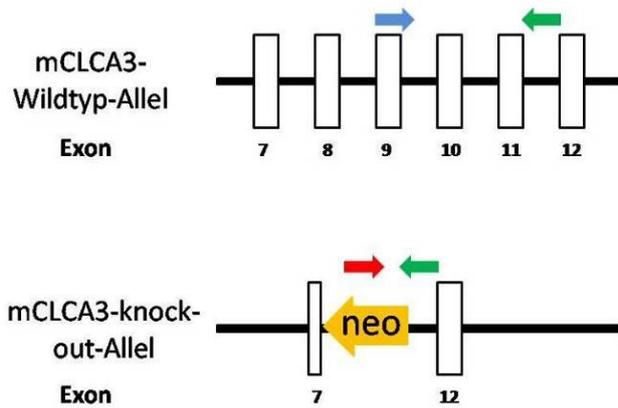


Abb. 4: mCLCA3-Genkarte mit dargestellter Lage der Primer der „gob-5-PCR“

Neomycin-Kassette (gelber Blockpfeil „neo“)

Primer Gob A2: vorwärts, Exon 9 / Intron 9-10 (blauer Blockpfeil)

Primer Gob B: rückwärts, Intron 11-12 (grüner Blockpfeil)

Primer T-Neo 3: vorwärts, Neomycin-Kassette (roter Blockpfeil)

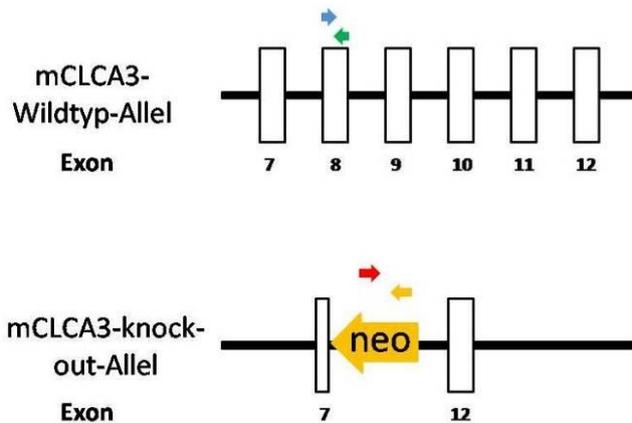


Abb. 5: mCLCA3-Genkarte mit dargestellter Lage der Primer der „mCLCA3-PCR“

Neomycin-Kassette (gelber Blockpfeil „neo“)

Primer mCLCA3 E8s: vorwärts, Exon 8 (blauer Blockpfeil)

Primer mCLCA3 E8as: rückwärts, Exon 8 (grüner Blockpfeil)

Primer Neo-Rs: vorwärts, Neomycin-Kassette (roter Blockpfeil)

Primer: Neo-Ras: rückwärts, Neomycin-Kassette (orangefarbener Blockpfeil)

Tabelle 3: DNA-Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer, Genotypisierung

PCR-Name und Funktion	Primer-Name	Sequenz 5'-3'	errechnete Schmelztemperatur
„ENaC“-PCR für die Detektion der ENaC-tg Tiere	ENaC forward	CTTCCAAGAGTTCAACTACCG	48,5 °C
	ENaC reverse	TCTACCAGCTCAGCCAGAGTG	52,1 °C
„gob-5“-PCR für die Detektion der mCLCA-ko-Tiere	Gob A2	TCCATCCAGGTCAGGGTTCTC	55,1 °C
	Gob B	CCCTTCCTCACGTTTCTCAGC	55,3 °C
	T-Neo 3	CGCGGATCCGAACAAACGACCCAACACCCG	77,6 °C
„mCLCA3“- PCR für die Detektion der mCLCA-ko-Tiere	mCLCA3 E8s	TGGATCTGAAATTGTGCTGCT	52,0 °C
	mCLCA3 E8as	AGGGCCACTGTATGGATGAT	51,0 °C
	Neo-Rs	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	51,5 °C
	Neo-Ras	AATATCACGGGTAGCCAACG	51,8 °C

4.2.3.2 Bestimmung des Status des epithelialen Natriumkanals (β -ENaC) mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR zur Bestimmung des Genstatus (Wildtyp vs. transgen) hinsichtlich der Expression der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC) wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 4: PCR-Mix „ENaC“

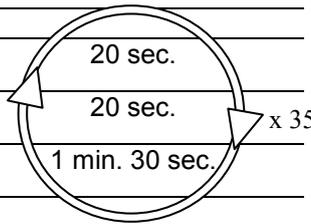
Reagenzien	Eingesetztes Volumen
10-fach True Start Puffer (Fermentas)	5 μ l
dNTP-Mix, 2 mM (Fermentas)	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	3 μ l
Primer ENaC forward, 20 pmol/ μ l	1 μ l
Primer ENaC reverse, 20 pmol/ μ l	1 μ l
True Start Taq Polymerase (5 U/ μ l, Fermentas)	0,25 μ l
Nuklease-freies Wasser	33,75 μ l
Template (genom. DNA, 10 pg-1 μ g)	1 μ l
Ansatzvolumen pro Probe	50 μ l

MATERIAL UND METHODEN

Anschließend wurden die Proben in einem Thermocycler (*T3000, Firma: Biometra® biomedizinische Analytik, Göttingen, Deutschland*) nach folgendem PCR-Programm behandelt:

Tabelle 5: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „ENaC“

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	20 sec.
Anlagerung der Primer	56 °C	20 sec.
Elongation	72 °C	1 min. 30 sec.
Finale Verlängerung	72 °C	7 min.
Kühlung bis zur Entnahme	4 °C	∞



4.2.3.3 Bestimmung des m3- Status mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Bestimmung des m3-Status (Wildtyp +/+, heterozygot +/-, knock out -/-) wurden zwei verschiedene PCR genutzt (Tabelle 6 bis Tabelle 9):

Tabelle 6: PCR-Mix „Gob-5“

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

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „Gob-5“

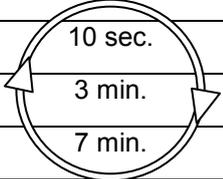
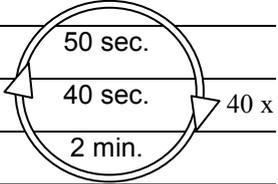
Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min.
Zyklische Denaturierung	94 °C	
Anlagerung der Primer	64 °C	
Elongation	68 °C	
Finale Verlängerung	68 °C	15 min.
Kühlung bis zur Entnahme	12 °C	∞

Tabelle 8: PCR-Mix „mCLCA3“

Reagenzien	Eingesetztes Volumen
10-fach Dream Taq Buffer Green (Fermentas)	5 µl
dNTP-Mix, 2 mM (Fermentas)	5 µl
Primer mCLCA3 E8s, 20 pmol/µl	1 µl
Primer mCLCA3 E8as, 20 pmol/µl	1 µl
Primer Neomycin forward, 20 pmol/µl	1 µl
Primer Neomycin reverse, 20 pmol/µl	1 µl
Dream Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Fermentas)	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	34,75 µl
Template (genom. DNA, 10 pg-1 µg)	1 µl
Ansatzvolumen pro Probe	50 µl

Tabelle 9: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „mCLCA3“

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	
Anlagerung der Primer	52 °C	
Elongation	72 °C	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min.
Kühlung bis zur Entnahme	4 °C	∞

4.2.3.4 Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion-Produkte mittels Agarose-Gel-elektrophorese

Nukleinsäuren können in Agarosegel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Sie wandern dabei auf Grund ihrer negativen Ladung im Spannungsfeld in Richtung der positiv geladenen Kathode. Der optische Nachweis wird durch Interkalation des Farbstoffes Ethidiumbromid in den aufgetrennten Nukleinsäuren ermöglicht, wobei sie durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt und bei einer Wellenlänge von 300 nm sichtbar werden. Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurden Gele mit 0,5-fach konzentriertem Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) hergestellt. Hierbei wurde die 5-fach TBE-stock solution mit 108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (*Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland*), 55 g Borsäure (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*) und 40 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0, *AppliChem, Darmstadt, Deutschland*) in 2 Litern Aqua dest. angesetzt. Die 0,5-fache Konzentration der working solution wurde durch 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. erreicht. Für ein 1 %iges Gel wurde 1 g Agarose (*Bioline, Luckenwalde, Deutschland*) auf 100 ml TBE-Puffer eingewogen und durch vorsichtiges Schwenken miteinander vermischt. Ein 2 %iges Gel wurde mit 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer analog hergestellt. Das Agarose-Puffer-Gemisch wurde bis zu dessen vollständiger Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem sich die Gellösung auf etwa 60 °C abgekühlt hatte, wurden 2 µl Ethidiumbromid (*Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland, 1 %ig*) unter strenger Einhaltung des Arbeitsschutzes hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Gellösung in eine Gelkammer (*peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland*) mit eingestecktem Kamm gegossen und verfestigte sich innerhalb von 45 Minuten bei Raumtemperatur. Der Kamm wurde aus dem erhärteten

MATERIAL UND METHODEN

Gel entfernt, 6x Orange Loading Dye (*Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland*) zu den PCR-Produkten im Verhältnis 1:5 pipettiert und auf das Gel geladen. Als Größenstandard wurde eine 50 bp-Leiter (*O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland*) bzw. eine 1 kb-Leiter (*O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland*) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5-fach TBE-Puffer genutzt und die Gelkammer (*peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland*) an einen Spannungsgeber (*Power-Pac™ Basic, Biorad, München, Deutschland*) bei 100 V für etwa 40 Minuten angeschlossen. Anschließend wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Licht-Betrachters (*UV Transilluminator 2000, Biorad, München, Deutschland, Software: Quantity One 1-D Analysis Software*) identifiziert, fotografiert, digitalisiert und an Hand der Bandenhöhe der erwarteten Produkte ausgewertet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Länge der erwarteten PCR-Produkte, Genotypisierung

PCR-Name	erwartetes Produkt	Genstatus	DNA-Größenstandard
ENaC	250 bp	Transgen	<i>O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder</i>
	350 bp	Wildtyp	<i>O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder</i>
Gob-5	3 kb	Wildtyp	<i>O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder</i>
	1,3 kb	Knock out	<i>O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder</i>
mCLCA3	102 bp	Wildtyp (Exon 8)	<i>O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder</i>
	400 bp	Knock out (Neo)	<i>O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder</i>

Die folgenden Abbildungen (Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8) zeigen repräsentative Beispiele der PCR zur Genotypisierung der doppelt transgenen Maus.

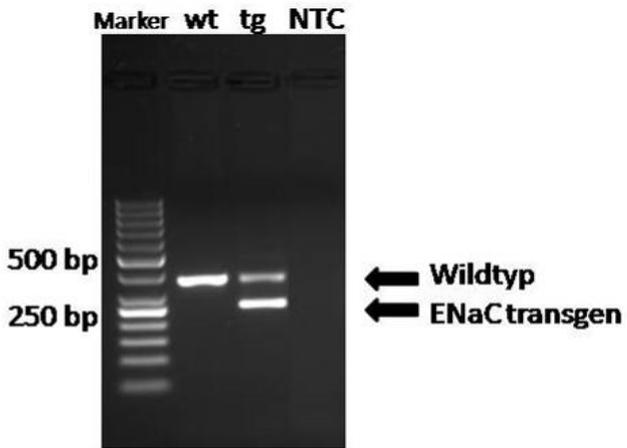


Abb. 6: PCR-Bild „ENaC“

wt = ENaC-Wildtyp; tg = ENaC-tg; NTC = no template control, als Marker wurde die O'GeneRuler™ 50 bp DNA ladder eingesetzt. Die Bande des Wildtyp-Allels befindet sich bei 350 bp, die transgen-Bande bei 250 bp.

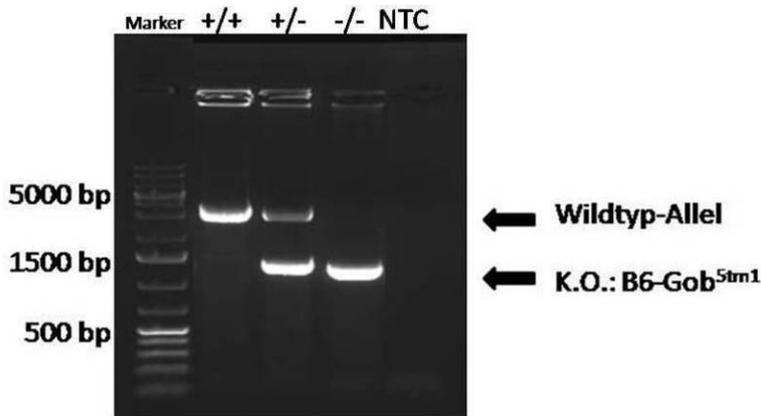


Abb. 7: Repräsentative Darstellung der „gob-5“-PCR

+/+ = Wildtyp; +/- = heterozygot, ein Allel Wildtyp und ein Allel knock-out; -/- = knock-out; NTC= no template control, als Marker wurde die O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder eingesetzt. Die Bande der knock-out-Tiere befindet sich bei 1300 bp, das Wildtyp-Allel bei 3000 bp.

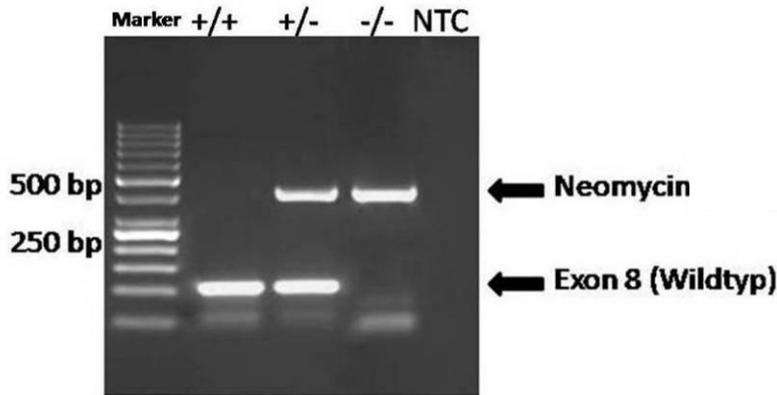


Abb. 8: Repräsentative Darstellung der „mCLCA3“-PCR

+/+ = homozygot, Wildtyp; +/- = heterozygot, ein Allel Wildtyp und ein Allel knock-out, wobei diese Tiere nicht in die Untersuchung einbezogen wurden; -/- = homozygot, knock-out; NTC= no template control, als Marker wurde die O'GeneRuler™ 50bp DNA ladder eingesetzt. Die Bande der Neomycin-Kassette der knock-out-Tiere befindet sich bei 400 bp, das Exon 8 der Wildtyp-Tiere bei 102 bp.

4.3 Histologische Präparate

4.3.1 Makroskopische Schnittführung der Trachea und der Lunge

Die sich in flüssigem Paraffin befindenden Organe wurden anschließend an definierten Lokalisationen geschnitten. Dabei wurde die fixierte Trachea an der Eintrittsstelle des linken Hauptbronchus in die linke Lungenhälfte von dieser abpräpariert. Der erste Transversalschnitt der Trachea erfolgte unmittelbar kaudal der Kehlkopfschwellung. Der zweite Transversalschnitt erfolgte bei den adulten Tieren 5 mm bzw. bei den juvenilen Mäusen 3 mm kaudal des ersten Schnittes. Die Trachealsegmente wurden auf ihrer Anschnittsfläche stehend in flüssiges Paraffinwachs eingeschlossen und auf einer Kühlplatte zum Aushärten gebracht. Die linke Lungenhälfte wurde an der Eintrittsstelle des Hauptbronchus transversal geschnitten. Das dabei entstandene hintere Segment wurde mittig mit einem zweiten Transversalschnitt halbiert. Die nachfolgende Abbildung stellt die makroskopische Schnittführung graphisch dar (Abb. 9). Die drei Lungenanteile wurden ebenfalls auf ihrer Anschnittsfläche stehend in flüssigem Paraffinwachs eingebettet und mittels Kühlung zum Aushärten gebracht. Die weitere Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

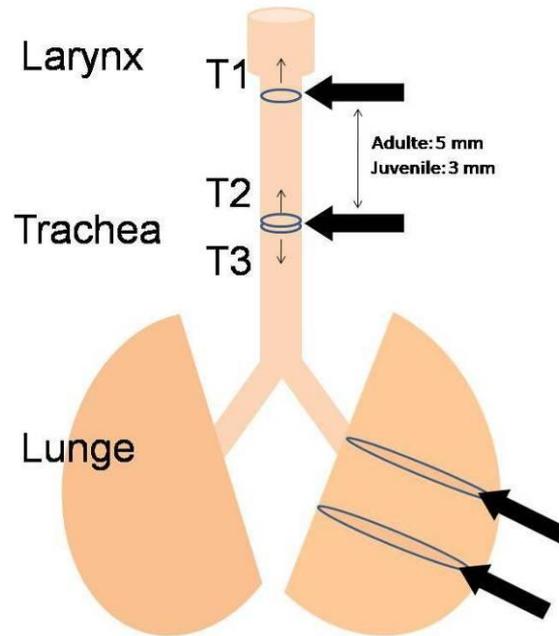


Abb. 9: Schematische Darstellung der makroskopischen Schnittführung (Blockpfeile)

4.3.2 Herstellung der Schnittpräparate

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung); (4.3.3) und Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion); (4.3.4) wurden Paraffinschnitte mit einer Stärke von 3 μm unter Nutzung eines Mikrotoms (*Microm HM 325, Microm International, Walldorf, Deutschland*) unter Zuhilfenahme von SEC 35 Microm Klingen (*Microm International, Walldorf, Deutschland*) angefertigt. Dabei wurden pro Lokalisation 8 Serienschritte von Trachea und Lungenparenchym hergestellt. In einem 60 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte zur Glättung einige Sekunden gewässert. Anschließend wurden sie auf Starfrost® Plus Objektträger (*Waldemar Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig, Deutschland*) aufgezogen. Die Objektträger wurden daraufhin für eine halbe Stunde auf einer Wärmeplatte bei 40 °C zur Trocknenstreckung gelagert. Es folgte eine Inkubation in einem Wärmeschrank für 3 Stunden bei 60 °C, so dass sich überschüssiges Paraffin von den Objektträgern lösen konnte. Die anschließende Abkühlung und Lagerung der histologischen Schnitte bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei Raumtemperatur. Die histologischen Schnittpräparate wurden anschließend in einem Färbegerät der Firma Leica (*Nussloch, Deutschland*) im Diagnostiklabor des Institutes für Tierpathologie der Freien Universität Berlin in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (Tabelle 11) und gefärbt (4.3.3 und 4.3.4) und schließlich mit einem Eindeckautomat (*Leica Autostainer XL, Nussloch, Deutschland*) eingedeckt.

Tabelle 11: Protokoll des Entparaffinierens

Schritt	Reagenz	Dauer	Wiederholung
1	Xylol	5 min	2 x
2	Ethanol 100 %	3 min	2 x
3	Ethanol 96 %	3 min	2 x
4	Ethanol 70 %	3 min	1 x
5	H ₂ O	1 min	1 x

4.3.3 Hämalaun-Eosin-Färbung

Jeder zweite Paraffinserienschnitt wurde mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt (Tabelle 12), um optimale Anschnitte durch das Tracheallumen sowie durch das Lungenparenchym zu identifizieren. Des Weiteren wurden sie für die Detektion von Entzündungsherden mit Infiltration von Entzündungszellen genutzt. Dabei färbte der basische Farbstoff Hämalaun saure Zellbestandteile, wie den Zellkern mit enthaltender DNA, sowie das endoplasmatische Retikulum basophil (blau) an. Der saure Farbstoff Eosin färbte die basischen Zellplasmaproteine eosinophil (rot) an. Diese Färbung erfolgte automatisiert in einem Färbegerät der Firma Leica (*Nussloch, Deutschland*) im Diagnostiklabor des Institutes für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Auch die anschließende Eindeckung mit Deckgläschen erfolgte automatisiert.

Tabelle 12: Färbeprotokoll Hämalaun-Eosin

Schritt	Reagenz	Dauer	Wiederholung
1	Hämalaun nach Mayer	5 min	1 x
2	H ₂ O	15 min	1 x
3	1 %iges, wässriges Eosin	10 sec	1 x
4	H ₂ O	1 min	1 x

4.3.4 Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Die PAS-Reaktion diente der Anfärbung von Mukus in den Atemwegen, sowie der Anfärbung von mukushaltigen Becherzellen. Dabei handelt es sich bei der PAS-Reaktion um eine spezielle Färbetechnik, die kohlenhydrathaltige Bestandteile, wie Muzine, Glykoproteine und Glykogen hervorhebt. Zu Grunde liegt die Oxidation der freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen durch die Perjodsäure. Anschließend gehen diese Aldehyd-

MATERIAL UND METHODEN

gruppen mit schwefelsaurem Fuchsin als Bestandteil der Schiff'schen Reagenz kräftig violette Komplexe ein, die das histologische Bild charakterisieren.

Dazu wurde jeder zweite Serienschnitt zunächst entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Danach wurden die histologischen Präparate für 10 Minuten in 1 %ige Perjodsäure (*Riedel de Haën, Seelze, Deutschland*) gegeben und anschließend 1 Minute unter fließendes, 50 °C heißes Leitungswasser gestellt. Nach zweimaligem Spülen in *Aqua dest.* für jeweils etwa 20 Sekunden erfolgte eine 25-minütige Behandlung mit Schiff'scher Reagenz (*Waldeck, Münster, Deutschland*). Die Farbreaktion fand anschließend unter fließendem Leitungswasser bei ca. 50 °C für 10 Minuten statt. Nach erneutem kurzen Spülen in *Aqua dest.* erfolgte die Gegenfärbung in unverdünntem Hämalaun (*Merck, Darmstadt, Deutschland*) für 1 Minute (Tabelle 13). Nachdem die Objektträger für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült worden waren, wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %) und anschließend dreimal in Xylol (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*) entwässert (Tabelle 14). Dann erfolgte die automatisierte Eindeckung.

Tabelle 13: Färbeprotokoll Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Schritt	Reagenz	Dauer	Wiederholung
1	1 %ige Perjodsäure	10 min	1 x
2	fließendes, 50 °C heißes Leitungswasser	1 min	1 x
3	<i>Aqua dest.</i>	20 sec	2 x
4	Schiff'sche Reagenz	25 min	1 x
5	fließendes, 50 °C heißes Leitungswasser	10 min	1 x
6	<i>Aqua dest.</i>	20 sec	1 x
7	Hämalaun	1 min	1 x
8	fließendes Leitungswasser	5 min	1 x

Tabelle 14: Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe

Schritt	Reagenz	Dauer	Wiederholung
1	H ₂ O	10 sec	1 x
2	Ethanol 70 %	1 min	1 x
3	Ethanol 96 %	2 min	2 x
4	Ethanol 100 %	3 min	2 x
5	Xylol	3 min	2 x

4.3.5 Alcianblau-PAS-Färbung

Alcianblau-Lösung, die einen pH-Wert von 2,5 aufweist, dient dem Nachweis saurer Mukosubstanzen (Glykosaminoglykane), die in einem leuchtenden hellblau angefärbt werden. Die Alcianblau-PAS-Färbung als Kombination zweier ausdrucksstarker Polysaccharid-Färbungen bietet optimale Bedingungen für die Detektion von Mukus in den Atemwegen und schleimhaltigen Becherzellen, wobei diese Färbung vor allem bei der Bestimmung der Schleimmenge (*Mucus volume density*) in den Atemwegen genutzt wurde (Tabelle 15).

Tabelle 15: Färbeprotokoll Alcianblau-PAS-Färbung

Schritt	Reagenz	Dauer	Wiederholung
1	3 %ige Essigsäure	3 min	1 x
2	Alcianblau-Lösung	2 Std	1 x
3	fließendes Leitungswasser	5 min	1 x
4	Spülen in Aqua dest.		-
5	0,5 %ige Perjodsäure	30 min	1 x
6	fließendes Leitungswasser	5 min	1 x
7	Spülen in Aqua dest.		1 x
8	Schiff'sche Reagenz	30 min	1 x
9	fließendes Leitungswasser	10 min	1 x
10	Spülen in Aqua dest.		1 x
11	Hämalaun	10 min	1 x
12	Leitungswasser	10 min	1 x

4.4 Durchführung und Kriterien der lichtmikroskopischen Beurteilung

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Schnittpräparate wurden mit einem Olympus BX41 Mikroskop bei bis zu 600-facher Vergrößerung vorgenommen. Die zu untersuchenden Lokalisationen in dem kranialen, mittleren und kaudalen Abschnitt der Trachea wurden makroskopisch durch die Schnittführung an definierten Stellen festgelegt, wie bereits beschrieben wurde (4.3.1, Abb. 9). Bei jedem Tier wurden in der PAS-Färbung jeweils 3 Bronchien und 3 Trachealquerschnitte durchgemustert und ausgezählt. Die Lokalisationen in der Lunge wurden dabei an Hand ihrer Bronchialdurchmesser eingeteilt (Tabelle 16):

Tabelle 16: Einteilung der Bronchien an Hand der Durchmesser ihrer Innenlumen

	Große Bronchien (L1)	Mittelgroße Bronchien (L2)	Kleine Bronchien (L3)
Durchmesser	> 246 µm	245-150 µm	< 149 µm

4.4.1 Bestimmung der intraluminalen Mukusakkumulation (*mucus plugging*)

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung wurde als erstes Kriterium die Akkumulation von Mukus in den Atemwegen (engl. *mucus plugging*) untersucht. In den folgenden Tabellen wurde das Score-System dargestellt, wobei die Beurteilung der Trachea nach einem selbst entwickelten System erfolgte (Tabelle 17). Das Punktesystem zur Beurteilung der Bronchien im Lungenparenchym wurde der Literatur entnommen (LIVRAGHI *et al.*, 2009) und in Tabelle 18 dargestellt:

Tabelle 17: Score-System der intraluminalen Mukusakkumulationen in der Trachea

Score	Kriterium
0	Kein PAS- positives Material im Lumen
1	Teilweise oder vollständige PAS- positive Wandauskleidung
2	< 50 % des Lumens mit PAS- positivem Material verlegt
3	> 50 % des Lumens mit PAS- positivem Material verlegt

Tabelle 18: Score-System der intraluminalen Mukusakkumulationen in der Lunge, nach Livraghi et al. 2009

Score	Kriterium
0	Keine Obstruktion
1	ein Bronchus teilweise / total mit Mukus verlegt
2	zwei Bronchien teilweise / total mit Mukus verlegt
3	drei oder mehr Bronchien teilweise / total mit Mukus verlegt

4.4.2 Bestimmung der Mukusmenge in den Atemwegen (*Mucus volume density*)

In den Alcianblau-PAS gefärbten histologischen Präparaten der Lunge wurden alle angeschnittenen Atemwege mit einem Durchmesser von 150 µm-245 µm (L2) und >246 µm (L1) mit dem bereits beschriebenen Fotomikroskop und der Software *analySIS® (analySIS® Five, Digital Imaging Solutions 2004; Soft Imaging System)* fotografiert (Abb. 10 A). Die Atemwege wurden anschließend aus den Fotos mit der Bildbearbeitungssoftware *Artweaver (Boris Eyrich Software 2011, Bad Waldsee, Deutschland)* an der Basalmembran ausgeschnitten, wobei die Basalmembran selbst nicht mit ausgeschnitten wurde (Abb. 10 B). Die ausgeschnittenen Atemwege wurden in eine neue Vorlage mit weißem Hintergrund kopiert. Mit einem Auswahlwerkzeug des Programmes *Artweaver (Boris Eyrich Software 2011, Bad Waldsee, Deutschland)* wurden der Mukus sowie mukushaltige Zellen ausgewählt und grün eingefärbt (Abb. 10 C). Mit der Bildbearbeitungssoftware *analySIS® (analySIS® Five, Digital Imaging Solutions 2004; Soft Imaging System)* wurde der eingefärbte Mukus anschließend durch Anpassung des Farbschwellenwertes detektiert.

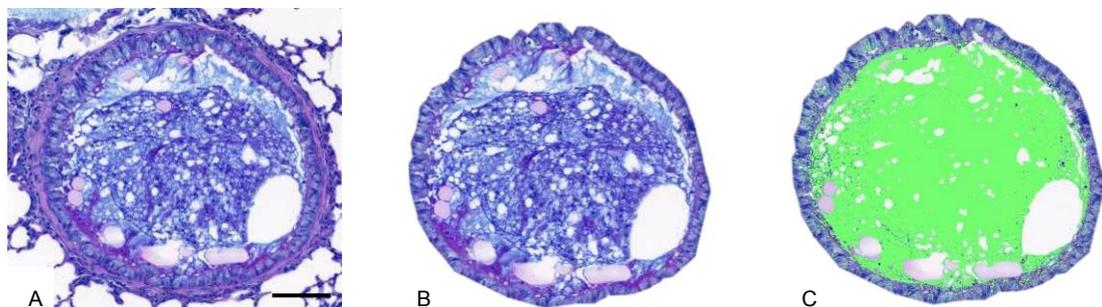


Abb. 10: Darstellung der Arbeitsschritte bei der Bestimmung der *Mucus volume density*

A: Fotografieren des Bronchus, B: Ausschneiden des Bronchus entlang der Basalmembran, C: Einfärben des Mukus, Balken=100 µm

Bei der anschließenden Phasenanalyse errechnete die Software *analySIS® (analySIS® Five, Digital Imaging Solutions 2004; Soft Imaging System)* die Größe der detektierten Mukusfläche in μm^2 . Die Fläche des gesamten Atemweges sowie dessen Umfang wurden mit einem geschlossenen Polygon entlang der Basalmembran ermittelt. Anschließend wurde die *Mucus volume density* nach folgender Formel berechnet:

$$\text{mucus volume density} = \frac{\text{Mukusfläche } (\mu\text{m}^2) \times \pi}{(\text{nl/mm}^2) \quad \text{Umfang } (\mu\text{m}) \times 4}$$

Die Auswertung erfolgte getrennt nach Genotypen und Altersgruppen, wobei die Bronchien an Hand ihres Durchmessers in große und mittelgroße Bronchien eingeteilt wurden (Tabelle 16). In die Auswertung gelangte pro Tier jeweils der Bronchus, der die größte *Mucus volume density* aufwies, um das größte Ausmaß der Schleimakkumulationen zu erfassen.

4.4.3 **Bestimmung der Becherzellzahl pro mm Basalmembran (Becherzellhyperplasie / -metaplasie)**

Des Weiteren wurde die Anzahl der Becherzellen normalisiert auf die Länge der Basalmembran bestimmt, wobei die Becherzellen als PAS-positive Zellen definiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte getrennt nach Lokalisationen. Die Länge der Basalmembran wurde unter Nutzung des beschriebenen Fotomikroskops und der Software *analySIS® (analySIS® Five, Digital Imaging Solutions 2004; Soft Imaging System)* über die gesamte Länge nachgezeichnet, vermessen und photographisch dokumentiert. Daraufhin wurde in 600-facher Vergrößerung die Anzahl der Becherzellen bestimmt und tabellarisch mit Microsoft Excel dokumentiert.

4.4.4 **Bestimmung der Epithelhöhen (Epithelzellhypertrophie)**

Neben der Untersuchung auf intraluminale Schleimakkumulationen, der Bestimmung der Anzahl der Becherzellen pro mm Basalmembran und der Mukusmenge wurde als weiterer histologischer Untersuchungsparameter die Epithelhöhe zur Identifikation einer Epithelzellhypertrophie gemessen. In jedem untersuchten Bronchial- und Trachealquerschnitt wurde die Epithelhöhe gemessen. Dabei wurde jede Epithelzelle vermessen, die von der Basalmembran bis zu den Kinozilien vollständig dargestellt war, sodass von der tatsächlichen Epithelhöhe ausgegangen werden konnte. Epithelzellen, die diese Kriterien nicht erfüllten,

wurden nicht vermessen. Auch hier erfolgte eine fotografische und tabellarische Dokumentation der Ergebnisse.

4.4.5 Detektion von Entzündungszellen (Entzündung)

Die HE gefärbten histologischen Präparate wurden mikroskopisch auf das Vorkommen von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten) untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf ein intraluminales Vorkommen von Entzündungszellen in den Atemwegen gelegt. Die Entzündungszellen wurden anschließend identifiziert, quantifiziert und vergleichend zwischen den Genotypen und Altersgruppen ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der Entzündungszellen nach folgendem Score-System ausgewertet:

Tabelle 19: Score-System der Entzündungszellen in den Atemwegen

Score	Kriterium
0	0-2 Entzündungszellen in den Atemwegen
1	3-10 Entzündungszellen in den Atemwegen
2	11-50 Entzündungszellen in den Atemwegen
3	über 50 Entzündungszellen in den Atemwegen

4.5 Differenzielle Genexpressionsanalyse

4.5.1 RNA-Isolierung

Neben der Isolierung genomischer DNA als Grundlage für die Genotypisierung der Mäuse, erfolgte die Isolierung der RNA für die differenzielle Genanalyse aus der rechten Lungenhälfte. Diese diente als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription (4.5.2) und anschließend als cDNA für die quantitative Echtzeit-PCR (4.5.3) sowie für die Untersuchung mittels DNA-Microassay (4.5.4).

4.5.1.1 Durchführung der RNA-Isolierung aus Lungengewebe

Die RNA wurde unter Nutzung des *RNA Prep Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)* isoliert. Dabei befanden sich alle Reagenzien und Proben fortwährend auf Eis, um eine Degradierung der labilen RNA zu verhindern. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei 13.000 x g und einer Zentrifugentemperatur von 4 °C. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden ent-

sprechend der Arbeitsvorschriften des Herstellers durchgeführt und können dem Informationsblatt entnommen werden.

4.5.1.2 **Quantitative RNA-Analytik- Messung der Reinheit und Konzentration am NanoDrop®**

Die Konzentration der isolierten RNA wurde am NanoDrop® (*Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland*) gemessen. Dazu wurde bei Programmstart der Menüpunkt „Nucleic acid“ ausgewählt. Der Probenhalter wurde anschließend mit 2 µl Nuklease- freiem Wasser gereinigt und 1,5 µl des Lösungsmittels der RNA, das in diesem Fall ebenfalls Nuklease- freies Wasser war, auf den Probenhalter pipettiert, um den Nullpunkt entsprechend des verwendeten Lösungsmittels einzustellen. Das Programmmenü RNA40 wurde gewählt und jeweils 1 µl der zu kontrollierenden RNA-Proben auf den Probenhalter pipettiert und gemessen. Die Ausgabe der Messergebnisse der einzelnen Proben erfolgte graphisch in Form einer Kurve, wobei die Wellenlängen (x-Achse) und die 10 mm-Absorption (y-Achse) gegeneinander aufgetragen wurden. Dabei wird das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm dargestellt. In diesem Wellenlängenbereich können Substanzen, die die Absorptionsmessung beeinflussen, detektiert werden. Weiterhin erfolgte die Ausgabe der Konzentration (ng/µl) und der 260/280- und 260/230-Quotienten als Reinheitsparameter, wobei eine 260/280-Ratio um 2,0 und eine 260/230-Ratio zwischen 2,0 und 2,2 für eine qualitativ hochwertige RNA-Lösung mit lediglich minimaler Verunreinigung durch Proteine spricht. Anschließend wurde die eluierte RNA bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

4.5.1.3 **Qualitative RNA-Analytik- Messung der Reinheit und Konzentration mittels Bioanalyzer**

Die Qualität und Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurden zusätzlich mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese unter Nutzung des RNA 6000-Nano-LabChip-Kits (*Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland*) überprüft. Dabei konnten parallel bis zu 12 RNA-Proben hinsichtlich ihrer Konzentration und Größe untersucht werden. Die RNA wurde zuvor mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5-500 ng/µl verdünnt und anschließend in die Vertiefungen des Analyse-Chips pipettiert. Auf den Chip wirkte während der Analyse ein elektrisches Feld, welches die Proben und den mitgeführten Standard über Mikrokanäle in eine Trennkapillare weiterleitete. In dem Trennkanal erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Probenkomponenten entsprechend

ihrer Fragmentgröße. Die Detektion der RNA-Fragmente erfolgte mittels eines eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes. Die Daten wurden als gelartige Bilder in Form von Banden sowie als Elektropherogramm dargestellt. Die Untersuchungen am Agilent 2100 Bioanalyzer erfolgten am Institut für Veterinärphysiologie der Freien Universität Berlin. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Softwarevariante der Firma Agilent, die für alle untersuchten RNA-Proben eine *RNA integrity Number* (RIN) ermittelt. So wurde eine standardisierte Charakterisierung der Integrität und damit der Qualität der isolierten Gesamt-RNA von RIN=1 als „komplett degradiert“ bis RIN=10 „ohne Degradierung“ ermöglicht. Die im Zuge dieser Arbeit isolierten RNA-Proben aus Lungengewebe wiesen eine RIN von 6,1 bis 8,3 auf und erfüllten damit die Qualitätsansprüche.

4.5.2 Reverse Transkription

4.5.2.1 Grundprinzip der reversen Transkription

Die reverse Transkription entspricht der Umschreibung von RNA in komplementäre (engl. *complementary*) DNA (cDNA) unter Nutzung des Enzyms „Reverse Transkriptase“ und kurzer Primersequenzen. Dabei wird die Sekundärstruktur der RNA bei hohen Temperaturen gelöst und die RNA in cDNA- Fragmente umgeschrieben.

4.5.2.2 Durchführung der reversen Transkription

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, München, Deutschland). Dazu wurde die Konzentration der isolierten RNA mittels NanoDrop® (PepLab, Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) gemessen und in dem Maße verdünnt, dass eine Konzentration von 100 ng RNA in 15 µl Nuklease-freiem Wasser erreicht wurde. Die Herstellung eines Mastermixes erfolgte mit jeweils 4 µl des 5x iScript Reaction Mix (Hexamere) und 1 µl der iScript Reverse Transcriptase pro Probe (Tabelle 20), sodass jeweils 5 µl des Mastermix und 15 µl der verdünnten RNA in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert wurden.

Tabelle 20: Mastermix „iScript“, reverse Transkription

Reagenzien	Volumen	
RNA	15 µl	100 ng in 15 µl Nuklease-freiem H ₂ O
5x iScript Reaction Mix	4 µl	
iScript Reverse Transcriptase	1 µl	
Ansatzvolumen pro Probe	20 µl	

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers (*T3000, Biometra® biomedizinische Analytik, Göttingen, Deutschland*) nach folgendem Protokoll:

Tabelle 21: Temperatur-Zeit-Protokoll der Reversen Transkription (cDNA-Synthese)

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Anlagerung	25 °C	5 min.
Transkription	42 °C	30 min.
Enzyminaktivierung	85 °C	5 min.
Kühlung bis zur Entnahme	4 °C	∞

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

4.5.3.1 Grundprinzip der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Im Gegensatz zu der konventionellen PCR, die höchstens ein semiquantitatives Verfahren darstellt, erlaubt die Real-time-PCR (RT-PCR, quantitative Echtzeit-PCR) während der exponentiellen Vervielfältigung der DNA deren quantitative Beurteilung. Das Prinzip beruht dabei auf einer Fluoreszenzmessung nach der Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen in die DNA. Durch die Bildung von Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplexen nimmt die Fluoreszenz zu, wobei die Intensität der Fluoreszenz direkt mit der DNA-Menge korreliert. Die Quantifizierung erfolgt nach Abschluss des Laufes in der exponentiellen Phase der PCR, da nur in den frühen Zyklen optimale Reaktionsbedingungen für eine exponentielle Vermehrung der DNA vorherrschen. Mit zunehmender Zyklusanzahl kommt es zu einem Anstieg der Störeinflüsse sowie zu einer qualitativen Minderung der Polymerase und der Oligonukleotide. Es stehen verschiedene Methoden der quantitativen Echtzeit-PCR zur Verfügung, wobei im Folgenden das Prinzip der in dieser Arbeit genutzten Varianten mittels des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green I (4.5.3.2) und mittels der Hydrolyse- bzw. Taqman-Sonden (4.5.3.3) näher vorgestellt werden soll.

4.5.3.2 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit SYBR Green I

SYBR Green I als Cyanin-Farbstoff dient bei der quantitativen Echtzeit-PCR der Detektion doppelsträngiger DNA. Dabei bildet SYBR Green I Komplexe mit doppelsträngiger DNA und erhöht so deren Fluoreszenz. Als nachteilig ist dabei jedoch die relativ geringe Spezifität zu

bewerten, da neben doppelsträngigen PCR-Produkten auch unerwünschte Primer-Dimere zu einer Fluoreszenzerhöhung beitragen können. Daher ist die abschließende Analyse der Schmelzkurve bei der Verwendung von SYBR Green I unerlässlich. Dabei wird nach Beendigung des letzten Zyklus im Stadium nahezu konstanter DNA-Konzentrationen aller Proben schrittweise die Temperatur erhöht. Der Fluoreszenzfarbstoff wird wieder freigegeben. Die Aufschmelzung der großen Fragmente der PCR-Produkte erfordert dabei höhere Temperaturen als die Aufschmelzung der Primer-Dimere, die in der Regel als kleinere Fragmente vorliegen. So lässt die Höhe der Peaks in der Schmelzkurve eine Abschätzung der Fragmentgröße und folglich eine Überprüfung der Spezifität der PCR zu.

4.5.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit Taqman

Die quantitative Echtzeit-PCR mit Taqmansonden erfolgt unter Nutzung des Phänomens des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Dabei handelt es sich um einen physikalischen Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung. Kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die komplementär zur Ziel-DNA und mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, werden als Taqmansonden oder Hydrolysesonden bezeichnet. Dabei befindet sich an den in dieser Arbeit genutzten Taqmansonden an deren 5'-Ende der Donor-Fluoreszenzfarbstoff FAM und an deren 3'-Ende der Quencher bzw. Akzeptorfarbstoff TAMRA oder BHQ (*Black Hole Quencher*), wobei die Energie von dem angeregten Donor auf den Akzeptor übertragen wird. BHQ-markierte Akzeptoren besitzen gegenüber anderen Akzeptoren wie TAMRA den Vorteil, dass sie so genannte „dunkle“ Quencher sind, die selbst keine Fluoreszenz abgeben. Folglich senken sie die Hintergrundfluoreszenz und erhöhen das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu TAMRA. Die Taq-Polymerase besitzt 5'-3' Exonuklease-Aktivität und baut bei der Synthese des DNA-Gegenstranges die Sonde von ihrem 5'-Ende her ab. Dabei kommt es zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor. Das in dieser Folge zunehmende Fluoreszenzsignal des Donors wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Amplifikatmenge zu.

4.5.3.4 Auswahl der Primer für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Als Grundlage für die Auswahl der Primer dienten verschiedene Kriterien, die bereits beschrieben wurden (4.2.3.1). Die Sequenzen der Primer und Sonden für die Muzingene *muc5b* (*Mus musculus mucin 5, subtype B*) und *muc4* (*Mus musculus mucin 4*) (TETAERT *et al.*, 2007) sowie für *mCLCA3* (BRAUN *et al.*, 2010) wurden der Literatur entnommen. Die Primer und Sonden des Muzingens *muc5ac* sowie der potentiellen Referenzgene wurden der

MATERIAL UND METHODEN

RT-Primer Database der Universität Genth entnommen (<http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/>, 08/2010) und sind in Tabelle 22 ersichtlich:

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 22: Sequenzen der Primer und Sonden für die qPCR und deren Amplikongröße

Funktion	Symbol und Gen- Name	Primer- / Sonden- Sequenzen (5'→3') und Größe in Basenpaaren (bp)	Amplikon-größe
Referenz- gen	Actb Actin-beta	Vorwärts AGCCATGTACGTAGCCATCCA 21	81 bp
		Rückwärts TCTCCGGAGTCCATCACAATG 21	
		Sonde FAM-TGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-TAMRA 28	
Referenz- gen	B2m beta-2-Microglobulin	Vorwärts ATTCACCCCACTGAGACTGA 21	86 bp
		Rückwärts CTCGATCCCAGTAGACGGTC 20	
		Sonde FAM-TGCAGAGTTAAGCATGACAGTATGGCCG-TAMRA 28	
Referenz- gen	Gapdh Glyceraldehyd-3- Phosphat- Dehydrogenase	Vorwärts: TCACCACCATGGAGAAGGC 19	169 bp
		Rückwärts GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA 20	
		Sonde: FAM-ATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGT-TAMRA 25	
Referenz- gen	Hmbs Hydroxymethylbilan e- Synthase	Vorwärts CCACAACCGCGGAAGAAA 18	106 bp
		Rückwärts TTCAGCATCGCCACCACAG 19	
		Sonde FAM-CGTAAGAGCCAGCTGGCTCGCATACAGAC-TAMRA 29	
Referenz- gen	Hprt-1 Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl- Transferase	Vorwärts TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA 22	224 bp
		Rückwärts TGAGAGATCATCTCCACCAATAACTT 26	
		Sonde FAM-TGGGAGGCCATCACAATTGTGGC-TAMRA 23	
Unter- suchtes Gen	<i>Muc5a</i> Muzin 5, Subtyp A & C	Vorwärts GCGTGGAGAATGAAAAGTATGCT 23	120 bp
		Rückwärts CATAATGCAGTTCGAGAAGAAG 23	
		Sonde FAM-CCCAGTGCCACGCCACCGTG-TAMRA 20	
Unter- suchtes Gen	<i>Muc5b</i> Muzin 5, Subtyp B	Vorwärts GCACGTAAATGCGACTGTCT 20	154 bp
		Rückwärts ATGGACCTTGCTCTCCTGAC 20	
		Sonde FAM-TATCCAAGTACTCCATGGAGGCC-TAMRA 24	
Unter- suchtes Gen	<i>Muc4</i> Muzin 4	Vorwärts GTCCACTTCTCCCATCTC 20	102 bp
		Rückwärts GTAGCCTTTGTAGCCATCACAT 22	
		Sonde FAM-CCAGGACCAGATGGCTCTGAACCT-TAMRA 24	
Unter- suchtes Gen	mCLCA3 murine Chloride channel calcium activated regulator 3	Vorwärts GAAATCCCCAGCCCTGTAACAG 23	144 bp
		Rückwärts TCGGCACCTGCTCCGTATC 20	
		Sonde FAM-CAAGCATTGCGCAAGGAGCCTCGCC-BHQ 25	

4.5.3.4.1 Primer-Test mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion

Zusätzlich zu der Primer-Test-PCR mittels SYBR GREEN I (4.5.3.4.2) wurden alle Primer mittels konventioneller PCR getestet. Dabei gestatteten die Größen der in der Gelelektrophorese ausgebildeten Banden eine weitere Beurteilung der PCR-Produkte hinsichtlich Spezifität und Funktionalität der Primer. Pro Primer-Paar wurden jeweils 6 gepoolte Lungen-cDNA-Proben von C57BL/6- Mäusen sowie eine Negativkontrolle (NTC, engl. *no template control*) mit dem in Tabelle 23 dargestellten Ansatz bei einem Temperaturgradienten von 55-65 °C untersucht (Tabelle 24), um die optimale Anlagerungstemperatur zu detektieren, wie bereits beschrieben wurde (4.2.3.1).

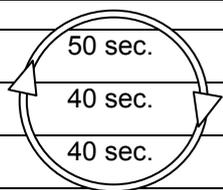
Tabelle 23: PCR-Mix „Primer-Test“ für konventionelle PCR

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
10 x Dream Taq Buffer Green	5 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
Primer forward, 20 pmol/µl	1 µl
Primer reverse, 20 pmol/µl	1 µl
Dream Taq Polymerase	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	40,75 µl
Template (genom. DNA)	1 µl
Ansatzvolumen pro Probe	50 µl

Tabelle 24: Zeit-Temperatur-Programm „Primer-Test“ für konventionelle PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	50 sec.
Anlagerung der Primer	55-65 °C	40 sec.
Elongation	72 °C	40 sec.
Finale Verlängerung	72 °C	10 min.
Kühlung bis zur Entnahme	4 °C	∞

35 x



4.5.3.4.2 **Primer-Test mittels SYBR Green I**

Alle Primer wurden zu Beginn der Untersuchungen hinsichtlich ihrer Funktionalität und Spezifität getestet, wobei die quantitative Echtzeit-PCR auf Basis von SYBR Green I an Hand der Schmelzkurvenanalyse die Detektion möglicher Primerdimere ermöglicht und nach folgendem Protokoll angesetzt wurde:

Tabelle 25: PCR-Mix „Primer-Test mit SYBR green I“

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Primer forward, 20 pmol/µl	0,34 µl
Primer reverse, 20 pmol/µl	0,34 µl
Nuklease-freies Wasser	6,82 µl
Template (genom. DNA) <500 ng	5 µl
Ansatzvolumen pro Probe	25 µl

Tabelle 26: Temperatur-Zeit-Protokoll „Primer-Test mit SYBR green I“

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	
Anlagerung der Primer	60 °C	
Elongation	72 °C	
Schmelzkurve	95 °C	1 min
Temperaturgradient 0,2 °C	60-95 °C	je 2 sec., final 30 sec.

4.5.3.4.3 **Sequenzierung der Amplifikate**

Erst die Sequenzierung der Amplifikate aus den Primer-Test-PCRs (4.5.3.4.1 und 4.5.3.4.2) identifizierte die PCR-Produkte exakt, sodass die Primer endgültig hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktionalität beurteilt werden konnten. Dabei wurden die Sequenzen der Amplifikate abschließend mit den zu amplifizierenden Sequenzen der DNA verglichen. Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte durch *Sequence Laboratories (Seqlab, Göttingen, Deutschland, <http://www.seqlab.de>)*.

4.5.3.5 **Standardreihen für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion**

4.5.3.5.1 **Grundprinzip der Standardreihen**

Die Verwendung von Verdünnungsreihen ermöglicht als mitgeführter externer oder interner Standard die absolute Quantifizierung von DNA bei der Beurteilung von Genexpressionen. Dabei wird eine bekannte Menge an DNA in der Ausgangslösung in definierten Stufen verdünnt und mittels quantitativer Echtzeit-PCR amplifiziert. Die zugehörige Standardkurve gestattet anschließend die absolute Quantifizierung. Weiterhin können an Hand der Verdünnungsreihen die PCR-Effizienz, der Arbeitsbereich und die Regressionsdaten auf verschiedenen Konzentrationsniveaus überprüft werden.

4.5.3.5.2 **Durchführung der Standardreihen**

Als Ausgangslösung für die zehnstufigen Verdünnungsreihen für die einzelnen Gene, die in dieser Arbeit untersucht wurden, dienten mittels *Nucleo Spin® Extract II* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigte PCR-Produkte aus der Primertest-PCR (4.5.3.4.2). Die Konzentration der PCR-Produkte wurde mit dem Nanodrop ermittelt. Die erste Verdünnungsstufe wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 1 ng/µl eingestellt, sodass die Startkopienzahl als bekannt vorausgesetzt werden konnte. Die zweite Stufe wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt. Alle weiteren Verdünnungen erfolgten im Verhältnis 1:10.

4.5.3.6 **Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion**

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde nach Tabelle 27 und Tabelle 28 in dem Quantitativen-PCR-Gerät MX 3000P (*Stratagene, La Jolla, USA*) durchgeführt. Um das Fehlerpotential durch Ausreißer zu minimieren, wurde jede Probe in dreifacher Ausführung als Triplikat untersucht. Die Negativkontrollen-Triplikate (*No-template*-Kontrollen) enthielten anstatt der Template-DNA Nuklease-freies Wasser. Die Auswertung erfolgte mit der Software MX Pro (*Stratagene, La Jolla, USA*). Es gelangten lediglich Ergebnisse in die Auswertung, deren Ct-Werte (engl. *threshold cycle*) zwischen mindestens zwei der Triplikate je Probe nicht weiter als um den Faktor 0,5 schwankten, wobei es sich bei den Ct-Werten um ein Maß der anfänglichen DNA-Konzentration zu Beginn der exponentiellen Phase der quantitativen PCR handelt. Dabei beschreibt der Ct-Wert den Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Fluoreszenz des Hintergrundes ansteigt. Als zweite grundlegende Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Daten wurden negative *No-template*-Kontrollen

festgelegt. Erst nach der Reproduzierbarkeit der Daten in mindestens einer Wiederholung gelangten die Ergebnisse in die Auswertung.

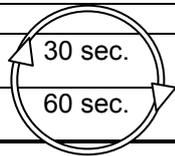
Tabelle 27: PCR-Mix „qPCR“

Reagenzien	Eingesetztes Volumen pro Probe
Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)	7,8 µl
Primer forward, 20 pmol/µl	0,3 µl
Primer reverse, 20 pmol/µl	0,3 µl
Sonde / Probe 100pmol/µm	0,04 µl
Nuklease-freies Wasser	5,56 µl
Template (genom. DNA)	1 µl
Ansatzvolumen pro Probe	15 µl

Tabelle 28: Temperatur-Zeit-Protokoll „qPCR“

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
Zyklische Denaturierung	95 °C	30 sec.
Anlagerung der Primer / Elongation	60 °C	60 sec.

40 x



4.5.3.7 Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mittels geNorm

Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR wurden nach Vandesample hinsichtlich der drei stabilsten Referenzgene unter Anwendung des geNorm-Algorithmus (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>, 11/2011) und der Software Microsoft Excel ausgewertet (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Referenzgene stellen die Gene dar, die unabhängig und dabei stetig in derselben Höhe exprimiert werden, wohingegen regulierte Gene in ihrer Expressionshöhe starken Schwankungen unterliegen. Die Normalisierung der Ergebnisse gegen die stabilsten Referenzgene bei der Messung der relativen Genexpression ist von essentieller Bedeutung, um die genaue Ausgangsmenge der cDNA in den verschiedenen Proben zu ermitteln, da es in jedem einzelnen Arbeitsschritt bei der Aufbereitung der cDNA zu minimalen Differenzen zwischen den Proben kommen kann, beispielsweise hinsichtlich

des Probenvolumens, der RNA-Qualität oder der Effizienz der reversen Transkription. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass alle Bearbeitungsschritte der Probe in demselben Maße sowohl auf das gesuchte Gen (engl. *gene of interest*) als auch auf das Referenzgen einwirken. Die Auswahl der stabilsten Referenzgene ist dabei die entscheidende Grundlage, die mittels der Software geNorm gewährleistet werden kann. Dabei werden die qPCR-Daten der potentiellen Referenzgene in der Software erfasst, hinsichtlich der relativen Exprimierungsrate jedes Einzelgens analysiert und eine Rangfolge der stabilsten Referenzgene erstellt. Weiterhin ermittelt geNorm die optimale Anzahl an Referenzgenen, deren geometrisches Mittel für eine optimale Normalisierung genutzt werden sollte.

4.5.4 DNA-Microarray

4.5.4.1 Funktionsprinzip des DNA-Microarrays

Die DNA-Microarray-Technologie als ein hochmodernes, molekularbiologisches Verfahren ermöglicht die Untersuchung der relativen Änderung der Genexpression vergleichend zwischen verschiedenen Proben. Dabei können bis zu 46.000 bekannte Gene pro Genchip untersucht werden. Der zugrunde liegende Genchip ist dabei in bis zu 46.000 Felder unterteilt, die mit einzelsträngiger DNA beschichtet sind. Die aus den zu untersuchenden Proben isolierte RNA wird in cDNA umgeschrieben und mit einem roten sowie einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dabei werden an die isolierte RNA hohe Qualitätsansprüche im Hinblick auf deren Reinheit und Integrität gestellt. Bei komplementärer Basenfolge bindet die markierte cDNA an die entsprechenden DNA-Sequenzen auf dem Genchip, sodass die Position, die Wellenlänge und die Intensität der entstehenden Mischfarbe mittels einer Laserkamera detektiert werden können und die Interpretation der differentiellen Genexpression der zu untersuchenden Proben ermöglicht wird.

4.5.4.2 Durchführung des DNA-Microarrays

Die differentielle Genexpression mittels Microarray-Technologie wurde von der Firma febit biomed (*Heidelberg, Deutschland*) mittels eines Oligonukleotid-Mikrochips mit 22.497 belegten Genen durchgeführt. Dabei wurde die Genexpression für stellvertretend 3 männliche Tiere im Alter von neun Wochen pro Genotyp der Spezies *Mus musculus* in aus Lungengewebe isolierter RNA als Einzelproben untersucht. Der Belegungscode kann im Anhang (Tabelle 74) eingesehen werden. Anfangs wurden alle eingesandten RNA-Proben von der Firma febit erneut hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität kontrolliert, um transportbedingte Qualitätsverluste zu identifizieren. Unter Nutzung des Agilent 2100 Bioanalyzers mit

dem RNA 6000 Nano Kit wurden die Proben hinsichtlich ihrer RIN (*RNA integrity number*) als ein qualitatives Maß der Unversehrtheit bzw. des Degradationsstatus der RNA analysiert. Dabei zeigt sich RNA hoher Qualität bei der Auswertung im Elektropherogramm in Form zweier Peaks, die die 18S- und die 28S-Untereinheit der rRNA repräsentieren. Des Weiteren wurde die 260/280-Ratio am Nanodrop bestimmt. Dabei konnte febit die ausgezeichnete Qualität der RNA bestätigen und die RNA anschließend mittels des MessageAmpTMII-Biotin Enhanced RNA Kit in cDNA und nachfolgend in cRNA umschreiben. Dabei wurde nach Gebrauchsanweisung jeweils 1 µg der totalen RNA eingesetzt. Daraufhin wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und mit einem Aufteilungspuffer fragmentiert. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer hinzu gegeben. Die Hybridisierung erfolgte automatisch für 16 Stunden bei 45 °C unter Nutzung des Geniom RT® Analyzers (*febit, Heidelberg, Deutschland*).

Tabelle 29: fragmentation buffer, febit

Reagenzien	Volumen
Tris, pH 8,1, 200 mM	20 ml
Magnesiumacetat, 150 mM	15 ml
Kaliumacetat, 500 mM	50 ml
DEPC-H ₂ O	15 ml
Ansatzvolumen	100 ml

Anschließend wurde der Genchip einer Waschung unterzogen. In dem nachfolgenden Arbeitsschritt der Markierung wurde der Primerverlängerungsassay (*microfluidic-based primer extension assay*) appliziert. Dieser Assay nutzt die gebundene mRNA als Primer für eine enzymatische Verlängerung mit gekennzeichneten Nukleotiden bei 37 °C für 15 Minuten. Anschließend erfolgte ein erneuter maschineller Waschvorgang. Für ein Maximum an Sensitivität wurde Biotin und dessen Detektion mittels Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) in Kombination mit einem speziellen Signal-Verstärkungsverfahren (*consecutive signal enhancement, CSE*) der Firma febit eingesetzt. Innerhalb weniger Millisekunden erfolgte abschließend die Signalverarbeitung und -berechnung.

4.5.4.3 Auswertung des DNA-Microarrays

Die Auswertung des DNA-Microarrays wurde von der Firma febit biomed GmbH (*Heidelberg, Deutschland*) durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Einfluss des Hintergrundes des Chips auf die Expression korrigiert (engl. *background subtraction*) und nach anschließender Regulierung der Unterschiede zwischen den einzelnen Arrays durch Normalisierung konnte die erste statistische Analyse erfolgen. Danach erfolgte das hierarchische Clustering, wobei die Expressionsdaten in „Heatmaps“ dargestellt wurden. Grüne Bereiche zeigten Gene mit reduzierter Expression an, rote Felder hingegen spiegelten Gene mit gesteigerter Expression wider. Nun konnte die differenzielle Expressionsanalyse erfolgen, wobei unter anderem der t-Test und die Ermittlung der *Fold changes* durchgeführt wurden und deregulierte mRNAs identifiziert werden konnten.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sämtlicher Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes IBM SPSS Statistics 19 sowie mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Biometrie der Freien Universität Berlin. Dabei wurde ein Hauptaugenmerk auf die deskriptive Statistik gelegt, um mittels Kenntnis der Lage- und Streumaße einen genauen Überblick über die Verteilung der Daten erlangen zu können. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Daten hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen und Altersgruppen. Bei fehlender Normalverteilung der Daten erfolgte die weitere Untersuchung mit dem verteilungsfreien, nichtparametrischen Rangfolgentest „Mann-Whitney-U-Test“, wobei $p < 0,05$ als statistische Signifikanz eingestuft wurde. Die Darstellung der Daten erfolgte anschließend graphisch in Form von Boxplot-Diagrammen mit Median (Balken, der die Box teilt), Ausreißern (Kreise) und Extremwerten (Sterne). Die Box selbst stellt dabei die mittleren 50 % aller Werte dar. Die Darstellung der Ergebnisse der Score-Systeme erfolgte als Mittelwerte und Standardabweichungen in Form von Balkendiagrammen.

Die statistische Auswertung der differenziellen Genexpression mittels Microarray-Technologie wurde von der Firma febit biomed GmbH (*Heidelberg, Deutschland*) vorgenommen.

5 Ergebnisse

Für eine bessere Übersichtlichkeit wird im Folgenden stets die gleiche Reihenfolge der Genotypen in den Abbildungen eingehalten:

ENaC-tg/ m3-ko	ENaC-tg/ m3-wt	ENaC-wt/ m3-ko	ENaC-wt/ m3-wt
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in Vergleichsgruppen, wobei jeder Genotyp mit dem jeweils passenden Genotyp hinsichtlich des ENaC-Status sowie des m3-Status ausgewertet wird. Dabei liegt das 95 % Konfidenzintervall mit $p < 0,05$ einer statistischen Signifikanz zugrunde. Für eine bessere Übersichtlichkeit wird im Folgenden immer die gleiche Reihenfolge der Vergleichsgruppen eingehalten:

ENaC-tg/ m3-ko vs. ENaC-tg/ m3-wt	ENaC-tg/ m3-ko vs. ENaC-wt/ m3-ko	ENaC-tg/ m3-wt vs. ENaC-wt/ m3-wt	ENaC-wt/ m3-ko vs. ENaC-wt/ m3-wt
---	---	---	---

5.1 Einfluss der Genotypen auf das Körpergewicht

Um einen Einfluss der Genotypen auf die physische Entwicklung der Mäuse zu detektieren, erfolgte die Bestimmung der Körpergewichte, wobei ein möglicher Einfluss des Geschlechts der Tiere auf deren Körpergewicht nicht näher untersucht wurde.

5.1.1 Juvenile Tiere

Bei der Bestimmung der Körpergewichte der juvenilen Tiere wurden nur dezente Unterschiede ohne statistische und mutmaßlich biologische Signifikanz zwischen den Genotypen detektiert (Abb. 11, Tabelle 38). Dabei lagen 50 % der Körpergewichte der juvenilen Mäuse des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zwischen 7,7 und 9,2 g, bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-wt

ERGEBNISSE

zwischen 6,8 und 8,8 g, bei dem Genotyp ENaC-wt/m3-ko zwischen 6,3 und 8,3 g und bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt zwischen 7,0 und 8,5 g.

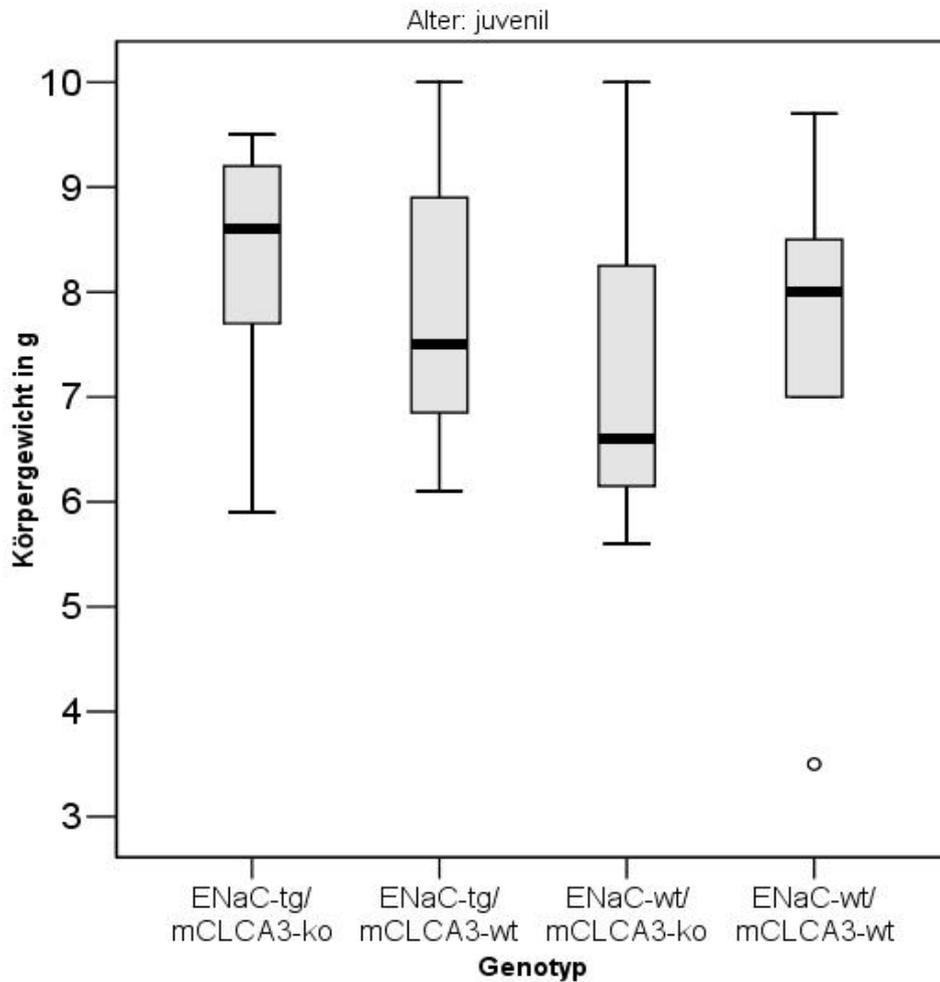


Abb. 11: Körpergewichte der juvenilen Tiere

Körpergewicht in g der juvenilen Tiere (14 Tage), Boxplot-Diagramm, $n=5-8$; tg= transgen, wt= Wildtyp, ko= knock-out

5.1.2 Adulte Tiere

Statistisch signifikante und biologische Unterschiede zwischen den Genotypen der adulten Tiere bestanden hinsichtlich ihrer Körpergewichte nicht (Abb. 12, Tabelle 39). Dabei lagen 50 % der Körpergewichte der adulten Mäuse des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zwischen 20,3 und 24,7 g, bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-wt zwischen 20,8 und 27,1g, bei dem Genotyp ENaC-

wt/m3-ko zwischen 17,9 und 29,2 g und bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt zwischen 19,6 und 26,2 g.

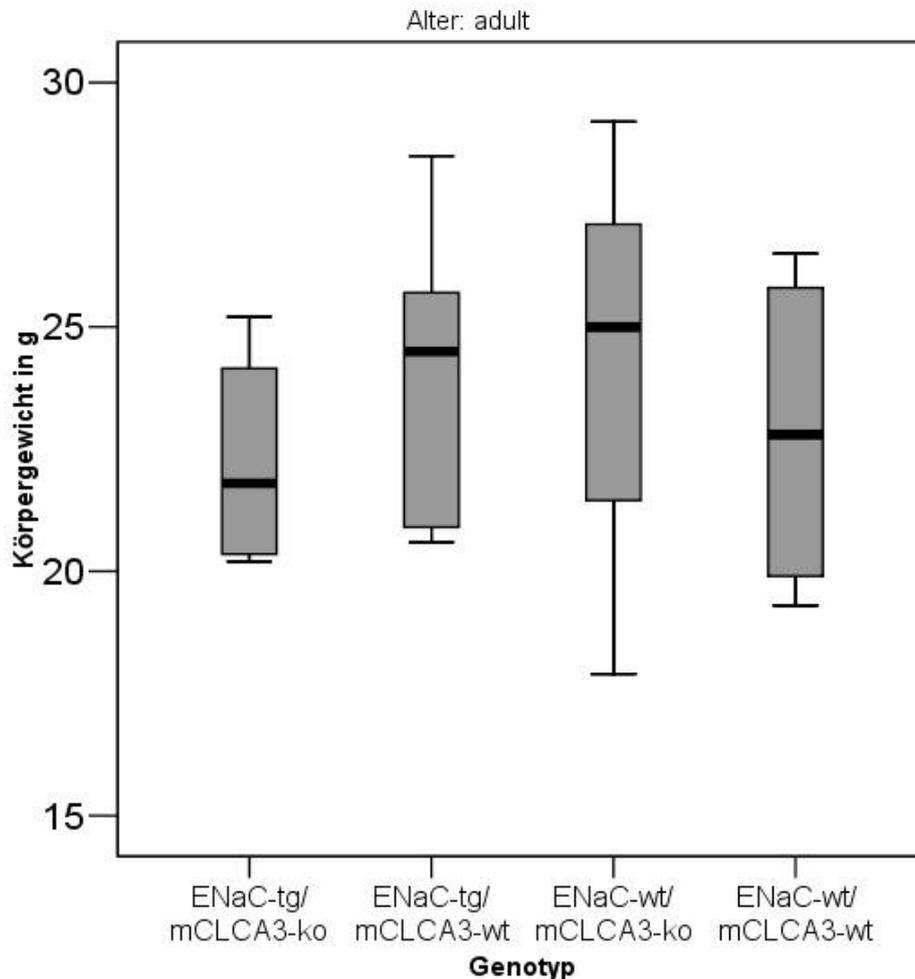


Abb. 12: Körpergewichte der adulten Tiere

Körpergewicht in g der adulten Tiere (9 Wochen), Boxplot-Diagramm, n=5; tg= transgen, wt= Wildtyp, ko= knock-out

5.2 Einfluss der Genotypen auf pathomorphologische und -morphometrische Parameter im Respirationstrakt

5.2.1 Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt

Da ENaC-transgene Mäuse deutliche intraluminale Schleimakkumulationen in den Atemwegen zeigen (MALL *et al.*, 2004), erfolgte die Untersuchung der Mukusakkumulationen im Respirationstrakt vergleichend zwischen den Genotypen in beiden Altersgruppen, wobei die

Auswertung an Hand zweier Score-Systeme für die Trachea (Tabelle 17) und die Bronchien (Tabelle 18) erfolgte.

5.2.1.1 Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der juvenilen Tiere

Die nachfolgende Darstellung (Abb. 13 A) zeigt zusammenfassend die deskriptive Statistik der Daten über die intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der juvenilen Mäuse, die im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben wird.

5.2.1.1.1 Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt

Sowohl die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko als auch des Genotyps ENaC-tg/m3-wt wiesen deutliche intraluminale Schleimakkumulationen im Respirationstrakt auf. Dabei fanden sich bei beiden Genotypen im Kehlkopfnahen Bereich der Trachea (T1) lediglich dezente Schleimmengen in Form einer PAS-positive Wandauskleidung, wohingegen das Lumen der Trachealmittelnähe beider Genotypen bis zu 50 % mit Mukus verlegt wurde. In dem kaudalen Trachealabschnitt wurde das Lumen bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko bis zu 50 %, bei dem Vergleichsgenotyp zu mehr als 50 % mit Schleim verlegt. Im Bronchialsystem der Lunge fanden sich bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zwischen zwei und drei, bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt hingegen im Mittel 1,5 durch Mukus verlegte Bronchien (Abb. 13 A).

5.2.1.1.2 Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko

Bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fanden sich mehr intraluminale Schleimakkumulationen als bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko, die lediglich durch moderate Schleimmengen gekennzeichnet waren. Dabei fanden sich bei beiden Genotypen in dem kranialen Trachealabschnitt sowie bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko auch in der Mitte der Trachea PAS-positive Wandauskleidungen, während bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in der mittleren Trachea etwa 50 % des Lumens durch Mukus verlegt waren. Das Tracheallumen des kaudalen Abschnitts wurde bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko über 50 %, bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko bis zu 50 % durch Schleim verlegt. In der Lunge fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko bis zu drei mit Schleim gekennzeichnete Bronchien, wohingegen der Vergleichsgenotyp maximal einen mit Mukus akkumulierten Bronchus aufwies, wobei sich dieser Unterschied als statistisch signifikant zeigte (Abb. 13 A).

5.2.1.1.3 **Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt wurden durch deutliche Mukusakkumulationen im Respirationstrakt gekennzeichnet, während die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt nur dezente Schleimmengen aufwiesen. Der kraniale Abschnitt der Trachea zeigte sich dabei bei beiden Genotypen, sowie die Mitte der Trachea bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt, mit einer unvollständigen PAS-positiven Wandauskleidung. Bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt fanden sich deutliche Schleimakkumulationen im weiteren Verlauf der Trachea, wobei in dem mittleren Trachealabschnitt 50 % in dem kaudalen Anteil der Trachea mehr als 50 % des Lumen mit Schleim verlegt waren. Im Gegensatz dazu fand sich in dem kaudalen Abschnitt der Trachea des Vergleichsgenotyps kein intraluminales PAS-positives Material, wobei sich dieser Unterschied als statistisch signifikant zeigte. Im Lungenparenchym wiesen bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt ein bis zwei Bronchien Schleimakkumulationen auf, während sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt kein bis maximal ein Bronchus mit intraluminalem Schleim zeigte (Abb. 13 A).

5.2.1.1.4 **Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko zeigten moderate Schleimmengen im Respirationstrakt, wohingegen die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt lediglich dezente Mukusmengen aufwiesen. Dabei fand sich in dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko eine PAS-positive Wandauskleidung, wohingegen die Tiere des Vergleichsgenotyps lediglich dezente Mukusspuren aufwiesen, sodass in dem kranialen Abschnitt der Trachea statistische Signifikanz gefunden werden konnte. In dem kaudalen Trachealabschnitt wurde das Lumen der Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko bis zu 50 % mit Mukus verlegt, wohingegen bei den Tieren des Vergleichsgenotyps in dieser Lokalisation kein Mukus detektiert werden konnte. Im Bronchialsystem zeigte sich bei beiden Genotypen kein bis maximal ein Bronchus mit Schleim akkumuliert (Abb. 13 A).

5.2.1.2 **Einfluss der Genotypen auf intraluminale Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der adulten Tiere**

Die deskriptive Statistik der intraluminalen Mukusakkumulationen im Respirationstrakt der adulten Tiere ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 13 B) dargestellt und wird im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben.

5.2.1.2.1 **Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko wiesen in der gesamten Trachea eine PAS-positive Wandauskleidung auf, während sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt lediglich Spuren von Schleim an der Wandauskleidung der Trachea fanden, wobei sich in der Mitte der Trachea statistische Signifikanz zeigte. Im Lungenparenchym fand sich bei den adulten Tieren beider Genotypen im Mittel ein durch Mukus verlegter Bronchus (Abb. 13 B).

5.2.1.2.2 **Vergleich: ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

Bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fanden sich moderate Schleimakkumulationen als PAS-positive Wandauskleidung in der gesamten Trachea, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko lediglich in dem kaudalen Abschnitt der Trachea Spuren eines PAS-positiven Mukus im Bereich der Wandauskleidung aufwiesen. In der Lunge fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko ein bis zwei mit Mukus akkumulierte Bronchien. Im Gegensatz dazu konnte in den Bronchien der adulten Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko kein Schleim identifiziert werden. Statistische Signifikanz fand sich sowohl in dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea, als auch in der Lunge (Abb. 13 B).

5.2.1.2.3 **Vergleich: ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die adulten Tiere beider Genotypen wiesen in der gesamten Trachea vergleichbar dezente Schleimspuren im Bereich der Wandauskleidung auf. Während bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt im Mittel ein Bronchus im Lungenparenchym mit Schleim verlegt war, konnte bei den Tieren des Genotyps im Mittel kein Bronchus mit intraluminalem Mukus detektiert werden (Abb. 13 B).

5.2.1.2.4 **Vergleich: ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die adulten Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko zeigten sich nahezu frei von Mukus im Respirationstrakt, lediglich in dem kaudalen Abschnitt der Trachea fanden sich dezente Schleimmengen im Bereich der Wandauskleidung. Im Gegensatz dazu wiesen die adulten Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt in der gesamten Trachea dezente Mukusmengen auf, wobei im Lungenparenchym kein bis maximal ein Bronchus PAS-positives Material aufwies (Abb. 13 B).

5.2.1.3 Zusammenfassende Betrachtung der intraluminalen Mukusakkumulation

Die juvenilen Tiere aller Genotypen wiesen größere Mukusmengen im Respirationstrakt als die adulten Tiere auf. In beiden Altersgruppen konnten bei den ENaC-tg Tieren deutlich größere Mengen an PAS-positivem Material detektiert werden als bei den ENaC-wt Tieren. Dabei ähnelten sich die juvenilen Tiere beider ENaC-tg Genotypen im Schweregrad ihrer Mukusakkumulationen in der Trachea, wohingegen die ENaC-tg/m3-ko Tiere in der Lunge eine größere Anzahl an Bronchien mit akkumuliertem Mukus aufwiesen als die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt. In der adulten Altersgruppe hingegen änderte sich das Bild insofern, dass die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko mehr Schleimverlegungen in der Trachea gegenüber den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt zeigten, sich jedoch hinsichtlich der Anzahl der mit Mukus akkumulierten Bronchien stark ähnelten. Im Gegensatz dazu stellten sich beide Altersgruppen der ENaC-wt Genotypen im gesamten Respirationstrakt sehr Mukus-arm dar. Wiesen die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko in der Trachea noch eine tendenziell erhöhte Mukusmenge auf, so zeigten sie sich in der adulten Altersgruppe sowohl in der Trachea als auch in den Bronchien als nahezu frei von Mukus. Die Altersgruppen der reinen wt-Tiere unterschieden sich kaum in der Ausprägung ihrer geringen Mukusakkumulation, wobei die juvenilen Tiere dezent mehr PAS-positives Material als die adulten Tiere aufwiesen.

ERGEBNISSE

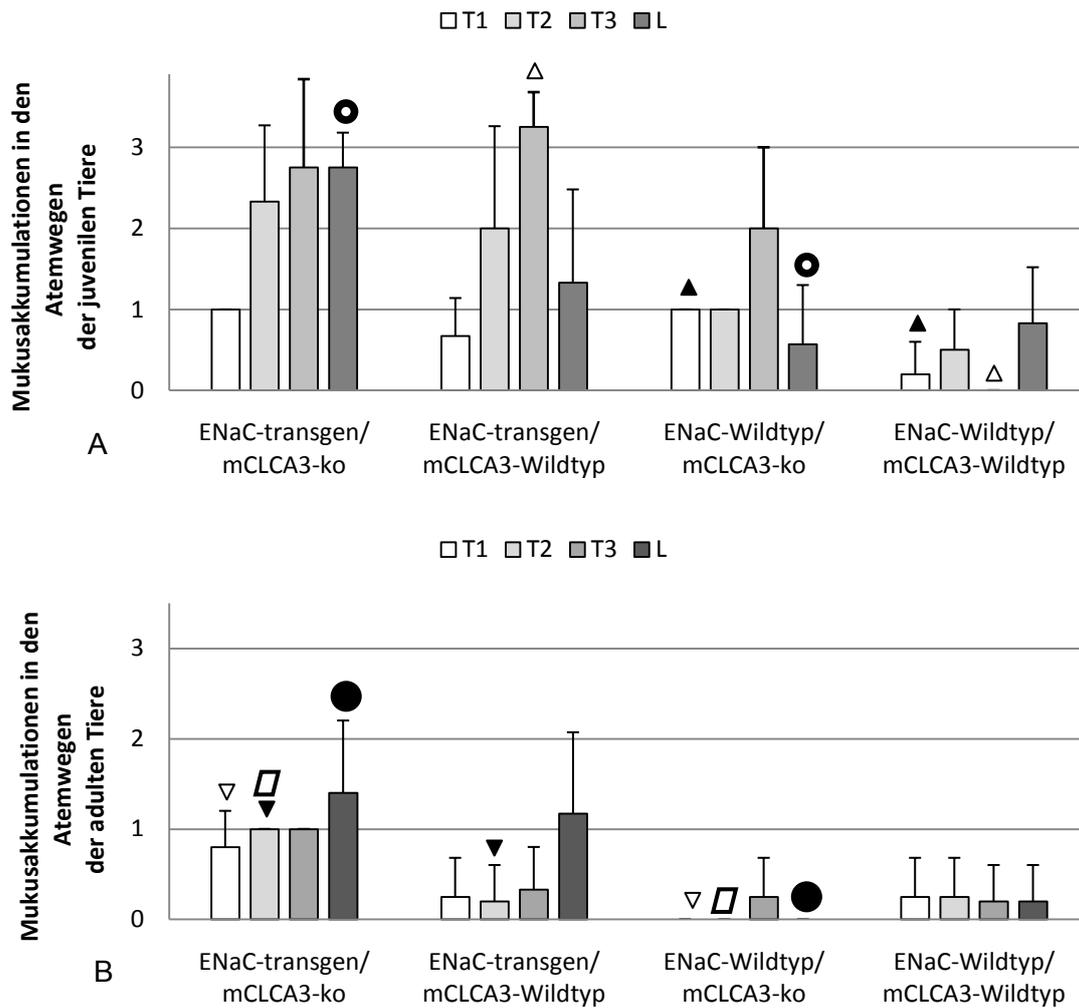


Abb. 13: Mukusakkumulationen der juvenilen und adulten Tiere

Intraluminale Mukusakkumulation der juvenilen (A) und adulten (B) Tiere in den Atemwegen als Mittelwerte mit Standardabweichungen, T1=Trachea, kranialer Abschnitt, T2=Trachea, Mitte, T3=Trachea, kaudaler Abschnitt, L=Bronchien, Score für die Trachea: 0=kein PAS-positives Material im Lumen, 1=teilweise / vollständige PAS-positive Wandauskleidung, 2=maximal 50 % des Lumens mit PAS-positivem Material verlegt, 3=mehr als 50 % des Lumens mit PAS-positivem Material verlegt; Score für die Lunge: 0=kein Bronchus mit Mukus verlegt, 1=ein Bronchus mit Mukus verlegt, 2=zwei Bronchien mit Mukus verlegt, 3=drei und mehr Bronchien mit Mukus verlegt, ko=knock-out, n=5; Statistische Signifikanzen ($p < 0,05$, T-Test) sind nicht zwischen verschiedenen Lokalisationen, sondern nur zwischen den Genotypen und den jeweiligen selben Lokalisationen dargestellt und mit gleichen Symbolen gekennzeichnet.

5.2.2 Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge

Die Bestimmung der Mukusmenge pro mm² respiratorischer Fläche erlaubt eine genaue Quantifizierung der Verschleimung der Atemwege. Da ENaC-transgene Mäuse durch eine erhöhte Mukusmenge (engl. *Mucus volume density*) in den Atemwegen charakterisiert sind (MALL *et al.*, 2008), erfolgte deren Bestimmung vergleichend zwischen den Genotypen und Altersgruppen in den großen (L1) und mittelgroßen Bronchien (L2). In der nachfolgenden Abbildung wurden repräsentative Anschnitte der großen Bronchien mit Schleimakkumulationen bei den einzelnen Genotypen der adulten Tiere dargestellt.

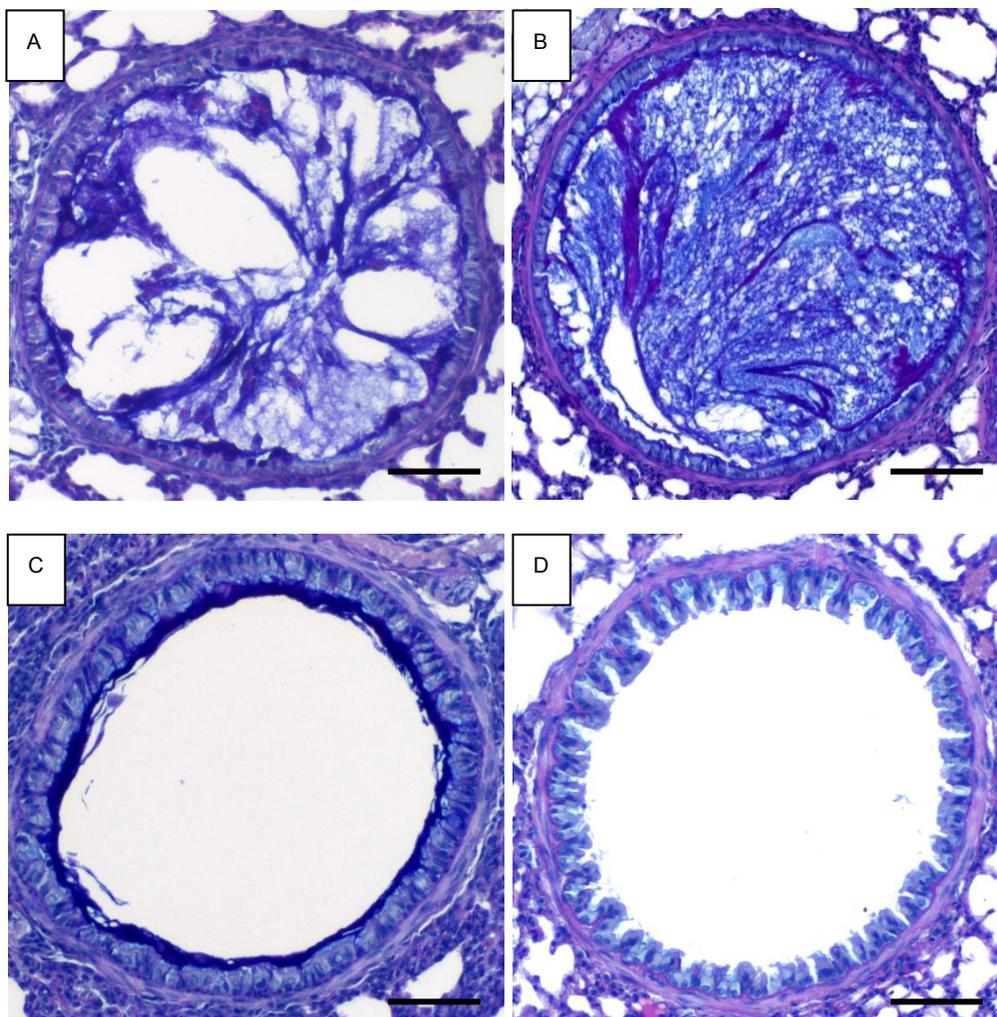


Abb. 14: Typische Mukusakkumulationen in den großen Bronchien der adulten Tiere

A: ENaC-tg/m3-ko, B: ENaC-tg/m3-wt, C: ENaC-wt/m3-ko, D: ENaC-wt/m3-wt, Alcianblau-PAS, Balken=100 μ m

5.2.2.1 Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge in den Atemwegen der juvenilen Tiere

Die nachfolgende Darstellung (Abb. 15 A) zeigt zusammenfassend die deskriptive Statistik der Daten über die *Mucus volume density* im Respirationstrakt der juvenilen Mäuse, die im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben wird.

5.2.2.1.1 ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/ mCLCA3-wt

Bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fand sich in den großen Bronchien eine etwa halb so große *Mucus volume density* wie bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt, wohingegen in den mittelgroßen Bronchien eine annähernd gleich stark ausgeprägte *Mucus volume density* beider Genotypen identifiziert werden konnte. Dabei stellte sich die *Mucus volume density* bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in den großen und mittelgroßen Bronchien in gleicher Ausprägung dar, wohingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in den großen Bronchien der doppelte Wert im Vergleich zu den mittelgroßen Bronchien nachgewiesen werden konnte (Abb. 15 A, Tabelle 40, Tabelle 42).

5.2.2.1.2 ENaC-tg/ m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko

In den großen Bronchien konnte bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko eine etwa doppelt so hohe, in den mittelgroßen Bronchien eine 4-fache *Mucus volume density* wie bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko identifiziert werden. Dabei fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko keine Unterschiede zwischen der *Mucus volume density* in den großen und mittelgroßen Bronchien, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko in den großen Bronchien eine um etwa zwei Drittel größere *Mucus volume density* als in den mittelgroßen Bronchien aufwiesen (Abb. 15 A, Tabelle 40, Tabelle 42).

5.2.2.1.3 ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/ m3-wt

In den großen Bronchien wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt eine etwa 7-fache und damit statistisch signifikant höhere, in den mittelgroßen Bronchien eine etwa 2,5-fach höhere *Mucus volume density* als die Tiere des Genotyps ENaC-wt/ m3-wt auf. Dabei konnte bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in den großen Bronchien die doppelte Höhe der *Mucus volume density* im Vergleich zu den mittelgroßen Bronchien nachgewiesen werden. Bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt unterschied sich die Ausprägung der

Mucus volume density zwischen den großen und mittelgroßen Bronchien nicht wesentlich (Abb. 15 A, Tabelle 40, Tabelle 42).

5.2.2.1.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In den großen Bronchien fand sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko eine unwesentlich größere Mukusmenge als bei dem Vergleichsgenotyp, wohingegen in den mittelgroßen Bronchien keine Unterschiede detektiert werden konnten (Abb. 15 A, Tabelle 40, Tabelle 42).

5.2.2.2 **Einfluss der Genotypen auf die Mukusmenge in den Atemwegen der adulten Tiere**

Die deskriptive Statistik der *Mucus volume density* im Respirationstrakt der adulten Tiere ist in der nachfolgenden Grafik (Abb. 15 B) dargestellt und wird im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben.

5.2.2.2.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fand sich in den großen Bronchien eine etwa halb so große, in den mittelgroßen Bronchien eine etwa um zwei Drittel geringere und damit statistisch signifikante *Mucus volume density* im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt. Dabei stellte sich die *Mucus volume density* bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in den großen Bronchien etwa in 5-facher Ausprägung, bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in etwa doppelter Ausprägung im Vergleich zu den mittelgroßen Bronchien dar (Abb. 15 B, Tabelle 41, Tabelle 43).

5.2.2.2.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

In den großen Bronchien konnte bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko eine etwa 4-fache, in den mittelgroßen Bronchien eine doppelte *Mucus volume density* wie bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko identifiziert werden. Dabei fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko keine Unterschiede zwischen der *Mucus volume density* in den großen und mittelgroßen Bronchien, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in den großen Bronchien eine etwa 5-fach größere *Mucus volume density* als in den mittelgroßen Bronchien aufwiesen (Abb. 15 B, Tabelle 41, Tabelle 43).

5.2.2.2.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt fand sich in den großen Bronchien eine etwa 6-fach so große, in den mittelgroßen Bronchien eine etwa 7-fach so große und damit in den mittelgroßen Bronchien statistisch signifikante *Mucus volume density* im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt. Dabei stellte sich die *Mucus volume density* bei den Tieren beider Genotypen sowohl in den großen als auch in den mittelgroßen Bronchien in etwa doppelter Ausprägung im Vergleich zu den mittelgroßen Bronchien dar (Abb. 15 B, Tabelle 41, Tabelle 43).

5.2.2.2.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In den großen Bronchien fand sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko eine dezent geringer ausgeprägte *Mucus volume density* als bei dem Vergleichsgenotyp, wohingegen in den mittelgroßen Bronchien keine Unterschiede detektiert werden konnten (Abb. 15 B, Tabelle 41, Tabelle 43).

5.2.2.3 **Zusammenfassende Betrachtung der Mukusmenge**

Die Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt waren sowohl in der juvenilen als auch in der adulten Altersgruppe durch eine erhöhte *Mucus volume density* gekennzeichnet, wobei diese bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-ko bei den juvenilen Tieren in den großen Bronchien und bei den adulten Tieren in den großen und mittelgroßen Bronchien abgeschwächt wurde. Die Tiere der Genotypen ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/m3-wt wiesen in beiden Altersgruppen und Lokalisationen ähnlich niedrige Werte auf (Abb. 15 B, Tabelle 41, Tabelle 43).

ERGEBNISSE

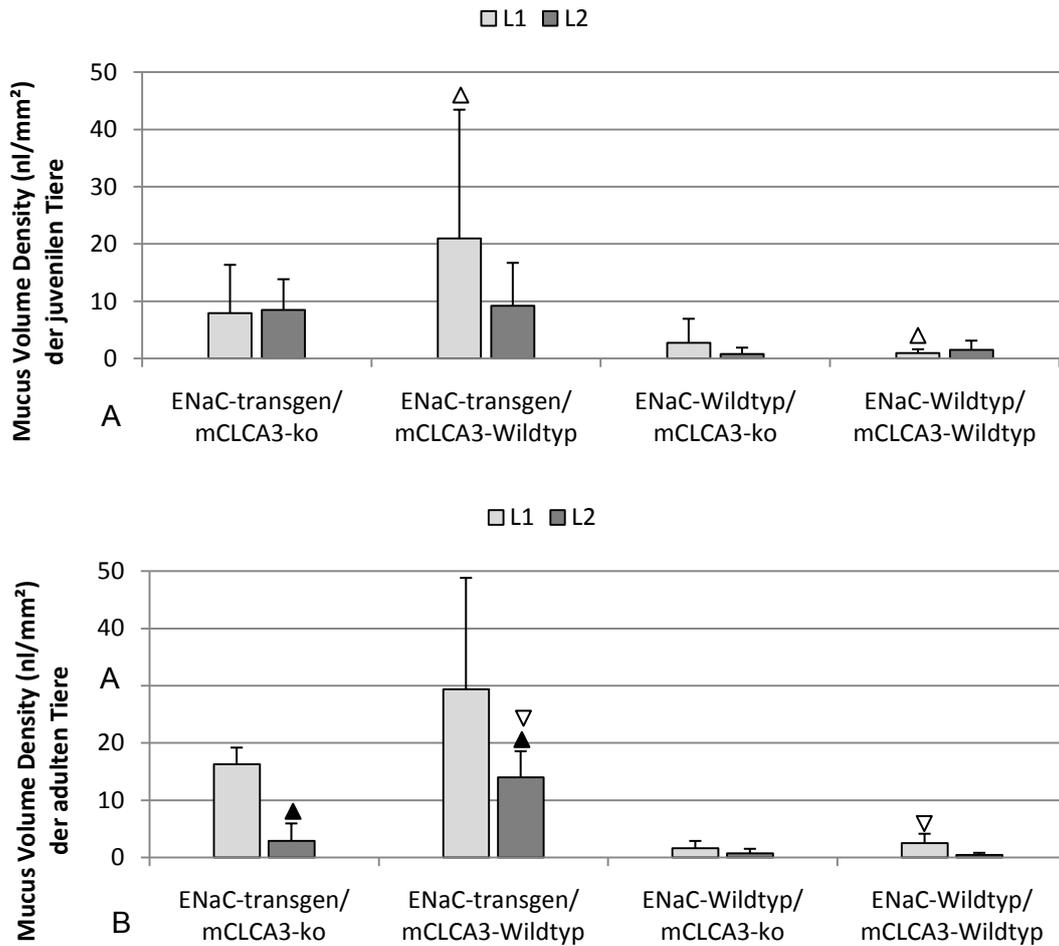


Abb. 15: Mucus volume density der juvenilen und adulten Tiere

Mucus volume density in nl/mm² der juvenilen (A) und adulten (B) Tiere, Mittelwerte mit Standardabweichungen, L1= große Bronchien (Durchmesser >246 μ m); L2= mittelgroße Bronchien (Durchmesser 150-245 μ m); ko=knock-out; gleiche Dreiecke= statistische Signifikanz ($p < 0,05$, U-Test); Mittelwerte und Standardabweichungen wurden an Hand des jeweils Schleim-reichsten Bronchus eines jeden Tieres berechnet, $n=5$; Statistische Signifikanzen sind nicht zwischen verschiedenen Lokalisationen, sondern nur zwischen den Genotypen und den jeweiligen selben Lokalisationen dargestellt und mit gleichen Symbolen gekennzeichnet.

5.2.3 Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran

Da die ENaC-transgenen Mäuse durch eine Becherzellhyperplasie und -metaplasie charakterisiert sind (MALL *et al.*, 2004) und auch für die m3-ko-Tiere ein Einfluss auf die Becherzellanzahl diskutiert wird (LONG *et al.*, 2006), erfolgte die Quantifizierung der Becherzellen bei den verschiedenen Genotypen für beide Altersgruppen vergleichend in den Atemwegen. In der nachfolgenden Abbildung 16 wurden repräsentative Beispiele der Becherzellanzahl der verschiedenen Genotypen der adulten Tiere dargestellt.

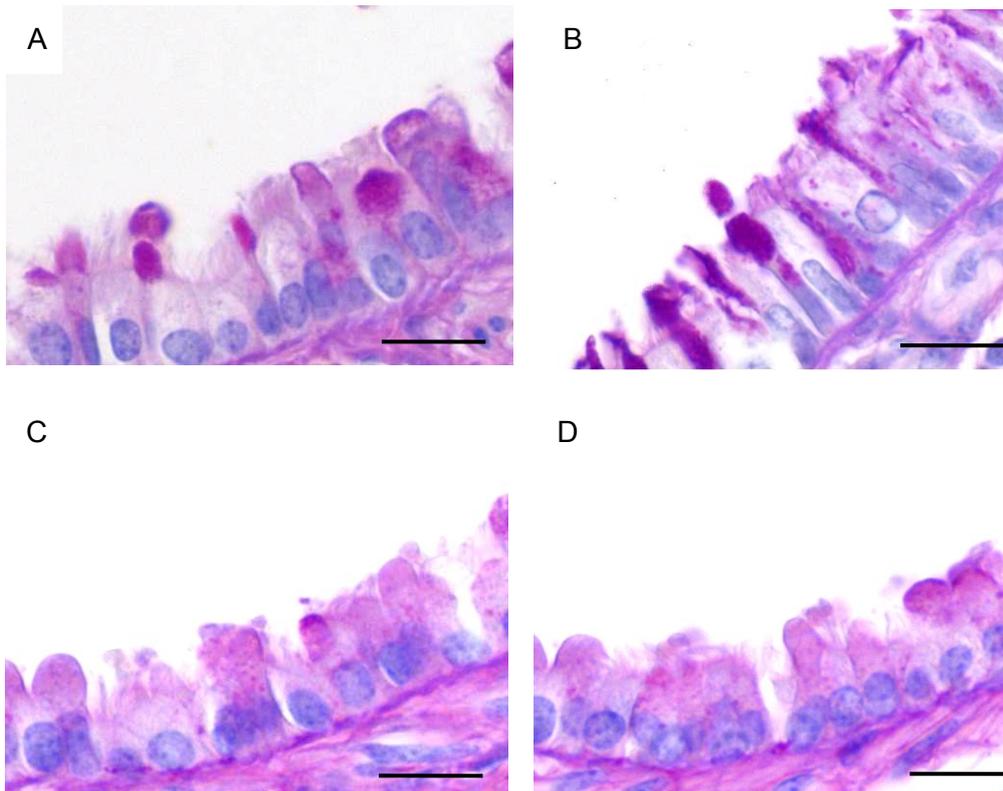


Abb. 16: Repräsentative Darstellung der Becherzellen in den Atemwegen der adulten Tiere, PAS-Reaktion, Balken = 20 μm

A: ENaC-tg/m3-ko, B: ENaC-tg/m3-wt, C: ENaC-wt/m3-ko, D: ENaC-wt/m3-wt

5.2.3.1 Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran bei den juvenilen Tieren

Die nachfolgende Darstellung (Abb 17 A) zeigt zusammenfassend die deskriptive Statistik der Daten über die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran im Respirationstrakt der juveni-

len Mäuse, die im Folgenden vergleichend an Hand des Medians zwischen den Genotypen beschrieben wird.

5.2.3.1.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Im kranialen Bereich der Trachea wiesen die juvenilen Tiere der Genotypen ENaC-tg/ m3-ko und ENaC-tg/m3-wt eine ähnliche Anzahl an Becherzellen pro mm Basalmembran auf, wohingegen sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in der Mitte der Trachea mehr als doppelt so viele und damit statistische signifikant mehr Becherzellen fanden. Im kaudalen Bereich der Trachea zeigten die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko etwa ein Drittel weniger Becherzellen als die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt. In den großen und den mittelgroßen Bronchien wiesen beide Genotypen eine vergleichbare Anzahl an Becherzellen auf. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko im Bereich der kleinen Bronchien keine Becherzellen, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt im Mittel 11 Becherzellen pro mm Basalmembran aufwiesen.

Zusammenfassend fanden sich in den einzelnen Lokalisationen teilweise geringere und teilweise größere Becherzellzahlen, wobei jedoch in der Gesamtheit betrachtet kein Unterschied hinsichtlich der Becherzellzahl pro mm Basalmembran zwischen diesen Vergleichs-genotypen in der juvenilen Altersgruppe festgestellt werden konnte (Abb. 17 A, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.1.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

In dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea fanden sich bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko mehr als doppelt so viele Becherzellen wie bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko. Im kaudalen Bereich der Trachea wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko etwa ein Fünftel weniger Becherzellen pro mm Basalmembran als der Vergleichs-genotyp auf. In den großen Bronchien fanden sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko nahezu doppelt so viele Becherzellen, in den mittelgroßen Bronchien mehr als die 8-fache Anzahl Becherzellen im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko. Bei beiden Genotypen fanden sich im Bereich der kleinen Bronchien keine Becherzellen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko in der Gesamtheit betrachtet bei fehlender statistischer Signifikanz durch eine tendenzielle Becherzellhyperplasie im Respirationstrakt gekennzeichnet sind (Abb. 17 A, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.1.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea fanden sich bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt mehr als doppelt so viele Becherzellen, im kaudalen Bereich der Trachea sogar mehr als die 7-fache Anzahl an Becherzellen im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt. Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in den großen Bronchien etwa ein Viertel weniger Becherzellen als der Vergleichsgenotyp auf, wohingegen sich in den mittelgroßen Bronchien des Genotyps ENaC-tg/m3-wt die 3-fache und in den kleinen Bronchien die 4-fache Anzahl an Becherzellen fand. In der Gesamtheit betrachtet kann gesagt werden, dass die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt bei fehlender statistischer Signifikanz durch eine tendenzielle Becherzellhyperplasie im Respirationstrakt gekennzeichnet sind (Abb. 17 A, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.1.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen Abschnitt der Trachea fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Becherzellanzahl, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko in der Mitte der Trachea nahezu die doppelte Anzahl, in dem kaudalen Trachealabschnitt sogar die 6-fache Anzahl an Becherzellen im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt aufwiesen. Im Bereich der großen Bronchien fanden sich hingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko etwa ein Drittel weniger, in den mittleren Bronchien etwa zwei Drittel weniger Becherzellen als bei dem Vergleichsgenotyp. Keine Becherzellen konnten im Bereich der kleinen Bronchien bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko detektiert werden, wohingegen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt mit 3 Becherzellen pro mm Basalmembran eine sehr niedrige Anzahl aufwiesen. Trotz teilweise reduzierter bzw. erhöhter Becherzellzahlen in den verschiedenen Lokalisationen kann zusammenfassend festgestellt werden, dass das fehlende mCLCA3-Protein in der Gesamtheit betrachtet keinen Einfluss auf die Becherzellzahl bei den juvenilen Tieren nimmt (Abb. 17 A, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.2 **Einfluss der Genotypen auf die Becherzellanzahl pro mm Basalmembran bei den adulten Tieren**

Die deskriptive Statistik der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran im Respirationstrakt der adulten Tiere ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 17 B) dargestellt und wird im Folgenden vergleichend an Hand des Medians zwischen den Genotypen beschrieben.

5.2.3.2.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Im kranialen Bereich der Trachea wiesen die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko im Mittel zwei Drittel weniger Becherzellen auf als die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt, wohingegen sich die Becherzellanzahl in der Mitte der Trachea nur unwesentlich unterschied. In dem kaudalen Bereich der Trachea konnte bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko etwa ein Viertel der Becherzellanzahl des Vergleichsgenotyps detektiert werden. In den großen Bronchien fand sich bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko etwa ein Drittel und in den mittelgroßen und kleinen Bronchien etwa ein Fünftel der Becherzellanzahl des Genotyps ENaC-tg/m3-wt. In der Gesamtheit betrachtet kann gesagt werden, dass das fehlende mCLCA3-Protein bei fehlender statistischer Signifikanz zu einer tendenziell reduzierten Becherzellzahl bei den adulten ENaC-tg Tieren führt (Abb. 17 B, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.2.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

In dem kranialen Abschnitt der Trachea fand sich bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko die 6-fache und in der Mitte der Trachea die 2,5-fache Anzahl an Becherzellen pro mm Basalmembran im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko, wohingegen sich in dem kaudalen Abschnitt der Trachea kein Unterschied fand. In den großen Bronchien wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko etwa die Hälfte der Becherzellanzahl des Vergleichsgenotyps auf. Im Gegensatz dazu konnte in den mittelgroßen Bronchien des Genotyps ENaC-tg/m3-ko die 5-fache, in den kleinen Bronchien die 3-fache Becherzellanzahl im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko detektiert werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko bei fehlender statistischer Signifikanz durch eine tendenzielle Becherzellhyperplasie im Respirationstrakt gekennzeichnet sind (Abb. 17 B, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.2.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt wiesen in der kranialen und kaudalen Abschnitten der Trachea die 4-fache Anzahl an Becherzellen im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt auf, wohingegen sich in der Mitte der Trachea kein Unterschied zwischen den Genotypen fand. In den großen Bronchien konnte bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt die 3-fache, in den mittelgroßen Bronchien die 25-fache und den kleinen Bronchien die 15-fache Becherzellanzahl im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt detektiert werden, sodass hier von einer tendenziellen Becher-

zellhyperplasie und -metaplasie gesprochen werden kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt bei fehlender statistischer Signifikanz durch eine Becherzellhyperplasie im Respirationstrakt gekennzeichnet sind (Abb. 17 B, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.2.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea fand sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko etwa ein Zehntel der Becherzellanzahl des Vergleichsgenotyps ENaC-wt/m3-wt, wohingegen sich in dem kaudalen Trachealabschnitt des Genotyps ENaC-wt/m3-ko die etwa 3-fache Anzahl Becherzellen pro mm Basalmembran fand. In den großen Bronchien wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko die doppelte Menge an Becherzellen auf, wohingegen sich in den mittelgroßen und kleinen Bronchien keine Unterschiede fanden. Bei den adulten Tieren nimmt das fehlende mCLCA3-Protein in der Gesamtheit betrachtet keinen Einfluss auf die Becherzellzahl, trotz teilweise reduzierter bzw. erhöhter Becherzellzahlen in den verschiedenen Lokalisationen (Abb. 17 B, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

5.2.3.3 **Zusammenfassende Betrachtung der Becherzellanzahl**

Bei den juvenilen Tieren zeigten die ENaC-transgenen Tiere tendenziell erhöhte Becherzellzahlen, auch wenn sich dieses in Abhängigkeit von der Lokalisation unterschiedlich stark ausgeprägt darstellte. Der m3-ko Status scheint bei den juvenilen Tieren keinen Einfluss auf die Becherzellzahlen zu nehmen. Die adulten ENaC-tg Tiere wiesen tendenziell mehr Becherzellen als die adulten ENaC-wt-Tiere auf, auch wenn sich dieses in den verschiedenen Lokalisationen unterschiedlich stark ausgeprägt zeigte. Bei den adulten ENaC-tg Tieren mit fehlender m3-Expression fanden sich weniger Becherzellen als bei den adulten ENaC-tg/m3-wt-Tieren, wobei sie den doppel-wt-Tieren hinsichtlich der Becherzellzahl ähnelten, sodass der m3-ko-Status einen Rescue-Effekt auf die Becherzellzahl zumindest bei den adulten Tieren zu haben schien (Abb. 17 B, Tabelle 44 bis Tabelle 49).

ERGEBNISSE

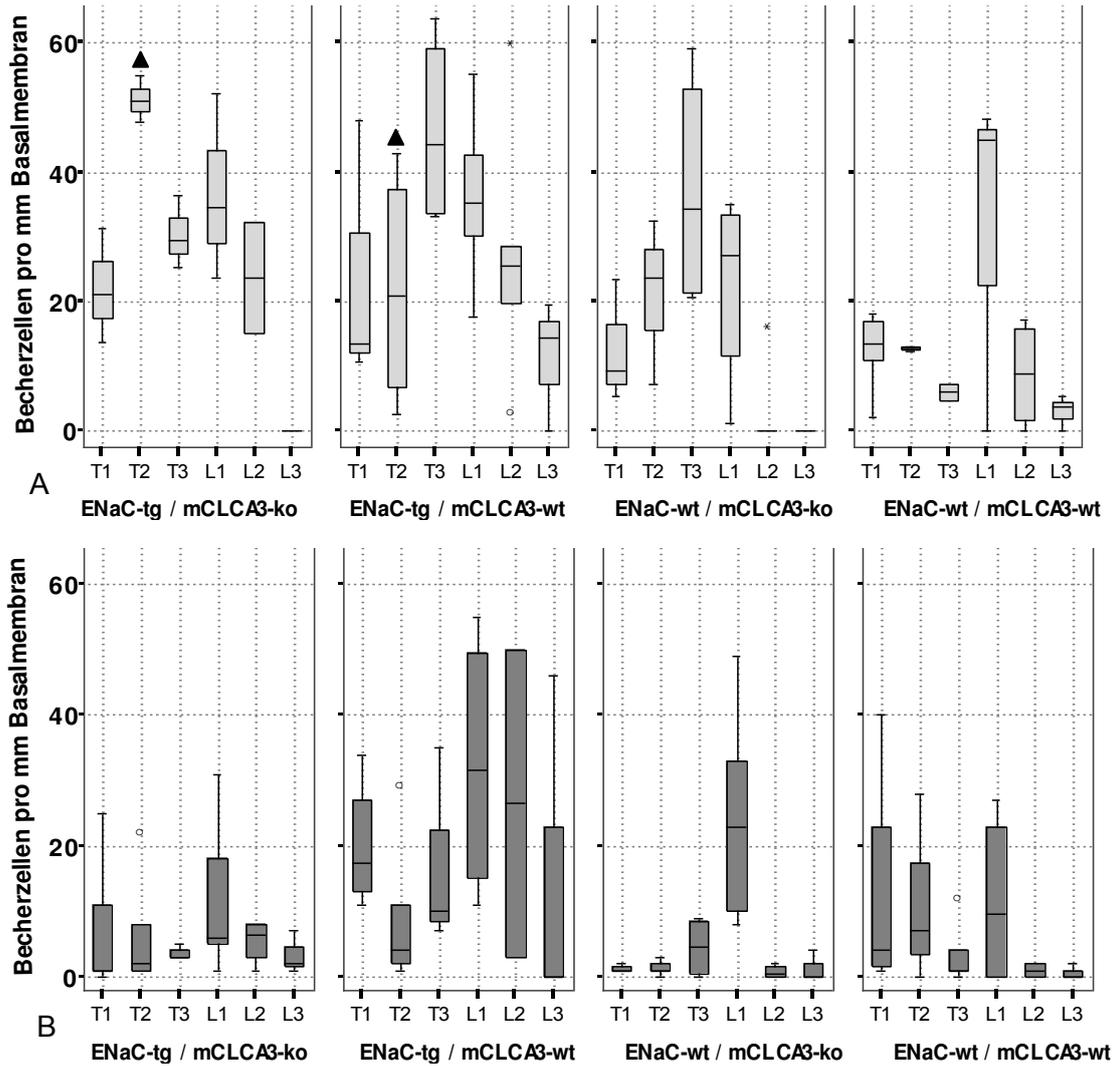


Abb. 17: Becherzellzahlen der juvenilen und adulten Tiere

Vergleichende Darstellung der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran der juvenilen (A) und adulten (B) Tiere nach Lokalisationen in den Atemwegen, Punkt = Extremwert, Dreiecke = statistische Signifikanz ($p < 0,05$, U-Test), $n = 5$; T1= kranialer Abschnitt der Trachea, T2= mittlerer Abschnitt der Trachea, T3= kaudaler Abschnitt der Trachea, L1= große Bronchien (Durchmesser $> 246 \mu\text{m}$), L2= mittelgroße Bronchien (Durchmesser $150\text{-}245 \mu\text{m}$), L3= kleine Bronchien (Durchmesser $< 149 \mu\text{m}$), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out; Statistische Signifikanzen sind nicht zwischen verschiedenen Lokalisationen, sondern nur zwischen den Genotypen und den jeweiligen selben Lokalisationen dargestellt und mit gleichen Symbolen (Dreiecke) gekennzeichnet.

5.2.3.4 Die Becherzellzahlen pro mm Basalmembran der Einzeltiere

Die Anzahl der Becherzellen der Einzeltiere in den einzelnen Lokalisationen wurde in Balkendiagrammen dargestellt, wobei diese im Anhang (12.1.5) einzusehen sind. Die Diagramme gestatten einen Überblick über den Einfluss der Einzelwerte auf die weiteren Untersuchungen.

5.2.3.5 Weiterführende statistische Auswertung der Becherzellanzahl

Die deskriptive Statistik der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran kann in tabellarischer Form im Anhang eingesehen werden (Tabelle 44 bis Tabelle 49). Die Daten der Becherzellzahlen pro mm Basalmembran stellten sich als nicht normalverteilt dar, sodass die statistische Auswertung und Untersuchung auf Signifikanz mit dem nichtparametrischen Rangfolgen-Test „Mann-Whitney-Test“ erfolgte, wobei statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ eingestuft wurde. Die Ergebnisse aller Einzelvergleiche kann in tabellarischer Form im Anhang eingesehen werden (12.1.7.1).

5.2.4 Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen

Da die ENaC-transgenen Mäuse durch eine Epithelzellhypertrophie charakterisiert sind (MALL *et al.*, 2008), erfolgte die Messung der Epithelhöhen vergleichend zwischen den Genotypen und Altersgruppen in den verschiedenen Lokalisationen der Atemwege. Die Darstellung der Epithelhöhen erfolgte in Boxplot-Diagrammen, die einen Eindruck über die Lage und die Streuung der Daten gestatten. Dabei wurden die Einzeltiere entsprechend ihrer Genotypen in Gruppen eingeteilt. Neben der Darstellung als Boxplots erfolgt die deskriptive Statistik mit Minimum, Maximum, Median, Mittelwert und Standardabweichung in tabellarischer Form im Anhang. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 18) wurden die Epithelhöhen der adulten Tiere der verschiedenen Genotypen repräsentativ dargestellt.

ERGEBNISSE

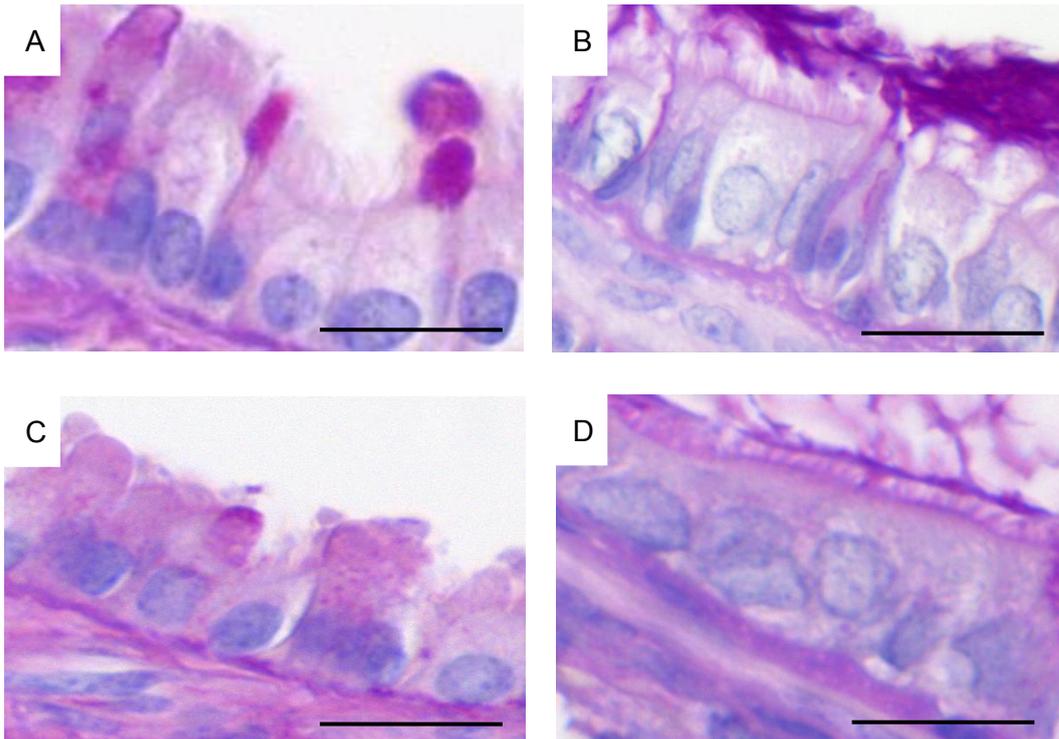


Abb. 18: Repräsentative Darstellungen der Epithelhöhen in den Atemwegen der adulten Tiere, PAS-Reaktion, Balken= 20 μ m;

A: ENaC-tg/m3-ko, B: ENaC-tg/m3-wt, C: ENaC-wt/m3-ko, D: ENaC-wt/m3-wt

5.2.4.1 Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen des Respirationstraktes der juvenilen Tiere

Die nachfolgende Darstellung (Abb. 19 A) zeigt zusammenfassend die deskriptive Statistik der Daten über die Epithelhöhen im Respirationstrakt der juvenilen Mäuse, die im Folgenden vergleichend an Hand des Medians zwischen den Genotypen beschrieben wird.

5.2.4.1.1 ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt

In der gesamten Trachea sowie in den großen Bronchien konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Epithelhöhen zwischen den juvenilen Tieren der Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt detektiert werden. In den mittelgroßen Bronchien fand sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko eine um etwa ein Viertel größere, in den kleinen Bronchien eine um etwa ein Zehntel geringere Epithelhöhe als bei dem Vergleichsgenotyp, wobei in beiden Lokalisationen statistische Signifikanz vorlag (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.1.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

Die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko wiesen in der gesamten Trachea sowie in den großen und mittelgroßen Bronchien eine im Mittel 1,5-fach und damit statistisch signifikant größere Epithelhöhe als die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko im Sinne einer Epithelzellhypertrophie auf, wohingegen in den kleinen Bronchien kein Unterschied detektiert werden konnte (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.1.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

In der gesamten Trachea sowie in den großen Bronchien konnte bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt eine im Mittel 1,5-fach größere Epithelhöhe als bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt detektiert werden. Auch im Bereich der mittelgroßen und kleinen Bronchien konnten größere Epithelhöhen detektiert werden. In allen Lokalisationen fanden sich damit statistisch signifikante Unterschiede im Sinne einer Epithelzellhypertrophie (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.1.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen Trachealabschnitt wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko eine um ein Zehntel geringere Epithelhöhe, in der Mitte der Trachea eine um ein Zehntel größere Epithelhöhe als die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt auf und unterschieden sich dabei in beiden Lokalisationen statistisch signifikant. In dem kaudalen Abschnitt der Trachea sowie in den mittelgroßen und kleinen Bronchien konnten keine Unterschiede detektiert werden (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.2 **Einfluss der Genotypen auf die Epithelhöhen des Respirationstraktes der adulten Tiere**

Die deskriptive Statistik der Epithelhöhen im Respirationstrakt der adulten Tiere ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 19 B) dargestellt und wird im Folgenden vergleichend an Hand des Medians zwischen den Genotypen beschrieben.

5.2.4.2.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

In dem kranialen Trachealabschnitt konnte bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko eine um etwa ein Sechstel größere Epithelhöhe und damit eine Epithelzellhypertrophie detektiert werden, wohingegen sich in dem kaudalen Abschnitt der Trachea und den

großen Bronchien um etwa ein Sechstel geringere Epithelhöhen als bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt fanden, wobei in beiden Lokalisationen der Trachea statistische Signifikanz bestand. In der Mitte der Trachea sowie den mittelgroßen und kleinen Bronchien fanden sich keine Unterschiede (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.2.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

In dem kranialen und kaudalen Abschnitt der Trachea fanden sich bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko 1,3-fach größere Epithelhöhen im Sinne einer Epithelzellhypertrophie, in den großen Bronchien hingegen um ein Viertel geringere Epithelhöhen als bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko, wobei in diesen drei Lokalisationen statistische Signifikanz vorlag. In der Mitte der Trachea sowie den mittelgroßen und kleinen Bronchien wurden keine Unterschiede identifiziert (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.2.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen und kaudalen Trachealabschnitt wiesen die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt um etwa ein Sechstel und damit statistisch signifikant größere Epithelhöhen im Sinne einer Epithelzellhypertrophie auf als die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt, wohingegen in der Mitte der Trachea sowie in den großen, mittelgroßen und kleinen Bronchien kein Unterschied bestand (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.2.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

In dem kranialen und mittleren Abschnitt der Trachea konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Epithelhöhen detektiert werden, wohingegen die adulten Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-ko im kaudalen Bereich der Trachea um etwa ein Drittel und damit statistisch signifikant geringere Epithelhöhen als die Tiere des Genotyps ENaC-wt/m3-wt aufwiesen, in den großen Bronchien hingegen um etwa ein Achtel größere Epithelhöhen zeigten. In den mittelgroßen und kleinen Bronchien konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

5.2.4.3 **Zusammenfassende Betrachtung der Epithelhöhen**

Bei allen Genotypen in der juvenilen Altersgruppe fanden sich in der Trachea größere Epithelhöhen als in den Bronchien, wobei innerhalb der Trachea sowie innerhalb der Bronchien bei den verschiedenen Genotypen jeweils einheitliche Werte detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu stellten sich die Epithelhöhen der adulten Tiere im gesamten

ERGEBNISSE

Respirationstrakt einheitlicher dar, wobei bei allen Genotypen in den großen Bronchien die maximalen Epithelhöhen des Respirationstraktes gefunden werden konnten. Bei den juvenilen Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt fand sich in der gesamten Trachea sowie in den großen Bronchien gegenüber den juvenilen ENaC-wt-Tieren eine Epithelzellhypertrophie, bei ersterem Genotyp auch in den mittelgroßen Bronchien. Bei den adulten Tieren fanden sich in den verschiedenen Lokalisationen mehr oder weniger stark ausgeprägte Unterschiede in der Epithelhöhe, wohingegen jedoch in der Gesamtheit betrachtet in der adulten Altersgruppe keine biologisch signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten (Abb. 19, Tabelle 50 bis Tabelle 55).

ERGEBNISSE

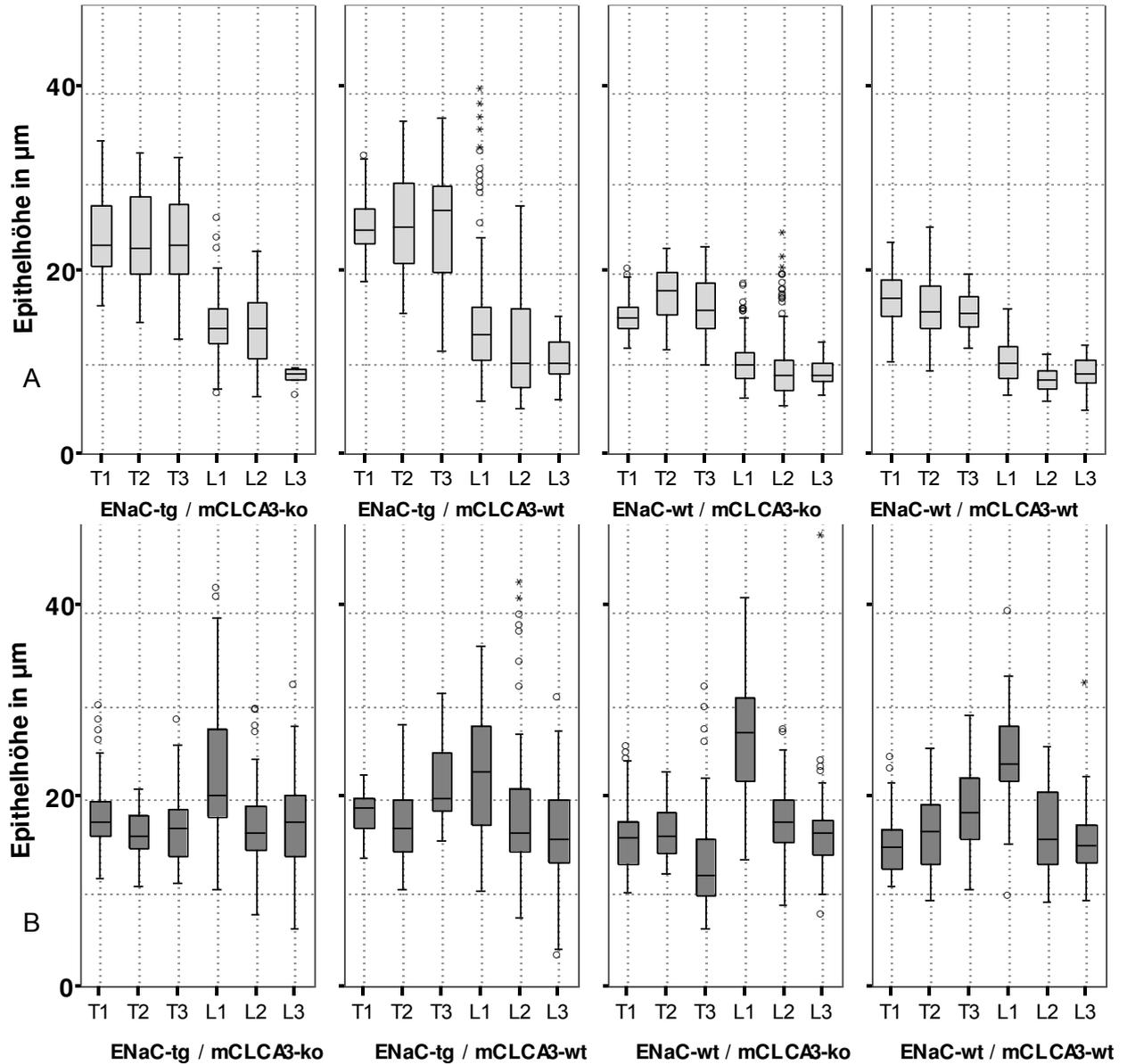


Abb. 19: Epithelhöhen der juvenilen und adulten Tiere

Vergleichende Darstellung der Epithelhöhen der juvenilen (A) und adulten (B) Tiere nach Lokalisationen in den Atemwegen, T1=Trachea, kranialer Abschnitt, T2=Trachea, Mitte, T3=Trachea, kaudaler Abschnitt, L1=große Bronchien (Durchmesser >246 µm), L2=mittelgroße Bronchien (Durchmesser 150-245 µm), L3=kleine Bronchien (Durchmesser <149 µm), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out, n=5; Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in dieser Abbildung auf die Darstellung der statistischen Signifikanzen verzichtet. Diese sind in Tabelle 64 bis Tabelle 71 dargestellt.

5.2.4.4 **Die Epithelhöhen der Einzeltiere**

Die Darstellung der Epithelhöhen der Einzeltiere erfolgte in Balkendiagrammen nach Lokalisationen, um einen Eindruck über die Streuung und den Einfluss der Einzelwerte auf die Gesamtauswertung zu bekommen. Die Diagramme können im Anhang (12.1.6) eingesehen werden.

5.2.4.5 **Weiterführende statistische Auswertung der Epithelhöhen**

Die deskriptive Statistik der Epithelhöhen kann in tabellarischer Form im Anhang eingesehen werden (Tabelle 50 bis Tabelle 55). Auf Grund der fehlenden Normalverteilung der Daten erfolgte die weitere statistische Auswertung mit dem verteilungsfreien Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ eingestuft. Die tabellarische Darstellung aller Einzelvergleiche kann im Anhang (12.1.7.1) eingesehen werden.

5.2.5 **Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen**

Da ENaC-transgene Mäuse deutliche Infiltrationen von Entzündungszellen in den Atemwegslumina zeigen (MALL *et al.*, 2004), erfolgte die Untersuchung der Entzündungszellen im Respirationstrakt vergleichend zwischen den Genotypen in beiden Altersgruppen, wobei die Auswertung an Hand eines Score-Systems für die einzelnen Entzündungszelltypen erfolgte (Tabelle 19).

5.2.5.1 **Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen der juvenilen Tiere**

Die nachfolgende Darstellung (Abb. 20 A) zeigt zusammenfassend die deskriptive Statistik der Daten über die Entzündungszellen in den Atemwegen der juvenilen Mäuse, die im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben wird.

5.2.5.1.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Sowohl die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko als auch die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt zeigten deutliche intraluminal Infiltrationen mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen. Dabei fand sich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt lediglich eine geringfügig höhere Anzahl an Makrophagen, jedoch eine nahezu doppelte Zahl an neutrophilen Granulozyten. Lymphozyten in geringer Anzahl fanden sich ausschließlich bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt (Abb. 20 A).

5.2.5.1.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

Bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fanden sich deutliche Infiltrationen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in den Atemwegslumina, wohingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko lediglich vereinzelte Makrophagen identifiziert werden konnten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Abb. 20 A).

5.2.5.1.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die Tiere Genotyps ENaC-tg/m3-wt zeigten deutliche intraluminale Infiltrationen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie in geringer Anzahl Lymphozyten im Respirationstrakt, wohingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt lediglich vereinzelte Makrophagen detektiert werden konnten. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich dabei sowohl bei der Anzahl an Makrophagen, als auch bei der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Abb. 20 A).

5.2.5.1.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

Sowohl bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko als auch bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt fanden sich in sehr geringer Anzahl Makrophagen als einziger Entzündungszelltyp in den Atemwegslumina (Abb. 20 A).

5.2.5.2 **Einfluss der Genotypen auf die Entzündungszellen in den Atemwegen der adulten Tiere**

Die deskriptive Statistik der Entzündungszellen in den Atemwegen der adulten Tiere ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 20 B) dargestellt und wird im Folgenden vergleichend zwischen den Genotypen beschrieben.

5.2.5.2.1 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt**

Bei den adulten Tieren beider Genotypen fanden sich intraluminale Makrophagen und neutrophile Granulozyten in vergleichbarer Anzahl, wobei bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zusätzlich geringe Mengen eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten identifiziert werden konnten (Abb. 20 B).

5.2.5.2.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

Bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fanden sich intraluminal deutliche Infiltrationen mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie zusätzlich geringe Mengen eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten, wohingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko keine Entzündungszellen in den Atemwegslumina gefunden wurden. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich dabei sowohl bei der Anzahl an Makrophagen, als auch bei der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Abb. 20 B).

5.2.5.2.3 **ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt**

Die Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt zeigten deutliche und statistisch signifikante intraluminale Infiltrationen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Respirationstrakt, wohingegen bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt keine Entzündungszellen detektiert werden konnten (Abb. 20 B).

5.2.5.2.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

Sowohl bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko als auch bei den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt fanden sich keine Entzündungszellen in den Atemwegslumina (Abb. 20 B).

5.2.5.3 **Zusammenfassende Betrachtung der Entzündungsreaktion**

Sowohl bei den juvenilen Tieren als auch bei den adulten Tieren fanden sich bei den Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt deutliche Infiltrationen mit Makrophagen in vergleichbarer Ausprägung, wohingegen die Tiere der Genotypen ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/m3-wt lediglich im juvenilen Alter vereinzelte Makrophagen aufwiesen. Neutrophile Granulozyten fanden sich in stärkerer Ausprägung bei den adulten Tieren der Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt und in abgeschwächter Ausprägung bei den juvenilen Tieren der genannten Genotypen, wohingegen sie bei den Genotypen ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/m3-wt in keiner Altersstufe detektiert werden konnten. Die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt wiesen vereinzelte Lymphozyten auf, wohingegen diese in der adulten Altersgruppe lediglich bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-ko in vereinzelter Anzahl gefunden wurden. Eosinophile Granulozyten fanden sich ausschließlich bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko. Alle intraluminal detektierten Entzündungszellen stellten sich dabei mukusassoziiert dar.

ERGEBNISSE

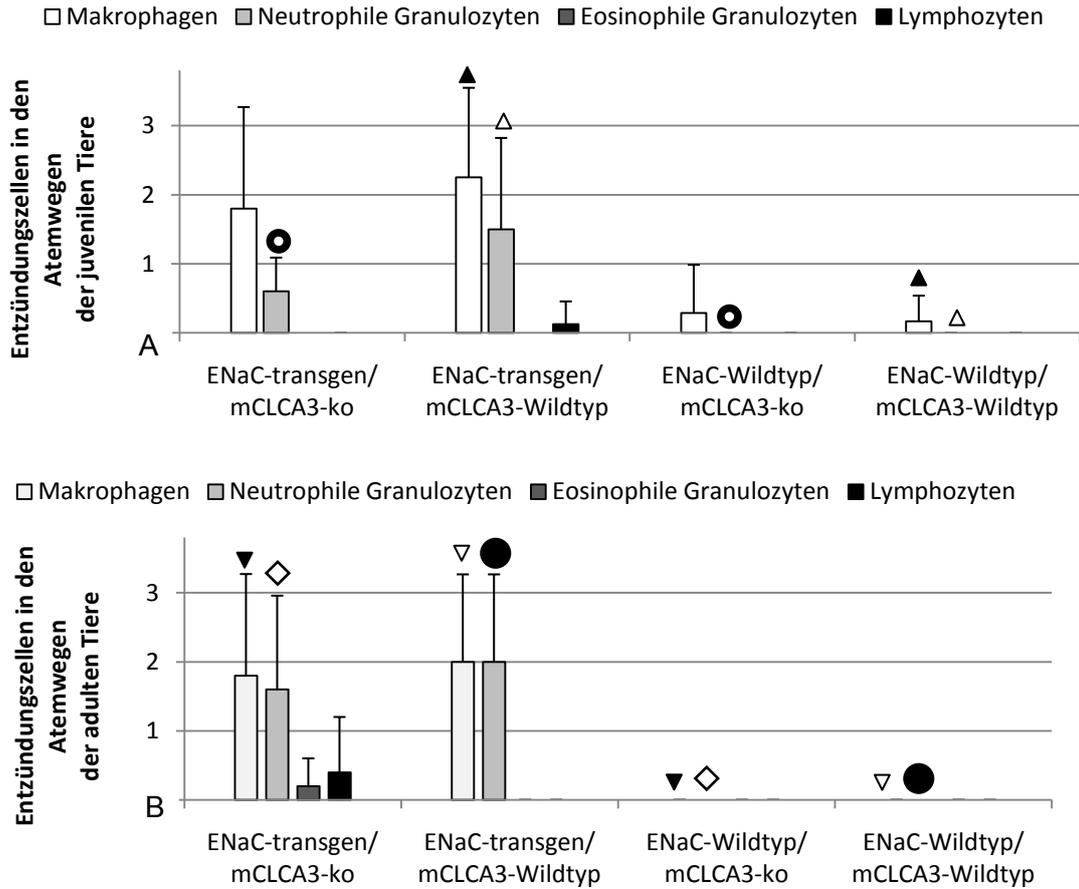


Abb. 20: Entzündungszellen in den Atemwegen der juvenilen und adulten Tiere

Entzündungszellen in den Atemwegslumina der juvenilen (A) und adulten (B) Tiere, Score 0= 0-2 EZ in den Atemwegen; Score 1= 3-10 EZ in den Atemwegen, Score 2= 11-20 EZ in den Atemwegen, Score 3= über 20 EZ in den Atemwegen, EZ= Entzündungszellen, ko=knock-out, n=5; Statistische Signifikanzen ($p < 0,05$, T-Test) sind mit gleichen Symbolen (Dreiecke, Vierecke, Kreise) gekennzeichnet.

5.3 Einfluss der Genotypen auf die Expression der Muzingene *muc4*, *muc5ac* und *muc5b* sowie des Becherzellmarkers *mCLCA3*

Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR wurden graphisch in Form von Balkendiagrammen sowie in tabellarischer Form dargestellt. Dabei wurde die Expression des untersuchten Gens (*gene of interest*) als Kopienanzahl je 100 Kopien der drei stabilsten, geometrisch gemittelten Referenzgene (*housekeeping genes*) *beta-Actin (Actb)*, *beta-2-Mikroglobulin (B2M)* und *Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS)* dargestellt. Die Darstellung erfolgte vergleichend zwischen den Altersgruppen und den Genotypen.

5.3.1 Muzingen *muc4*

Bei der Untersuchung der Regulation des Muzingens *muc4* wurden weder zwischen den Genotypen, noch zwischen den Altersgruppen biologische oder statistisch signifikante Unterschiede identifiziert (Abb. 21).

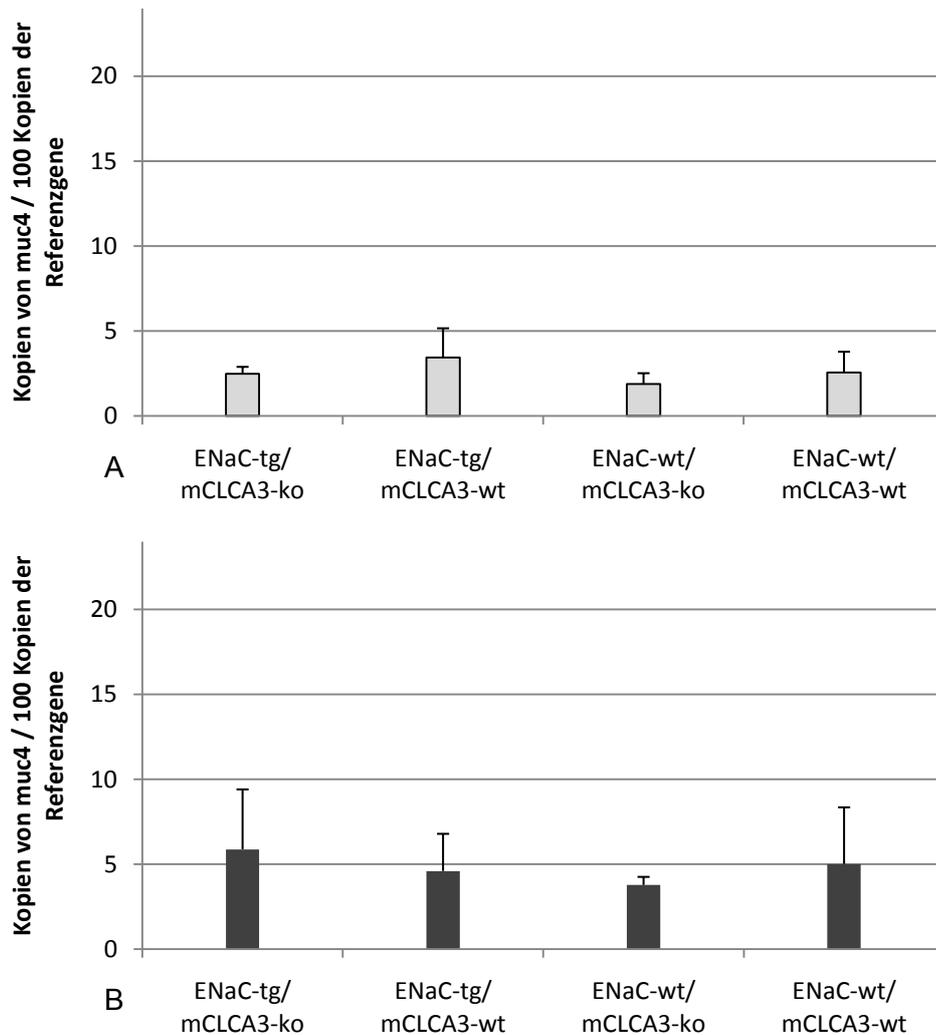


Abb. 21: *Muc4* ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.

Darstellung der Genexpression von *muc4* als Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Kopien von *muc4* pro 100 Kopien der drei geometrisch gemittelten Haushaltsgene (*Actb*, *B2M*, *HMBS*), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out, A: juvenile Tiere, n=5; B: adulte Tiere, n=5

5.3.2 Muzingen *muc5ac*

Das Muzingen *muc5ac* wurde weder bei den einzelnen Genotypen, noch bei den Altersgruppen unterschiedlich reguliert. Es fanden sich keine biologischen oder statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 22).

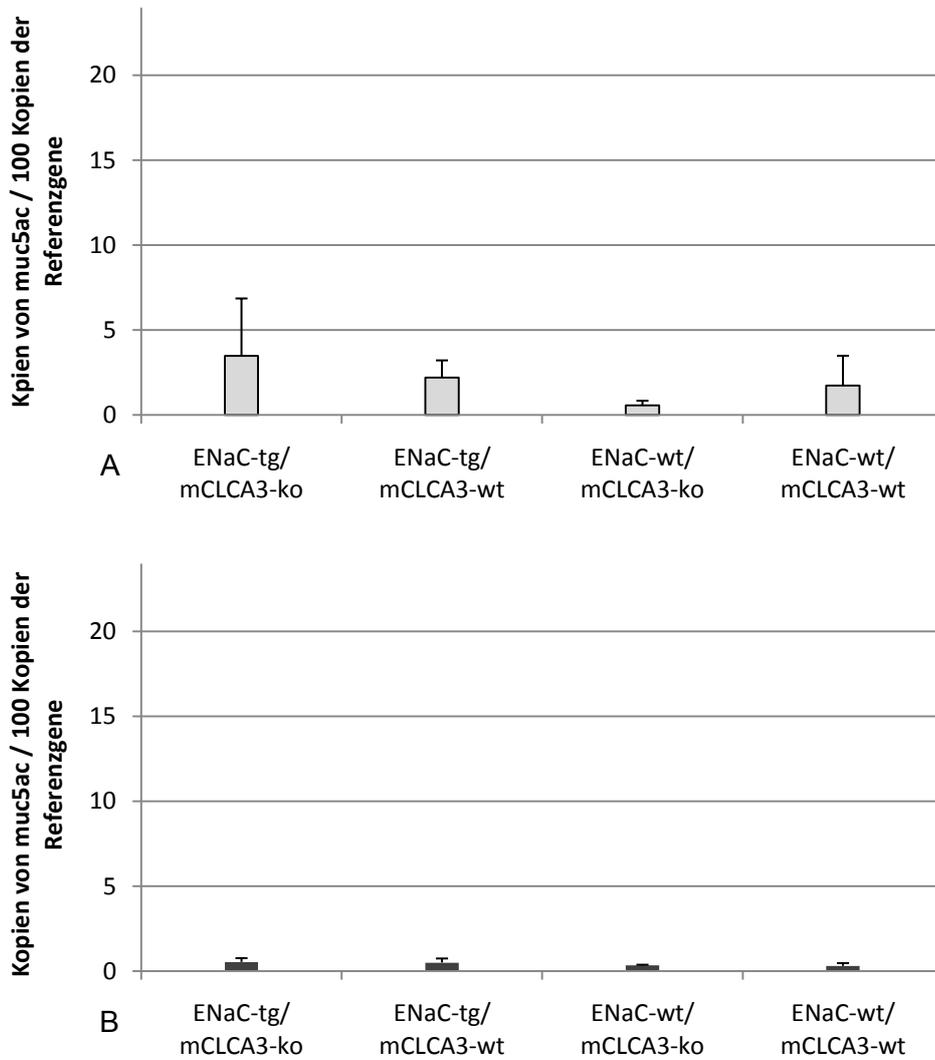


Abb. 22: *Muc5ac* ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.

Darstellung der Genexpression von *muc5ac* als Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Kopien von *muc5ac* pro 100 Kopien der drei geometrisch gemittelten Haushaltsgene (*Actb*, *B2M*, *HMBS*), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out, A: juvenile Tiere, n=5; B: adulte Tiere, n=5

5.3.3 Muzingen *muc5b*

Das Muzingen *muc5b* wurde bei den verschiedenen Genotypen und zwischen den Altersgruppen nicht unterschiedlich reguliert. Biologische oder statistische Signifikanz konnte nicht detektiert werden (Abb. 23).

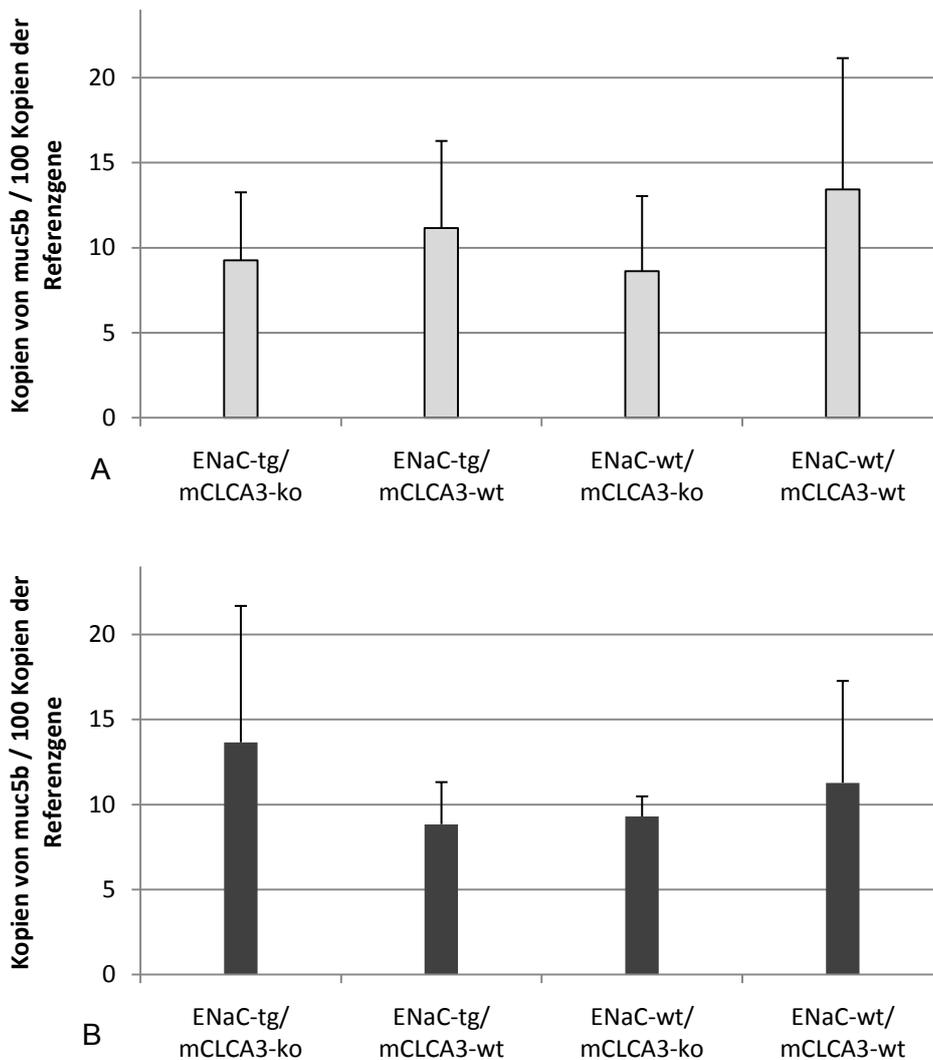


Abb. 23: *Muc5b* ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.

Darstellung der Genexpression von *muc5b* als Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Kopien von *muc5b* pro 100 Kopien der drei geometrisch gemittelten Haushaltsgene (*Actb*, *B2M*, *HMBS*), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out, A: juvenile Tiere, n=5; B: adulte Tiere, n=5

5.3.4 **Becherzellmarker mCLCA3**

Bei der Expression von m3 konnten biologische und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den m3-wt-Tieren und den m3-ko Tieren beider Altersgruppen identifiziert werden, wobei die m3-ko-Tiere kein m3 exprimierten. Bei den adulten ENaC-tg Tieren war m3 im Vergleich zu den ENaC-wt Tieren 3-fach höher reguliert (Abb. 24).

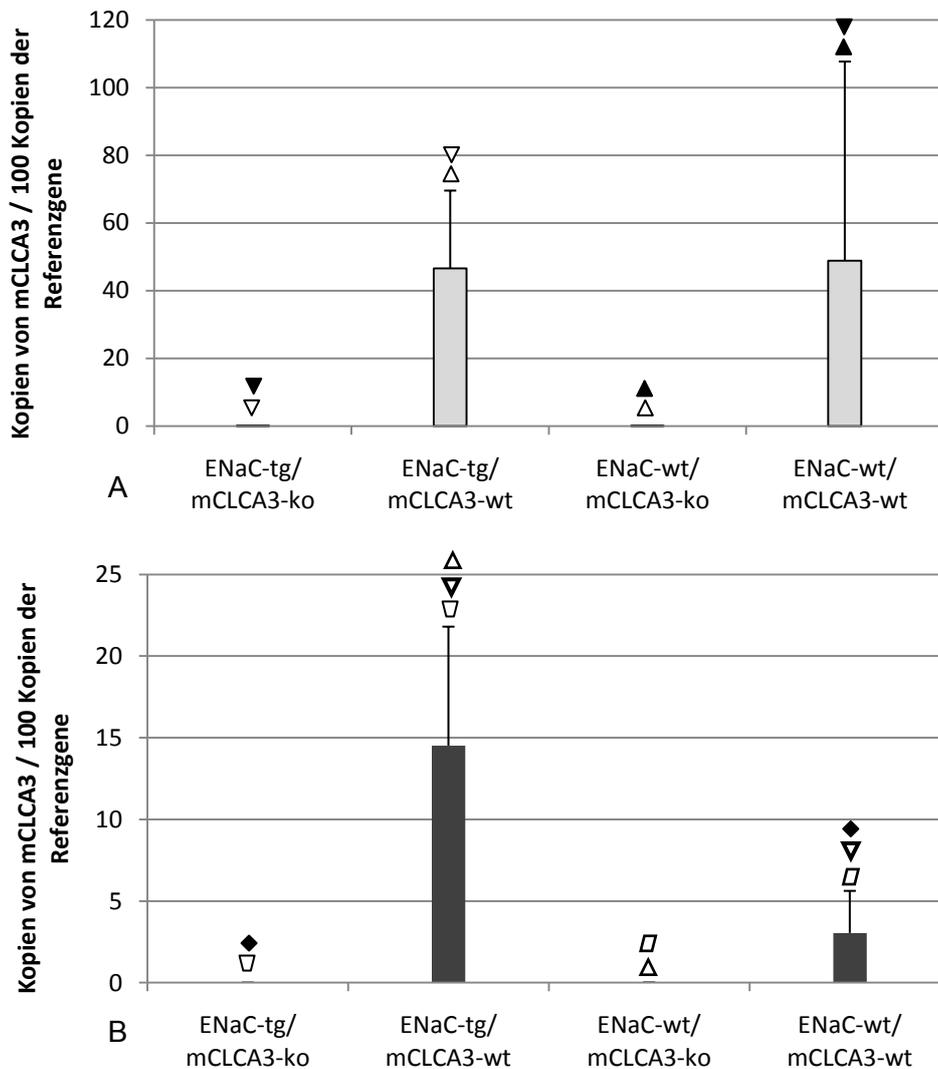


Abb. 24: mCLCA3 ist in adulten ENaC-tg/m3-wt Tieren im Vergleich zu den reinen wt-Tieren statistisch signifikant überexprimiert. Die fehlende mCLCA3-Expression bei Tieren mit m3-ko-Genotyp bestätigt den knock out-Status.

Darstellung der Genexpression von m3 als Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Kopien von m3 pro 100 Kopien der drei geometrisch gemittelten Haushaltsgene (Actb, B2M, HMBS), tg=transgen, wt=Wildtyp, ko=knock-out, gleiche Dreiecke= statistische Signifikanz ($p < 0,05$), A: juvenile Tiere, n=5; B: adulte Tiere, n=5; Statistische Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit gleichen Symbolen (Dreiecke, Vierecke) gekennzeichnet.

5.4 Einfluss der Genotypen auf die Genregulation (DNA-Microarray)

Im Folgenden werden die am stärksten regulierten Gene der 22.497 untersuchten Gene sowie *mCLCA3* und *ENaC* für die entsprechenden Einzelvergleiche der Genotypen tabellarisch vorgestellt (Tabelle 30 bis Tabelle 33), wobei die höchsten absoluten Werte der logarithmierten *Fold changes* zu Grunde liegen. Durch einen grünen Pfeil gekennzeichnete Gene mit positivem logarithmiertem *Fold change* wurden in der Vergleichsgruppe hoch reguliert, während herunter regulierte Gene mit einem roten Pfeil gekennzeichnet wurden. Die differenziell regulierten Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Becherzellinduktion bzw. Mukusproduktion in früheren Publikationen diskutiert wurden und damit für die hier untersuchten Modelle biologisch von Relevanz sein könnten, sind farblich hinterlegt. Statistische Signifikanz konnte zwischen den Genotypen nicht nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

5.4.1 ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt

Tabelle 30: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene, sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-ko vs. adult ENaC-tg/m3-wt

Gen-Name	log(FC)
Mus musculus chloride channel calcium activated 3 (mCLCA3)	0,19
Mus musculus sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta (beta-ENaC)	1,62
Mus musculus ribosomal protein L6 (Rpl6)	2,56
Mus musculus epidermal growth factor receptor (Egfr), transcript variant 1	2,46
Mus musculus zinc finger protein 386 (Kruppel-like) (Zfp386), transcript variant 1	2,39
Mus musculus zinc finger protein 80 (Zfp808)	2,39
Mus musculus olfactory receptor 103 (Olfr103)	2,33
Mus musculus HEAT repeat containing 1 (Heatr1)	2,32
Mus musculus eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 10 (Ear10)	2,25
Mus musculus SIK family kinase 3 (Sik3)	2,23
Mus musculus spermatogenesis associated 19 (Spata19)	2,17
Mus musculus hyaluronoglucosaminidase 3 (Hyal3)	2,17
Mus musculus zinc finger protein 97 (Zfp97)	2,17
Mus musculus selenoprotein P, plasma, 1 (Sepp1), transcript variant 2	2,09
Mus musculus farnesyl diphosphate synthetase (Fdps)	2,08
Mus musculus killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 23 (Klra23)	2,07
Mus musculus DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked (Ddx3y)	2,07
Mus musculus zinc finger protein 658 (Zfp658)	2,06
Mus musculus transmembrane channel-like gene family 3 (Tmc3)	2,04
Mus musculus angiotensin II receptor, type 1b (Agtr1b)	-1,98
Mus musculus phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1 (Pip5kl1)	-2,03
Mus musculus predicted gene, OTTMUSG00000019001 (OTTMUSG00000019001)	-2,08
Mus musculus predicted gene 15114 (Gm15114)	-2,20
Mus musculus NLR family, pyrin domain containing 10 (Nlrp10)	-2,30
Mus musculus predicted gene, EG381936 (EG381936)	-2,56

grüner Pfeil= höher regulierte Gene, roter Pfeil= herunter regulierte Gene, grün hinterlegte Gene= höher regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden, rot hinterlegte Gene= herunter regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden

5.4.2 **ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko**

Tabelle 31: Darstellung der 24 am stärksten regulierten Gene inklusive ENaC sowie zusätzlich mCLCA3, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-ko vs. adult ENaC-wt/m3-ko

Gen-Name	log(FC)
Mus musculus chloride channel calcium activated 3 (mCLCA3)	-0,06
Mus musculus sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta (Scnn1b/ beta-ENaC)	3,31
Mus musculus glycoprotein 2 (zymogen granule membrane); (Gp2)	2,43
Mus musculus actin, alpha 1, skeletal muscle (Acta1)	2,13
Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5	1,60
Mus musculus echinoderm microtubule associated protein like 4 (Eml4)	1,59
Mus musculus NLR family, pyrin domain containing 10 (Nlrp10)	-1,59
Mus musculus eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (Eef1a2)	-1,61
Mus musculus TM2 domain containing 1 (Tm2d1)	-1,62
Mus musculus six transmembrane epithelial antigen of prostate 2 (Steap2)	-1,62
Mus musculus hepcidin antimicrobial peptide (Hamp)	-1,64
Mus musculus lysyl oxidase-like 1 (Loxl1)	-1,64
Mus musculus isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (Idh3a)	-1,67
Mus musculus LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2 (Lysmd2)	-1,67
Mus musculus glutathione S-transferase omega 1 (Gsto1)	-1,70
Mus musculus predicted gene, OTTMUSG00000019001 (OTTMUSG00000019001)	-1,70
Mus musculus ubiquitin carboxyl-terminal esterase L4 (Uchl4)	-1,73
Mus musculus cathelicidin antimicrobial peptide (Camp)	-1,74
Mus musculus epithelial stromal interaction 1 (breast) (Epsti1), transcript variant a	-1,75
The following term was not found in Nucleotide: NM_01139509_1	-1,76
Mus musculus Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha) (Drap1)	-1,80
Mus musculus Purkinje cell protein 4-like 1 (Pcp4l1)	-1,85
Mus musculus actinin alpha 4 (Actn4)	-1,88
Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, transcript variant 2	-1,90
Mus musculus transmembrane protein 188 (Tmem188)	-1,94

grüner Pfeil= höher regulierte Gene, roter Pfeil= herunter regulierte Gene, grün hinterlegte Gene= höher regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden, rot hinterlegte Gene= herunter regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden

ERGEBNISSE

5.4.3 ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt

Tabelle 32: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-wt vs. adult ENaC-wt/m3-wt

Gen-Name	log(FC)
Mus musculus chloride channel calcium activated 3 (mCLCA3)	-0,35
Mus musculus sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta (beta-ENaC)	1,53
Mus musculus predicted gene, EG381936 (EG381936)	2,63
Mus musculus predicted gene 15114 (Gm15114)	2,61
Mus musculus predicted gene 15085 (Gm15085)	2,58
Mus musculus nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (Nr4a2)	2,27
Mus musculus predicted gene 10439 (Gm10439)	2,25
Mus musculus RIKEN cDNA 9230105E10 gene (9230105E10Rik), transcript variant 2	2,19
Mus musculus predicted gene, OTTMUSG00000019001 (OTTMUSG00000019001)	2,15
Mus musculus glycoprotein 2 (zymogen granule membrane) (Gp2)	2,15
Mus musculus RIKEN cDNA 9030025P20 gene (9030025P20Rik)	1,91
Mus musculus leucine zipper protein 4 (Luzp4)	1,90
Mus musculus small nuclear ribonucleoprotein N (Snrpn), transcript variant 3	1,90
Mus musculus caveolin 2 (Cav2)	-1,93
Mus musculus radixin (Rdx), transcript variant 3	-1,95
Mus musculus RNA binding motif, single stranded interacting protein 1 (Rbms1)	-1,98
Mus musculus C-type lectin domain family 1, member b (Clec1b)	-2,01
Mus musculus DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked (Ddx3x)	-2,03
Mus musculus acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain (Acadm)	-2,12
Mus musculus histone cluster 1, H2bm (Hist1h2bm)	-2,23
Mus musculus farnesyl diphosphate synthetase (Fdps)	-2,36
Mus musculus lysozyme G-like 2 (Lyg2)	-2,37
Mus musculus RIKEN cDNA 5033414K04 gene (5033414K04Rik)	-2,52
Mus musculus zinc finger protein 386 (Kruppel-like) (Zfp386), transcript variant 1	-2,68
Mus musculus zinc finger protein 80 (Zfp808)	-2,93

grüner Pfeil= höher regulierte Gene, roter Pfeil= herunter regulierte Gene, rot hinterlegte Gene= herunter regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden

5.4.4 **ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt**

Tabelle 33: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-wt/m3-ko vs. adult ENaC-wt/m3-wt

Gen-Name	log(FC)
Mus musculus chloride channel calcium activated 3 (mCLCA3)	-0,09
Mus musculus sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta (beta-ENaC)	-0,15
Mus musculus nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (Nr4a2)	3,21
Mus musculus predicted gene 15085 (Gm15085)	1,94
Mus musculus G protein-coupled receptor kinase 4 (Grk4), transcript variant 2	1,93
Mus musculus bruno-like 5, RNA binding protein (Drosophila) (Brunol5)	1,88
Mus musculus predicted gene, OTTMUSG00000019001 (OTTMUSG00000019001)	1,77
Mus musculus ribosomal protein L6 (Rpl6)	1,74
Mus musculus ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex	1,70
Mus musculus pygopus 1 (Pygo1)	1,69
Mus musculus cDNA sequence BC018101 (BC018101)	1,65
Mus musculus cDNA sequence BC030499 (BC030499)	1,57
Mus musculus ring finger protein 144A (Rnf144a), transcript variant 2	1,53
Mus musculus peripheral myelin protein 2 (Pmp2)	1,53
Mus musculus carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 12	1,51
Mus musculus RIKEN cDNA 9030025P20 gene (9030025P20Rik)	1,50
Mus musculus lymphocyte antigen 9 (Ly9)	1,44
Mus musculus acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain (Acadm)	-1,36
Mus musculus tetraspanin 7 (Tspan7)	-1,38
Mus musculus RIKEN cDNA 4933434E20 gene (4933434E20Rik), transcript variant 2	-1,41
Mus musculus deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2 (Dnttip2)	-1,44
Mus musculus DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58 (Dhx58)	-1,51
Mus musculus zinc finger protein 85, related sequence 1 (Zfp85-rs1)	-1,53
Mus musculus nuclear factor I/A (Nfia), transcript variant 2	-1,57
Mus musculus zinc finger protein 273 (Zfp273)	-1,73

grüner Pfeil= höher regulierte Gene, roter Pfeil= herunter regulierte Gene, rot hinterlegte Gene= herunter regulierte Gene, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukusproduktion beschrieben wurden

5.5 Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse dieser Arbeit

In der nachfolgenden Darstellung (Tabelle 34) wurden die Ergebnisse aller Untersuchungen dieser Arbeit in übersichtlicher Form vergleichend zwischen den Genotypen und Altersgruppen dargestellt. Dabei wurde der jeweils erstgenannte Genotyp der Vergleichsgruppe mit dem zweitgenannten Genotyp verglichen und biologisch interessante Charakteristika der einzelnen Genotypen sowie statistisch signifikante Ausprägungen hervorgehoben.

5.5.1 ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt

Weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren fanden sich Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes der Tiere.

Bei den juvenilen Tieren fand sich in der Trachea kein Unterschied hinsichtlich der intraluminalen Mukusakkumulationen beider Genotypen, wohingegen ersterer Genotyp in der Lunge tendenziell stärker ausgeprägte intraluminalen Mukusakkumulationen zeigte. Bei den adulten Tieren konnten bei ersterem Genotyp in der Trachea größere Mukusakkumulationen als bei dem Vergleichsgenotyp detektiert werden, wohingegen sich in der Lunge kein Unterschied zeigte.

Die *Mucus volume density* war bei den juvenilen Tieren des ersteren Genotyps tendenziell, bei den adulten Tieren sogar deutlich vermindert gegenüber zweitem Genotyp.

Bei den juvenilen Tieren fanden sich in den einzelnen Lokalisationen teilweise geringere und teilweise größere Becherzellzahlen, wobei jedoch in der Gesamtheit betrachtet kein Unterschied hinsichtlich der Becherzellzahl pro mm Basalmembran zwischen den Vergleichsgenotypen in der juvenilen Altersgruppe festgestellt werden konnte. Bei den adulten Tieren hingegen fand sich im gesamten Respirationstrakt bei dem ersten Genotyp eine verminderte Becherzellzahl pro mm Basalmembran gegenüber dem zweiten Genotyp.

In der Trachea und den großen Bronchien fand sich bei den juvenilen Tieren kein Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich der Epithelhöhe, wohingegen in den mittelgroßen und kleinen Bronchien eine signifikante Epithelzellhypertrophie des ersten Genotyps gegenüber dem zweiten Genotyp detektiert werden konnte. In der adulten Altersgruppe hingegen fand sich in einer Lokalisation eine signifikante Epithelzellhypertrophie, in einer anderen Lokalisation eine signifikant verminderte Epithelhöhe, wohingegen in der Gesamtheit betrachtet kein Unterschied in der Epithelhöhe zwischen den Genotypen identifiziert werden konnte. Wird die Epithelzellhöhe bei den reinen wt-Tieren, die im Mittel bei den juvenilen Tieren bei 8 µm bzw. bei 17 µm bei den adulten Tieren liegt, als physiologische Höhe

angenommen (siehe auch Tabelle 37), so kann in den genannten Fällen tatsächlich von einer Epithelzellhypertrophie ausgegangen werden.

Bei den juvenilen Tieren fanden sich tendenziell weniger neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, bei den adulten Tieren hingegen tendenziell mehr eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in den Atemwegen des ersteren Genotyps.

Unterschiede in der Expression der untersuchten Muzingene *muc4*, *muc5ac* und *muc5b* fanden sich weder bei den juvenilen Tieren noch bei den adulten Tieren. Im Gegensatz dazu fanden sich in beiden Altersgruppen signifikante Unterschiede bei der Expression von *m3*, wobei ersterer Genotyp kein *m3* exprimierte.

Bei der Untersuchung der adulten Tiere mittels Microarray konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Tabelle 34).

5.5.2 ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko

In keiner Altersgruppe fanden sich Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes der Tiere.

Sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren des ersten Genotyps zeigten sich deutlich stärker ausgeprägte intraluminale Mukusakkumulationen im gesamten Respirationstrakt.

Die *Mucus volume density* des ersteren Genotyps war in den mittelgroßen und großen Bronchien der juvenilen Tiere sowie in den großen Bronchien der adulten Tiere erhöht gegenüber zweitem Genotyp, wohingegen sich in den mittelgroßen Bronchien der adulten Tiere kein Unterschied fand.

Sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren des ersteren Genotyps fand sich in der Gesamtheit betrachtet eine erhöhte Becherzellzahl pro mm Basalmembran im Respirationstrakt.

Mit Ausnahme der kleinen Bronchien fanden sich bei den juvenilen Tieren signifikant größere Epithelhöhen im gesamten Respirationstrakt des ersteren Genotyps, wohingegen sich in der adulten Altersgruppe in einzelnen Lokalisationen eine signifikante Epithelzellhypertrophie, in anderen Lokalisationen eine signifikant verminderte bzw. gleich große Epithelhöhe identifiziert werden konnte. In der Gesamtheit betrachtet fand sich kein Unterschied in der Epithelhöhe zwischen den Genotypen der adulten Tiere.

Bei den juvenilen Tieren des ersteren Genotyps fanden sich tendenziell mehr Makrophagen und neutrophile Granulozyten, bei den adulten Tieren sogar signifikant mehr Makrophagen und neutrophile Granulozyten und auch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in erhöhter Anzahl in den Atemwegen als bei dem Vergleichsgenotyp.

Weder bei den juvenilen Tieren noch bei den adulten Tieren fanden sich Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene *mCLCA3*, *muc4*, *muc5ac* und *muc5b*.

Zwischen den Genotypen der adulten Tiere konnten keine Unterschiede bei der Untersuchung mittels Microarray festgestellt werden (Tabelle 34).

5.5.3 ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt

Ähnlich wie bei ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko fanden sich weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes der Tiere.

Bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt fand sich eine tendenziell erhöhte intraluminale Mukusakkumulation, wohingegen sich bei den adulten Tieren kein Unterschied zwischen beiden Genotypen zeigte.

Sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren des ersten Genotyps zeigte sich eine deutlich höhere *Mucus volume density* in der Lunge.

Eine erhöhte Becherzellzahl fand sich sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren des ersteren Genotyps im gesamten Respirationstrakt.

Die juvenilen Tiere des ersteren Genotyps wiesen im gesamten Respirationstrakt signifikant größere Epithelhöhen auf, wohingegen sich bei den adulten Tieren lediglich in der Trachea tendenziell größere Epithelhöhen fanden. In der Gesamtheit betrachtet konnte jedoch in der adulten Altersgruppe kein Unterschied hinsichtlich der Epithelhöhe im Respirationstrakt identifiziert werden.

Sowohl die juvenilen als auch die adulten Tiere des ersteren Genotyps wiesen signifikant mehr Makrophagen und neutrophile Granulozyten als der zweite Genotyp auf.

Unterschiede hinsichtlich der Expression der untersuchten Muzingene *muc4*, *muc5ac* und *muc5b* fanden sich weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren, wohingegen die adulten Tiere des ersteren Genotyps eine signifikant erhöhte Expression von *mCLCA3* im Vergleich zu zweitem Genotyp zeigten.

Bei der Untersuchung der adulten Tiere mittels Microarray konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Tabelle 34).

5.5.4 ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt

Bei dieser Vergleichsgruppe zeigte sich kein erkennbarer Phänotyp in allen gemessenen Parametern.

Weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren fanden sich Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes der Tiere.

ERGEBNISSE

Bei den juvenilen Tieren des ersteren Genotyps zeigten sich die intraluminalen Mukusakkumulationen tendenziell stärker, bei den adulten Tieren hingegen tendenziell schwächer ausgeprägt als bei zweiterem Genotyp.

Unterschiede hinsichtlich der *Mucus volume density* fanden sich weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren.

Sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren fanden sich lokalisationsbedingt teilweise größere und teilweise geringere Becherzellzahlen, wobei jedoch in der Gesamtheit betrachtet kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte.

In beiden Altersgruppen fanden sich in der Gesamtheit betrachtet keine Unterschiede bezüglich der Epithelhöhe, wobei lokalisationsbedingt vereinzelt tendenziell größere bzw. geringere Epithelhöhen identifiziert werden konnten.

Unterschiede hinsichtlich der Entzündungszellzahl zwischen den Genotypen fanden sich in keiner Altersgruppe.

Weder bei den juvenilen Tieren noch bei den adulten Tieren konnten Unterschiede in der Expression der untersuchten Muzingene *muc4*, *muc5ac* und *muc5b* festgestellt werden, wohingegen das Gen *mCLCA3* bei ersterem Genotyp nicht exprimiert wurde.

Bei der Untersuchung der adulten Tiere mittels Microarray-Technologie konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Tabelle 34).

Tabelle 34: Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Parameter	untersuchte Lokalisation	ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-tg/m3-wt		ENaC-tg/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-ko		ENaC-tg/m3-wt vs. ENaC-wt/m3-wt		ENaC-wt/m3-ko vs. ENaC-wt/m3-wt	
		juvenil	adult	juvenil	adult	juvenil	adult	juvenil	adult
Körpergewicht		=	=	=	=	=	=	=	=
intraluminale Mukusakkumulation	T1	=	+	=	+!	=	=	+!	-
	T2	=	+!	+	+!	+	=	=	-
	T3	=	+	+	+	+!	=	+	=
	L	+	=	+!	+!	=	+	=	-
<i>Mucus volume density</i>	L1	-	-	+	+	+!	+	=	=
	L2	=	-!	+	=	+	+!	=	=
Becherzellzahl pro mm Basalmembran	T1	=	-	+	+	+	+	=	-
	T2	+!	=	+	+	+	=	+	-
	T3	-	-	=	=	+	+	+	+
	L1	=	-	+	-	-	+	-	+
	L2	=	-	+	+	+	+	-	=
	L3	-	-	=	+	+	+	=	=
Epithelhöhe	T1	=	+!	+!	+!	+!	+!	+!	=
	T2	=	=	+!	=	+!	=	+!	=
	T3	=	-!	+!	+!	+!	+!	=	-!
	L1	=	=	+!	-!	+!	=	=	=
	L2	+!	=	+!	=	+!	=	=	=
	L3	-!	=	=	=	+!	=	=	=
EZ: Makrophagen	L	=	=	+	+!	+!	+!	=	=
EZ: Neutrophile Granulozyten	L	-	=	+!	+!	+!	+!	=	=
EZ: Eosinophile Granulozyten	L	=	+	=	+	=	=	=	=
EZ: Lymphozyten	L	-	+	=	+	+	=	=	=
qPCR: <i>muc4</i>	L	=	=	=	=	=	=	=	=
qPCR: <i>muc5ac</i>	L	=	=	=	=	=	=	=	=
qPCR: <i>muc5b</i>	L	=	=	=	=	=	=	=	=
qPCR: <i>mCLCA3</i>	L	-!	-!	=	=	=	+!	-!	-!
Microarray (22.497 Gene)	L	/	=	/	=	/	=	/	=

„+“ = verstärkte Merkmalsausprägung, „-“ = abgeschwächte Merkmalsausprägung, „=“ = gleich starke Merkmalsausprägung des untersuchten Parameters des erstgenannten Genotyps im Vergleich zu zweitgenanntem Genotyp, „/“ = nicht untersuchter Parameter; T1= Trachea, kranialer Abschnitt; T2= Trachea, Mitte; T3=Trachea, kaudaler Abschnitt; L1= große Bronchien, L2= mittelgroße Bronchien, L3= kleine Bronchien, L= Lunge gesamt; statistische Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit „!“ gekennzeichnet, wobei eine Verstärkung des Merkmals rot, eine Abschwächung grün hinterlegt wurde

6 Diskussion

Mukoviszidose ist die häufigste letale Erbkrankheit des Menschen, deren Hauptmanifestationsort die Lunge ist (OPPENHEIMER, 1976). Mäuse, die die β -Einheit des Natriumkanals ENaC in den Atemwegen überexprimieren sind bislang das einzige murine Tiermodell zur Erforschung des pulmonalen Phänotyps der Mukoviszidose (MALL *et al.*, 2004). Eine Mukusakkumulation in den Atemwegen, eine Becherzellhyperplasie und -metaplasie, eine Epithelzellhypertrophie sowie Entzündungsreaktionen sind wichtige Charakteristika dieses Modells (MALL *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von m3 auf den Lungenphänotyp der Mukoviszidose untersucht. Dabei wurde das beschriebene „ENaC-Modell“ mit einem m3-knock-out kombiniert und so ein neues, doppelt transgenes Mausmodell entwickelt, welches den Mukoviszidose typischen Lungenphänotyp zeigt. Zwischen den Genotypen vergleichend wurden pathomorphologische und -morphometrische Charakteristika wie die Akkumulation von Mukus, die Becherzellzahl, die Epithelhöhe sowie das Auftreten von Entzündungszellen in zwei Altersgruppen bestimmt. Zusätzlich erfolgten die vergleichende Untersuchung der Muzingenregulation mittels quantitativer RT-PCR sowie ein genomweiter Vergleich der Genexpression aller relevanten Genotypen im Vergleich mittels DNA-Microarray-Technologie. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung dieses neuen doppelt transgenen Mausmodells sowie die Beantwortung der Frage:

6.1 **Moduliert der mCLCA3-Status den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?**

Während sowohl die juvenilen als auch die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/ m3-wt in den Atemwegen durch eine erhöhte intraluminale Mukusakkumulation und *Mucus volume density*, eine Becherzellhyperplasie und Epithelzellhypertrophie sowie eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt charakterisiert sind, fanden sich diese Charakteristika bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko im Vergleich mit den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko ebenfalls. Dabei zeigten sich jedoch in deren Ausprägung Unterschiede zwischen den juvenilen und den adulten Tieren, sodass die Arbeitshypothese für beide Altersgruppen offenbar getrennt adressiert werden muss.

6.1.1 **Moduliert der mCLCA3-Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?**

Das phänotypische Bild der adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko wurde im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt geprägt durch eine signifikant geringere *Mucus volume density* und eine abgeschwächte Becherzellhyperplasie im gesamten Respirations-trakt bei vergleichbarer Epithelzellhypertrophie und Entzündungsreaktion durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

Der m3-ko scheint daher im adulten Mausmodell einen gewissen phänotypischen Rescue-Effekt zu provozieren, der sich sowohl auf die Schleimmenge als auch sekundär auf die Becherzellhyperplasie in Form einer Milderung des Phänotyps auszuwirken scheint.

Allerdings fanden sich bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko im Vergleich zu den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in der Trachea signifikant größere intraluminale Mukusakkumulationen in Form einer unvollständigen bis vollständigen PAS-positiven Wandauskleidung, sodass der vermehrte Schleim offenbar nicht leichter abgegeben wird. Weiterhin zeigte sich eine auf den kranialen Abschnitt der Trachea beschränkte signifikante Epithelzellhypertrophie sowie zusätzlich zu der Entzündungszellinfiltration durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten eine geringe Anzahl an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. Molekularbiologische Unterschiede der Regulation der Muzingene *muc5ac*, *muc5b* und *muc4* zwischen den adulten Tieren der untersuchten Genotypen fanden sich weder mit der quantitativen RT-PCR noch mit der DNA-Microarray-Technologie. Da sich im DNA-Microarray zwischen den Genotypen keine statistische Signifikanz der nahezu 22.500 untersuchten Gene zeigte, sollte hier vor allem die mit 3 Tieren relativ geringe Gruppengröße kritisch betrachtet werden. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Untersuchung juveniler statt adulter Tiere im DNA-Microarray statistisch signifikant regulierte Gene identifiziert hätte. Die fortgeschrittene pathomorphologische und -morphometrische Untersuchung identifizierte in der juvenilen Altersgruppe einen schwerwiegenderen Lungenphänotyp, während die in dieser Arbeit mittels DNA-Microarray untersuchten adulten Tiere einen relativ mildereren pulmonalen Phänotyp zeigten. Da die Untersuchung mittels DNA-Microarray allerdings bereits zu Beginn dieser Studie durchgeführt wurde, konnten die histologischen Erkenntnisse die Wahl der Altersgruppe nicht mehr beeinflussen. Eine zusätzliche Analyse mittels Microarray-Technologie der juvenilen Tiere konnte aus Kostengründen nicht realisiert werden.

Die adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zeigten im Vergleich zu den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko signifikant größere intraluminale Mukusakkumulationen im

gesamten Respirationstrakt, eine verstärkte *Mucus volume density* in den großen Bronchien, eine Becherzellhyperplasie im gesamten Respirationstrakt, eine signifikante Epithelzellhypertrophie in den kranialen und kaudalen Abschnitten der Trachea sowie signifikant erhöhte Entzündungszellinfiltrate durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen in den Atemwegslumina. Dabei scheint der auf dem Atemwegsepithel liegende Mukus sekundär eine Becherzellhyperplasie und -metaplasie zu induzieren. Die erhöhte Entzündungszellinfiltration mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten könnte sekundär entweder in Folge des Mukus, oder in Folge bakterieller Infektionen hervorgerufen werden und als Versuch des Organismus eingestuft werden, den Schleim bzw. die bakteriellen Erreger zu beseitigen.

6.1.1.1 **Wie moduliert der mCLCA3-Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?**

Die Mechanismen, über die m3 den pulmonalen Phänotyp der Lunge zu modulieren scheint, sind bislang unklar. Im Folgenden sollen mögliche Hypothesen über den Einfluss von m3 dargestellt werden.

6.1.1.1.1 **Hypothese: Der mCLCA3-Status spielt eine Rolle bei der Ausbildung eines zäheren Schleimes.**

Möglicherweise induziert m3 im Mausmodell mit gleichzeitiger ENaC-Überexpression primär über bislang unklare Wege die Ausbildung eines zäheren Schleimes mit nachfolgender Becherzellhyperplasie und zellulärer Abräumreaktion, sodass mit dem m3-ko molekulare Mechanismen gestoppt werden und es über die verminderte Viskosität des Mukus zu einer Abschwächung des Mukoviszidose-Phänotyps im ENaC-Modell kommt. Die Arbeitsgruppe um Young konnte für m3 eine mögliche Rolle bei der Modifikation der Mukuseigenschaften im Darm im CFTR-knock-out-Modell identifizieren (YOUNG *et al.*, 2007). Nach Young könnte m3 die Mukuseigenschaften hinsichtlich Viskosität und Fließeigenschaften zu Gunsten einer erleichterten Clearance im Darm beeinflussen, da m3 aus den Muzingranula direkt in den Mukus sezerniert wird (YOUNG *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden die strukturellen Eigenschaften des Mukus nicht näher untersucht, sodass diese Hypothese durch zukünftige Studien überprüft werden sollte.

Die im adulten ENaC-tg/m3-ko-Modell ausgeprägte Abschwächung der Becherzellhyperplasie ist möglicherweise nicht direkt begründet in dem Fehlen von m3, sondern erfolgt eventuell sekundär begründet in der Abnahme der Mukusmenge, die auf dem Atemwegs-

epithel abgelagert wird. Auch die Arbeitsgruppen um Patel und Robichaud konnten keinen direkten Einfluss von m3 auf eine Becherzellhyperplasie identifizieren, wobei deren untersuchte m3-ko-Mausmodelle keine ENaC-Überexpression und damit einen anderen Genotyp und Phänotyp aufwiesen (PATEL *et al.*, 2006; ROBICHAUD *et al.*, 2005).

6.1.1.1.2 **Hypothese: mCLCA3 induziert direkt eine Becherzellhyperplasie.**

Im adulten ENaC-tg/m3-ko-Modell konnte im Vergleich zu den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt eine Reduktion der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran im gesamten Respirationstrakt detektiert werden, wobei jedoch keine statistische Signifikanz gefunden werden konnte.

Im Gegensatz dazu konnte bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko im Vergleich zu den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt kein Einfluss auf die Becherzellzahl detektiert werden.

Die Kombination der ENaC-Überexpression mit dem m3-ko schwächt die Becherzellhyperplasie ab, wobei die fehlende statistische Signifikanz möglicherweise in der geringen Tierzahl begründet ist.

Auch die Arbeitsgruppe um Long identifizierte eine Abschwächung der Becherzellhyperplasie im m3-ko-Modell, wobei diese jedoch ausschließlich nach allergischer Stimulation mit Ovalbumin detektiert werden konnte (LONG *et al.*, 2006). Gegen diese Hypothese sprechen die Ergebnisse der m3-ko-Studien der Arbeitsgruppen um Robichaud und Patel, die weder nach allergischer Stimulation noch ohne jegliche Stimulation einen Einfluss von m3 auf eine Becherzellhyperplasie oder -metaplasie identifizieren konnten (PATEL *et al.*, 2006; ROBICHAUD *et al.*, 2005). Da diese Arbeitsgruppen jedoch ein anderes ko-Modell und andere Challengebedingungen nutzten, könnten weitere modulierende Faktoren für die Ausbildung einer Becherzellhyperplasie von Bedeutung sein. Die Mechanismen, über die m3 die Becherzellhyperplasie direkt beeinflussen könnte, sollten daher in weiteren Studien näher untersucht werden.

6.1.1.1.3 **Hypothese: Der mCLCA3-Status nimmt einen Einfluss auf die lokale Immunabwehr in den Atemwegen.**

Im adulten Mausmodell ENaC-tg/m3-ko fanden sich vergleichend mit den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt keine Unterschiede hinsichtlich der intraluminalen Einwanderung von Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz dazu konnten jedoch bei erstgenanntem Genotyp zusätzlich eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in geringer

Anzahl identifiziert werden. Eosinophile Granulozyten spielen bei parasitären Erkrankungen und allergischen Reaktionen eine Rolle. Ob dieses hier im Sinne einer Überempfindlichkeitsreaktion von Bedeutung ist, kann mit dieser Arbeit auch auf Grund der fehlenden statistischen Signifikanz nicht adressiert werden. Bei den adulten Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko konnte im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko keine Veränderung des Entzündungszellbildes detektiert werden.

Möglicherweise induziert der m3-ko nur unter bestimmten biologischen Situationen eine weiter gefächerte Entzündungsreaktion in Folge einer lokalen, durch das Fehlen von m3 verursachten Immunreaktion. Auch die Arbeitsgruppe um Long konnte im m3-ko-Modell nur nach allergischer Stimulation Verschiebungen hinsichtlich der Entzündungsreaktion im Respirationstrakt detektieren, wobei deren untersuchtes Modell durch eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Bronchoalveolarlavage gekennzeichnet war (LONG *et al.*, 2006).

6.1.2 **Moduliert der mCLCA3-Status im juvenilen Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?**

Bei den juvenilen ENaC-tg/m3-ko Tiere zeigten sich vor allem die intraluminalen Mukusakkumulationen in der Trachea, die Becherzellhyperplasie im gesamten Respirationstrakt mit Ausnahme der Trachealmitte, die Epithelzellhypertrophie in der Trachea und den großen Bronchien sowie die Entzündungszellinfiltrate in einem vergleichbaren Schweregrad wie bei den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt. Eine signifikant stärkere Ausprägung der Becherzellhyperplasie fand sich hingegen bei den ENaC-tg/m3-ko Tieren im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in der Mitte der Trachea, eine signifikant größere Epithelzellhypertrophie fand sich in den mittelgroßen und kleinen Bronchien. Molekularbiologische Unterschiede in der Regulation der Muzingene fanden sich nicht.

Die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko zeigten im Vergleich zu den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-ko signifikant größere intraluminale Mukusakkumulationen im gesamten Respirationstrakt, eine verstärkte *Mucus volume density* in den Bronchien, eine Becherzellhyperplasie in der Trachea und in den Bronchien, eine signifikante Epithelzellhypertrophie im gesamten Respirationstrakt sowie signifikant erhöhte Entzündungszellinfiltrate durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen in den Atemwegslumina.

Zusammenfassend kann für die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko gesagt werden, dass sie sich phänotypisch tendenziell vergleichbar mit den juvenilen Tieren des

Genotyps ENaC-tg/m3-wt darstellen, wobei sich die Epithelzellhypertrophie in den mittelgroßen, sowie die Becherzellhyperplasie in der Mitte der Trachea signifikant verstärkt findet. Scheinbar moduliert m3 den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose im juvenilen Mausmodell im Gegensatz zum adulten Modell nicht. Ob eine biologische Bedeutung der in einzelnen Lokalisationen verstärkten Becherzellhyperplasie und Epithelzellhypertrophie vorliegt, sollte kritisch betrachtet und durch Untersuchungen an einer erhöhten Tierzahl abgeklärt werden.

6.1.2.1 **Warum moduliert der mCLCA3-Status im adulten Mausmodell den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose und nicht im juvenilen Modell?**

Die juvenilen Tiere sowohl des Genotyps ENaC-tg/m3-ko als auch ENaC-tg/m3-wt sind durch eine stärkere Ausprägung des Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyps im Vergleich zu den adulten Tieren charakterisiert, wobei sich dieses bevorzugt in einer erhöhten intraluminalen Mukusakkumulation sowie einer ausgeprägteren Epithelzellhypertrophie bei nahezu allen Genotypenvergleichen darstellt. Auch die Arbeitsgruppe um Mall identifizierte bei der Untersuchung ihres „ENaC-Modells“ einen stärkeren Phänotyp im juvenilen Alter (MALL *et al.*, 2008). Möglicherweise ist der durch den m3-ko in Kombination mit der Überexpression der beta-Untereinheit des ENaC hervorgerufene Rescue-Effekt nicht stark genug, um eine phänotypische Veränderung der schwerwiegenden Lungensymptomatik im juvenilen Alter zu erreichen, wohingegen die weniger stark ausgeprägte Symptomatik der adulten Tiere durch den Rescue-Effekt positiv beeinflusst und phänotypisch identifiziert werden kann.

6.2 **Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Daten aus der Literatur**

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit ähnlichen Studien verglichen, wobei lediglich die Altersstufen und Lokalisationen dargestellt werden, deren Vergleich auf Grund der Datenlage in der Literatur möglich und sinnvoll erscheint. Eine zusätzliche tabellarische Darstellung soll bei einzelnen Kriterien eine einfache und schnelle Übersicht über die einzelnen Kriterien gestatten, wobei abschließend kurz auf mögliche Ursachen der Abweichungen eingegangen wird.

6.2.1 **Schweregrad des Phänotyps und statistische Signifikanzen**

Mall und Kollegen beobachteten eine erhöhte Sterblichkeit der neonaten Mäuse des Genotyps ENaC-tg mit klinischer Atemnot (MALL *et al.*, 2008), wohingegen die in dieser

Arbeit genutzten Tiere weder durch erhöhte Sterblichkeitsraten, noch durch klinische Anzeichen einer Dyspnoe gekennzeichnet waren. Dem zugrunde könnte der unterschiedliche genetische Hintergrund der Mäuse liegen. Weiterhin kann eine Attenuation des Phänotyps durch eine ausgedehnte Zucht nicht ausgeschlossen werden. Rozmahel und Kollegen untersuchten bereits den Einfluss des genetischen Hintergrundes muriner CFTR-Knock-out-Modelle auf den Schweregrad der Mukoviszidose-Symptomatik, wobei sie deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen nachweisen konnten (ROZMAHEL *et al.*, 1996). Auch die Arbeitsgruppe um Whitehead identifizierte deutliche Unterschiede bei der Ausprägung einer allergischen Atemwegserkrankung zwischen den verschiedenen Mausstämmen (WHITEHEAD *et al.*, 2003). Dabei reagierte der Stamm C57BL/6J nach Stimulation mit Ovalbumin im Gegensatz zu beispielsweise dem Stamm BALB/c nicht mit einer Hyperreaktivität der Atemwege (WHITEHEAD *et al.*, 2003), sodass es sich bei C57BL/6J um einen relativ widerstandsfähigen Stamm zu handeln scheint. Dieses spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Mall wider, wobei sich der Schweregrad der pulmonalen Mukoviszidose-Symptome bei dem dort genutzten gemischten genetischen Hintergrund C3H x C57BL/6 (C3B6) als sehr viel ausgeprägter darstellt als bei den in dieser Arbeit genutzten Tieren auf einem C57BL/6 Hintergrund (MALL *et al.*, 2004; MALL *et al.*, 2008). Eine abgeschwächte Symptomatik bei dem in dieser Arbeit genutzten Mausstamm C57BL/6 könnte somit die geringe Anzahl statistischer Signifikanzen im Gegensatz zu Vergleichsstudien auf anderen genetischen Hintergründen erklären.

6.2.2 Körpergewicht

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere zeigten keine biologischen oder statistischen Unterschiede in ihrem Körpergewicht. Weder in Studien über das „ENaC-Modell“ (LIVRAGHI *et al.*, 2009; MALL *et al.*, 2004), noch in vergleichbaren Arbeiten über m3-ko-Modelle (LONG *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2006; ROBICHAUD *et al.*, 2005) konnten Angaben über das Körpergewicht der Tiere in den in dieser Arbeit untersuchten Altersgruppen gefunden werden. Da es sich bei diesen Modellen um Lungen-Modelle ohne Mukoviszidose-Symptomatik im Digestionstrakt handelt, scheint ein Einfluss auf das Körpergewicht vernachlässigbar gering zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten Mukoviszidose-Mäuse im CFTR-Modell neben intestinalen Obstruktionen ein reduziertes Körpergewicht in unterschiedlich starker Ausprägung, begründet in einer gestörten Lipolyse und einer verminderten Resorptionsfähigkeit des Darmes für Fettsäuren (BIJVELDS, 2003).

6.2.3 Intraluminale Mukusakkumulation

Im Gegensatz zu der *Mucus volume density* / Mukusmenge als eine an Hand der vermessenen Mukusfläche im Schnittbild errechnete Quantifizierung des Schleimes handelt es sich bei der intraluminale Mukusakkumulation um eine Beschreibung der räumlichen Verteilung des Schleimes. Dabei wurde in der Trachea ein Score-System zu Grunde gelegt, welches die anteilige Verlegung der Trachealquerschnitte mit Mukus beschreibt, wohingegen in der Lunge die Anzahl der mit Mukus verlegten Bronchien im histologischen Schnittbild quantifiziert wurden.

Sowohl bei den juvenilen Tieren der Genotypen ENaC-tg/m3-ko bzw. ENaC-tg/m3-wt dieser Arbeit als auch bei den von Mall und Kollegen untersuchten ENaC-tg Tieren der gleichen Altersgruppe fanden sich intraluminale Mukusakkumulationen in der Trachea, die sich bis in die Bronchien ausdehnten und laut Mall im adulten Alter bestehen blieben (MALL *et al.*, 2008). Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten ENaC-tg Tieren der adulten Altersgruppe blieben die intraluminale Mukusakkumulationen bestehen, wobei sich jedoch deren Schweregrad gegenüber den juvenilen Tieren reduzierte, wie auch Mall und Mitarbeiter feststellen konnten (MALL *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe um Livraghi konnte ebenfalls bei den ENaC-tg Mäusen deutliche intraluminale Mukusplaques detektieren, sodass zusammenfassend gesagt werden kann, dass die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich einer erhöhten intraluminale Mukusakkumulation bei ENaC-tg Tieren mit den bisherigen Daten dazu in der Literatur übereinstimmen (LIVRAGHI *et al.*, 2009; MALL *et al.*, 2008).

6.2.4 Mukusmenge / *Mucus volume density*

Im Literaturvergleich mit den von Mall und Mitarbeitern untersuchten Mäusen fanden sich sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten Tieren in den großen und mittelgroßen Bronchien ähnliche Mukusmengen (MALL *et al.*, 2008), wobei die von Mall genutzten ENaC-wt-Tiere mit den in dieser Arbeit untersuchten Genotypen ENaC-wt/m3-wt und ENaC-wt/m3-ko verglichen wurden (Tabelle 35).

Bei dem Vergleich der von der Arbeitsgruppe um Mall untersuchten ENaC-tg juvenilen Tieren mit den juvenilen Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt dieser Arbeit wiesen die ENaC-tg/m3-ko Tiere in den großen Bronchien eine etwa halb so große Mukusmenge wie die Vergleichsgenotypen auf, wohingegen sich die anderen Werte stark ähnelten (Tabelle 35). Im Vergleich der adulten ENaC-tg Tiere von Mall mit den adulten Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-ko fanden sich keine Unterschiede in deren Mukusmenge, wohingegen die

adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt in dieser Arbeit in beiden Lokalisationen eine nahezu 3-fache Mukusmenge aufwiesen (Tabelle 35).

Tabelle 35: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Mucus volume density in nl/mm² mit Daten der Literatur

Alter	Lokalisation	ENaC-tg / m3-ko	ENaC-tg (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-tg / m3-wt	ENaC-wt / m3-ko	ENaC-wt (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-wt / m3-wt
juvenil	L1	8	18	20	3	3	1
juvenil	L2	8	8	9	1	0,5	2
adult	L1	16	12	30	2	2	3
adult	L2	4	4	13	0,5	0,1	0,5

ENaC-transgene Tiere zeigen in den Bronchien deutlich größere Mukusmengen als ENaC-wt Tiere, wobei es in Kombination mit einem mCLCA3-ko zu einer Milderung des Phänotyps zu kommen scheint. wt =Wildtyp, tg =transgen, ko =knock-out, L1=große Bronchien, L2 =mittelgroße Bronchien

Die deutlich größeren Mukusmengen der adulten Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-wt könnten dabei einerseits in unterschiedlichen Haltungsbedingungen begründet sein, andererseits könnte das unterschiedliche Alter der adulten Tiere für die Abweichungen hinsichtlich der Mukusmenge verantwortlich sein, wobei die adulten Mäuse der Vergleichsstudie im Alter von 6 Wochen untersucht wurden, während die adulten Tiere dieser Arbeit im Alter von 9 Wochen charakterisiert wurden. Bei der Reduzierung der Mukusmenge um mehr als die Hälfte in den großen Bronchien der Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko könnte es sich um einen durch die doppelte Transgenität hervorgerufenen Rescue-Effekt handeln, der bereits näher besprochen wurde.

Die *Mucus volume density* wurde bislang nicht im m3-ko-Tier bestimmt (LONG *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2006; ROBICHAUD *et al.*, 2005).

6.2.5 Becherzellanzahl pro mm Basalmembran

Hinsichtlich der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran fanden sich deutliche Abweichungen der absoluten Zahlen im Literaturvergleich. Wie in Tabelle 36 ersichtlich, fanden sich bei den juvenilen Tieren aller Genotypen in den großen und mittelgroßen Bronchien deutlich weniger Becherzellen als bei den von Mall genutzten Vergleichsgenotypen (MALL *et al.*,

DISKUSSION

2008). Mit Ausnahme des Genotyps ENaC-tg/m3-wt, der um etwa ein Drittel mehr Becherzellen pro mm Basalmembran als der Vergleichsgenotyp ENaC-tg von Mall aufwies, fanden sich auch bei den adulten Tieren der Genotypen ENaC-tg/m3-ko, ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/ m3-wt deutlich weniger Becherzellen pro mm Basalmembran als bei den Vergleichsgenotypen in der Studie von Mall und Kollegen. Trotz der Abweichungen hinsichtlich der absoluten Zahlen decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit und der Vergleichsstudie von Mall und Mitarbeitern bezüglich der Relationen zwischen den Genotypen bzw. der Ausbildung von Becherzellhyperplasien und -metaplasien bei den ENaC-transgenen Tieren.

Tabelle 36: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran mit Daten der Literatur

Alter	Lokalisation	ENaC-tg / m3-ko	ENaC-tg (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-tg / m3-wt	ENaC-wt / m3-ko	ENaC-wt (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-wt / m3-wt
juvenil	L1	8	38	21	3	22	1
juvenil	L2	9	32	9	1	9	2
adult	L1	16	21	30	2	8	3
adult	L2	3	7	14	1	1	0

ENaC-transgene Tiere zeigen in den Bronchien deutlich höhere Becherzellzahlen pro mm Basalmembran als ENaC-wt Tiere, wobei es in Kombination mit einem mCLCA3-ko zu einer Milderung des Phänotyps zu kommen scheint. wt =Wildtyp, tg =transgen, ko =knock-out, L1=große Bronchien, L2 =mittelgroße Bronchien

Die geringeren Becherzellzahlen pro mm Basalmembran der Tiere dieser Arbeit könnten möglicherweise auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen sein, wie bereits unter 6.2.1 diskutiert wurde. Auch Unterschiede hinsichtlich der Haltungsbedingungen, der exakten untersuchten Lokalisation sowie des genauen Alters der adulten Tiere sollten berücksichtigt werden, wobei Mall und Kollegen die Tiere im Alter von 6 Wochen untersuchten, während in dieser Arbeit 9 Wochen alte Tiere charakterisiert wurden. Möglicherweise ist das Fehlen statistischer Signifikanzen begründet in der relativ kleinen Tierzahl von n=5 Tieren je Genotyp und Altersgruppe, sodass eine Erhöhung der Tierzahl statistisch signifikante Unterschiede detektiert hätte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich einer erhöhten Becherzellanzahl bei den ENaC-tg Tieren mit den Angaben früherer Arbeiten übereinstimmen, wobei jedoch Abweichungen in den absoluten Zahlen bestehen (MALL *et al.*, 2008).

Die Arbeitsgruppe um Robichaud sowie Patel und Mitarbeiter untersuchten jeweils den Zusammenhang zwischen m3-ko und Becherzellhyperplasie in den Atemwegen in unterschiedlichen m3-ko-Mausmodellen, wobei beide Gruppen wie bei dem Genotyp ENaC-wt/m3-ko dieser Studie keinen biologischen oder statistischen Unterschied zwischen m3-ko-Tieren und m3-wt-Kontrolltieren hinsichtlich der Becherzellanzahl detektieren konnten (PATEL *et al.*, 2006; ROBICHAUD *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu identifizierten Long und Mitarbeiter eine Abnahme der Becherzellhyperplasie im m3-ko-Modell nach allergischer Stimulation mit Ovalbumin, sodass er einen Einfluss von m3 auf die Ausbildung einer Becherzellhyperplasie nach allergischer Stimulation bestätigt, wohingegen ohne Stimulation kein Effekt identifiziert werden konnte (LONG *et al.*, 2006). Die adulten Tiere des in dieser Arbeit untersuchten Genotyps ENaC-tg/m3-ko zeigten im gesamten Respirationstrakt eine Abschwächung der Becherzellhyperplasie im Vergleich mit den Tieren des Genotyps ENaC-wt/m3-wt, sodass auch hier in Übereinstimmung mit Long von einem Einfluss von m3 auf die Ausbildung einer Becherzellhyperplasie zumindest nach bestimmten Stimuli ausgegangen werden kann.

6.2.6 Epithelhöhe

Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit bei den verschiedenen Genotypen gemessenen Epithelhöhen mit den Angaben aus der Literatur (MALL *et al.*, 2008) fanden sich bei den juvenilen Tieren vergleichbare Werte in den mittelgroßen Bronchien, während die adulten Tiere der Genotypen ENaC-wt/m3-wt und ENaC-wt/m3-ko im Mittel um etwa ein Drittel größere Epithelhöhen als der Vergleichsgenotyp ENaC-wt der Arbeitsgruppe um Mall aufwies (Tabelle 37). Bei den Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Epithelhöhe des Vergleichsgenotyps ENaC-tg der Arbeitsgruppe um Mall.

Tabelle 37: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Epithelhöhen in μm mit Daten der Literatur

Alter	Lokalisation	ENaC-tg / m3-ko	ENaC-tg (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-tg / m3-wt	ENaC-wt / m3-ko	ENaC-wt (MALL <i>et al.</i> , 2008)	ENaC-wt / m3-wt
juvenil	L2	14	14	12	10	10	8
adult	L2	17	18	19	18	13	17

In den mittelgroßen Bronchien weisen ENaC-transgene Tiere scheinbar unabhängig von ihrem mCLCA3-Status größere Epithelhöhen als ENaC-wt Tiere auf. wt = Wildtyp, tg = transgen, ko = knock-out, L2 = mittelgroße Bronchien

Ursächlich für die Abweichungen der Epithelhöhe bei den adulten ENaC-wt-Tieren könnte neben den Haltungsbedingungen der unterschiedliche genetische Hintergrund in Frage kommen, wie bereits unter 6.2.1 diskutiert wurde. Die Untersuchung der Epithelhöhe im adulten Alter erfolgte bei Mall mit 6 Wochen, wohingegen die adulten Tiere dieser Arbeit mit 9 Wochen phänotypisiert wurden, wobei auch dieser Altersunterschied ursächlich in Betracht gezogen werden sollte.

Long und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von m3 auf die Ausbildung einer Epithelzellhypertrophie im m3-ko-Modell (LONG *et al.*, 2006), wobei sie in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit keinen Zusammenhang darstellen konnten.

6.2.7 Entzündungszellen in den Atemwegen

Da die Entzündungszellen in dieser Arbeit rein histologisch und nicht wie in den Vergleichsstudien per Bronchoalveolarlavage quantifiziert und qualifiziert wurden, wird auf einen Vergleich der Entzündungszellanzahl mit der Literatur verzichtet und der Schwerpunkt hingegen auf den Entzündungszelltyp gelegt (LIVRAGHI *et al.*, 2009; MALL *et al.*, 2008). Dabei stellt die Untersuchung der Bronchoalveolarlavage eine sensitivere Methode vor allem für die Quantifizierung der Entzündungszellen dar, wobei histologische Präparate lediglich Schnittbilder repräsentieren und so stichprobenartig einen Überblick über die Entzündungsvorgänge gestatten.

Makrophagen stellen den bei den juvenilen Tieren dieser Arbeit dominierenden Entzündungszelltyp dar, wobei die Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt deutliche intraluminale Ansammlungen aufwiesen und sich bei den Genotypen ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/m3-wt nur vereinzelt Makrophagen fanden. Neben der Infiltration durch Makropha-

DISKUSSION

gen wurde das Bild der Entzündungsreaktion bei den Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt durch eine moderate Menge an neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet, wobei bei den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt zusätzlich vereinzelt eosinophile Granulozyten identifiziert werden konnten. Auch Mall und Kollegen identifizierten Makrophagen als dominierenden Entzündungszelltyp bei den juvenilen ENaC-tg Tieren und in geringerer Anzahl auch bei den ENaC-wt-Tieren (MALL *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde bei der Arbeitsgruppe um Mall die Makrophageninfiltration der juvenilen ENaC-tg Tiere durch eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit eosinophilen Granulozyten begleitet, wohingegen neutrophile Granulozyten lediglich in geringer Zahl identifiziert wurden (MALL *et al.*, 2008). Livraghi und Kollegen identifizierten allerdings entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit Makrophagen und neutrophile Granulozyten in vorherrschender Anzahl sowie in geringerer Zahl eosinophile Granulozyten bei den ENaC-tg Tieren (LIVRAGHI *et al.*, 2009). Die adulten Tiere der Genotypen ENaC-tg/m3-ko und ENaC-tg/m3-wt dieser Arbeit waren durch eine Entzündungsreaktion mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu gleichen Teilen in den Atemwegslumina gekennzeichnet, wobei ersterer Genotyp zusätzlich in geringer Anzahl eosinophile Granulozyten und Lymphozyten aufwies. Dabei wies die Infiltration mit Makrophagen einen vergleichbaren Schweregrad wie bei den juvenilen Tieren auf, wohingegen die neutrophile Entzündungsreaktion bei den adulten Tieren stärker als bei den juvenilen Tieren ausgeprägt war. Bei den adulten Tieren der Genotypen ENaC-wt/m3-ko und ENaC-wt/m3-wt konnten histologisch keine intraluminalen Entzündungszellen detektiert werden. Auch Mall und Mitarbeiter identifizierten bei den adulten ENaC-tg Tieren neben vereinzelt Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten eine moderate Entzündungsreaktion durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu annähernd gleichen Teilen in der Bronchoalveolarlavage (MALL *et al.*, 2008). Dabei waren jedoch auch die adulten ENaC-wt-Tiere durch eine gleich stark ausgeprägte Infiltration von Makrophagen mit vereinzelt Lymphozyten gekennzeichnet. Auch Mall und Mitarbeiter konnten bei den juvenilen Tieren einen höheren Schweregrad der Entzündungsreaktion als bei den adulten Tieren nachweisen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu den Angaben aus der Literatur insofern decken, als dass vor allem juvenile, aber auch adulte ENaC-tg Mäuse deutliche Entzündungsreaktionen in den Atemwegen aufweisen (LIVRAGHI *et al.*, 2009; MALL *et al.*, 2008). Dabei scheint die Entzündungsreaktion durch den in den Atemwegen abgelagerten Mukus induziert zu werden, wobei vor

allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten versuchen, den Schleim phagozytisch zu beseitigen.

6.2.8 Genregulation der Becherzellmarker *muc4*, *muc5ac*, *muc5b* und *mCLCA3*

Bei den in dieser Arbeit mittels quantitativer RT-PCR untersuchten Muzingenen *muc4*, *muc5ac* und *muc5b* konnten weder bei den juvenilen noch bei den adulten Tieren biologische oder statistisch signifikante Unterschiede zwischen deren Expression im Lungenparenchym detektiert werden. Auch Mall und Kollegen untersuchten die Regulation dieser Gene in der Lunge, wobei die juvenilen Tiere mit 3 Wochen eine Woche älter, die adulten Tiere mit 6 Wochen hingegen drei Wochen jünger als die Tiere dieser Arbeit waren (MALL *et al.*, 2008). Mall und Mitarbeiter identifizierten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Regulation des Muzingens *muc4* bei den juvenilen Tieren, sowie der Muzingene *muc5ac* und *muc5b* beider Altersgruppen der ENaC-transgenen Tiere im Vergleich mit ENaC-wt-Kontrolltieren der gleichen Altersgruppe. Ebenfalls konnten Mall und Mitarbeiter eine Überexpression des Becherzellmarkers *m3* in den transgenen Tieren jeder Alterstufe identifizieren (MALL *et al.*, 2008). In dieser Studie konnte die Überexpression von *mCLCA3* in den adulten ENaC-tg/*m3*-wt gegenüber den ENaC-wt/*m3*-wt Tieren bestätigt werden. In der juvenilen Gruppe zeigten sich hingegen keine differentielle Regulation. Die fehlende Expression von *m3* in den ENaC-tg/*mCLCA3*-ko bzw. den ENaC-wt/*mCLCA3*-ko Tieren bestätigte den ko-Status. Sowohl die Muzingene als auch *m3* werden in den gleichen Zelltypen, nämlich Becherzellen, exprimiert. Die fehlende differentielle Expression der Muzingene im Gegensatz zu *m3* in den adulten Tieren spricht für eine höhere Sensitivität der *m3*-RT-PCR.

Die molekularbiologische Untersuchung der Muzingenregulation spiegelt nicht die differentielle Becherzellmorphometrie in dieser Arbeit wieder. Die unterschiedlichen Daten zur Literatur sind möglicherweise auf unterschiedliche Tierzahlen, die genutzten Altersgruppen, den unterschiedlichen genetischen Hintergrund sowie andere Haltungsbedingungen zurückzuführen.

Robichaud und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss des *m3*-ko auf die Muzingenregulation, wobei nach Stimulation mit Ovalbumin eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression von *muc5ac* bei den *m3*-ko Tieren im Vergleich zu den *m3*-wt Tieren identifiziert werden konnte, während sich ohne allergische Stimulation kein Unterschied zwischen den *m3*-ko Tieren und den *m3*-wt Tieren fand (ROBICHAUD *et al.*, 2005).

6.2.9 Globale Genexpressionsanalyse

In dieser Arbeit konnten mittels DNA-Microarray-Technologie keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Genexpression identifiziert werden, wobei dieses möglicherweise in der geringen Tierzahl von drei Tieren pro Genotypgruppe begründet ist. Aus Kostengründen konnte jedoch die Untersuchung einer größeren Tierzahl nicht gewährleistet werden. Eine weitere mögliche Ursache für das Ausbleiben von Unterschieden bei der Microarray-Untersuchung könnte in der Wahl der zu untersuchenden Altersgruppe gegeben sein. Wie sich im Laufe der Untersuchungen zeigte, weisen die juvenilen Tiere phänotypisch teilweise einen deutlich ausgeprägteren Schweregrad der Mukoviszidose-Symptome in der Lunge als die adulten Tiere auf, sodass die Untersuchung juveniler statt adulter Tiere im DNA-Microarray möglicherweise statistisch signifikant regulierte Gene identifiziert hätte. Gegen diese Annahme spricht jedoch auch das Fehlen einer unterschiedlichen Regulation der mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersuchten Muzingene, wobei hier beide Altersgruppen vergleichend untersucht wurden. Auch die größere Anzahl untersuchter Tiere von fünf Tieren pro Genotypgruppe identifizierte dabei keinen Unterschied.

Auch Robichaud und Mitarbeiter untersuchten *m3*-ko-Mäuse mittels DNA-Microarray um mögliche, den *m3*-ko kompensierende Gene zu identifizieren (ROBICHAUD *et al.*, 2005). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede in dem globalen Genexpressionprofil zwischen den *m3*-ko Tieren und den *m3*-wt-Kontrolltieren identifiziert werden.

Im Gegensatz zu den eindeutigen Daten aus der RT-PCR dieser Arbeit hinsichtlich der Genexpression von *m3* in den adulten Tieren fand sich keine unterschiedliche Regulation von *m3* mittels DNA-Microarray-Technologie. In den ENaC-tg/*m3*-wt Tieren konnte im Gegensatz zur RT-PCR-Technik mit Hilfe der Microarray-Technik keine differentielle Überexpression im Vergleich zu den ENaC-wt/*m3*-wt Tieren detektiert werden. Dies spricht für eine höhere Sensitivität der RT-PCR Technik. Auch bei den Tieren mit *m3*-ko-Status konnte im Gegensatz zur RT-PCR keine differentielle Regulation gezeigt werden. Robichaud und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei ihren *m3*-ko Tieren ein trunkiertes Transkript im Anfangsbereich gemacht wird, aber ohne entsprechende Translation in ein Protein (ROBICHAUD *et al.*, 2005). Auch das hier genutzte *m3*-ko-Modell macht in dem Bereich, wo die Sonde (5'-CGTCATCGCCATAGACCACGACGTGCCGGAAGATGAAGCCCTCATTCAAC-3') für die DNA-Microarray-Technik liegt, noch ein *m3*-Transkript (persönliche Mitteilung Dr. Lars Mundhenk 2012). Die dabei fehlende Proteinsynthese konnte auch von Patel und Kollegen nachgewiesen werden (PATEL *et al.*, 2006).

Unter den jeweils 25 auch ohne statistische Signifikanz am stärksten regulierten Genen der Vergleichsgruppen dieser Arbeit fanden sich jedoch wie bereits dargestellt (Tabelle 30 bis Tabelle 33) einzelne Vertreter, die bereits in einem Zusammenhang mit Mukus untersucht wurden. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

6.2.9.1 **Auffallende Aufregulation des *Epidermal growth factor receptors***

Der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) wurde bei dem Genotyp ENaC-tg/ m3-ko im Vergleich zu dem Genotyp ENaC-tg/m3-wt höher reguliert, wobei jedoch keine statistische Signifikanz vorlag. Für den EGFR wird eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Hypersekretion von Becherzellen beschrieben, wobei die Aktivierung einer EGFR-Kaskade die Muzinhypersekretion in Folge einer Stimulation durch gram positive Bakterien und Tabakrauch (BASBAUM *et al.*, 2002) bzw. Rhinoviren (HEWSON *et al.*, 2010) sowie als Flagellin-Antwort (YU *et al.*) induziert.

6.2.9.2 **Angedeutet erhöhte Expression von Zink Finger-Proteinen**

Mehrere verschiedene Zink Finger-Proteine wurden bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-ko im Vergleich zu dem Genotyp ENaC-tg/m3-wt ohne statistische Signifikanz höher reguliert. Zink Finger-Proteine als Transkriptionsfaktoren scheinen eine Rolle bei der Hyperproduktion von Mukus zu spielen, wobei beispielsweise Schnurri (Shn)-2 als ein großes Zink Finger-Protein im murinen knock-out-Modell bei Shn-2-defizienten Mäusen nach Ovalbumin-stimulation zu einer Mukushyperproduktion und eosinophilen Entzündungsreaktion im Respirationstrakt sowie zu einer Atemwegshyperresponsivität führt (IWAMURA *et al.*, 2007).

6.2.9.3 **Tendenz einer Abregulation des Angiotensin II Rezeptors Typ 1b**

Der Angiotensin II Rezeptor Typ 1b (Agtr1b) zeigte sich bei dem Genotyp ENaC-tg/ m3-ko im Vergleich zu dem Genotyp ENaC-tg/m3-wt herunter reguliert, wobei jedoch keine statistische Signifikanz vorlag.

Typ 1 Angiotensin II Rezeptoren scheinen durch die negative Regulation der Entwicklung einer allergischen Entzündung eine Rolle in der Pathogenese des bronchialen Asthmas zu spielen, indem Agtr1a das T-Helferzell-Gleichgewicht in Richtung Th-1-Vorherrschaft verschiebt (OHWADA *et al.*, 2007). Im murinen Agtr1a-knock-out-Modell zeigten Agtr-defiziente Mäuse nach Stimulation mit Ovalbumin eine deutliche Mukushypersekretion sowie eosinophile Entzündungsreaktionen im Bronchialgewebe (OHWADA *et al.*, 2007).

6.2.9.4 **Deutliche Aufregulation der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals**

Die beta-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (Scnn1b/ beta-ENaC) wurde bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-ko gegenüber dem Genotyp ENaC-wt/ m3-ko höher reguliert, wobei die Rolle des epithelialen Natriumkanals in der Pathogenese der Mukoviszidose bereits unter 2.1.3.2 ausführlich beschrieben wurde.

6.2.9.5 **Aufregulation des Gamma-Aminobuttersäure Rezeptors**

Der Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA Rezeptor) wurde bei dem Genotyp ENaC-tg/m3-ko gegenüber dem Genotyp ENaC-wt/m3-ko ohne statistische Signifikanz höher reguliert.

Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Asthmas zu spielen, wobei sie über Interleukin-13 eine Becherzellhyperplasie und -metaplasie sowie eine Mukushyperproduktion vermitteln (CURRAN und COHN, ; MIZUTA *et al.*, 2008; TESFAIGZI, 2008; XIANG *et al.*, 2007). Im Gehirn fungiert Gamma-Aminobuttersäure über den GABA Rezeptor als hemmender Neurotransmitter, wohingegen in den Epithelzellen eine GABA-vermittelte exzitatorische Wirkung beschrieben wird (XIANG *et al.*, 2007). Dabei sind durch Ovalbumin stimulierte Mäuse durch eine gesteigerte Expression des GABA-Rezeptor Subtyps A in der apikalen Membran der Atemwegsepithelzellen sowie durch klinische Symptome des allergischen Asthmas gekennzeichnet (XIANG *et al.*, 2007). Die lokale intranasale Applikation eines GABA-Rezeptor Inhibitors unterdrückte dabei die durch Stimulation mit Ovalalbumin induzierte Becherzellhyperplasie und Mukushyperproduktion im Mausmodell (XIANG *et al.*, 2007).

6.2.9.6 **Abregulation der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie**

Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie 2 wurde bei dem Genotyp ENaC-tg/ m3-ko gegenüber dem Genotyp ENaC-wt/m3-ko ohne statistische Signifikanz herunter reguliert.

Der Tumornekrosefaktor alpha stimuliert die mRNA Expression verschiedener Muzingene, unter anderem Muc2, Muc3 sowie *Muc5ac* (KOO *et al.*, 2002) und induziert im Mausmodell eine Reduktion mukushaltiger Becherzellen im Dünndarm juveniler Mäuse sowie eine Mukushypersekretion und erhöhte Sensitivität von Becherzellen gegenüber Prostaglandin E2 (MCELROY *et al.*, 2011). Dabei wird die erhöhte mRNA Expression der Muzingene über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 vermittelt, wohingegen die Reduktion der Becherzellanzahl über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 vermittelt wird (MCELROY *et al.*, 2011).

Ob alle die hier näher beschriebenen Genregulationen eine biologische Bedeutung in diesem Mausmodell besitzen, könnte mittels quantitativer RT-PCR an einer erhöhten Tierzahl weiter eingeschätzt werden.

6.3 Zusammenfassende Methodenkritik

Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit muss vor allem im Hinblick auf eine geringe Gruppengröße bei hoher interindividueller Variabilität in einigen wesentlichen Parametern kritisch betrachtet werden. Dabei reduzieren jedoch sowohl der große Arbeitsaufwand der morphometrischen Analysen als auch die hohen Kosten der Microarray-Technologie die Möglichkeit schneller weiterer Untersuchungen, um die Aussagekraft der Daten dieser Arbeit zu steigern. Weiterhin muss unbedingt im Vergleich zu Daten aus der Literatur der unterschiedliche genetische Hintergrund der Mäuse beachtet werden.

6.4 Ausblick auf mögliche zukünftige Therapieansätze und weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen punktuellen Einfluss von m3 auf den ENaC-Phänotyp hin und könnten einen visionären Therapieansatz in der Humanmedizin ermöglichen. Dabei könnte die Unterdrückung der Expression von hCLCA1 beim Menschen als orthologen Vertreter von m3 bei der Maus möglicherweise zu einer Abschwächung des Mukoviszidose-Phänotyps in der Lunge bei erwachsenen Patienten führen. Dies wäre insofern ein hoffnungsvoller Therapieansatz, da der bisherige Therapieansatz mittels Amilorid im ENaC-Mausmodell lediglich bei der Amiloridgabe nach der Geburt, nicht aber bei adulten Mäusen eine positive Wirkung zeigt (MALL, 2009).

Auch Patel und Mitarbeiter identifizierten m3 als potentielles Ziel für therapeutische Ansätze bei hypersekretorischen Atemwegserkrankungen (PATEL *et al.*, 2006). Dazu sollte aber unbedingt in weiterführenden Arbeiten die Hypothese geprüft werden, ob die Unterdrückung der m3-Expression in den Atemwegen zu einer Verbesserung des pulmonalen Phänotyps bei erwachsenen Mukoviszidose-Patienten führt. Die m3-Expression könnte im „ENaC“-Mausmodell mit Hilfe eines viralen Vektors unterdrückt werden, analog zu der Studie von Nakanishi und Kollegen (NAKANISHI *et al.*, 2001), die in einem Wildtypmodell durch die Unterdrückung von m3 eine Reduktion der Becherzellenzahl induzieren konnten. Anschließend könnte die Testung der Hypothese im CFTR-knock-out-Schweine-Modell erfolgen, das derzeit als das dem Menschen ähnlichste Tiermodell gilt (MEYERHOLZ *et al.*,

DISKUSSION

2010; ROGERS *et al.*, 2008 a; ROGERS *et al.*, 2008 b), um letztendlich deren Wirkung am Menschen zusätzlich in einem zweiten Modell einschätzen zu können.

7 Zusammenfassung

Die Mukoviszidose als die häufigste letale angeborene Lungenerkrankung des Menschen wird durch Mutationen im *CFTR*-Gen hervorgerufen. Dadurch kommt es zu einer verminderten Chloridsekretion, einer erhöhten Natrium- und Wasserabsorption, einer Verminderung des Flüssigkeitsfilms auf der Atemwegsoberfläche, einer Dehydratation des Schleims in den Atemwegen, einer gestörten mukoziliären Reinigung mit einer Verlegung der Atemwege durch Schleim und einer starken Vermehrung von schleimproduzierenden Becherzellen. Für die Erforschung der Lungenpathologie ist ein transgenes Mausmodell am besten geeignet, bei dem der epitheliale Natriumkanal (ENaC) überexprimiert wird. Dieses Modell ist durch die Ausprägung des Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyps gekennzeichnet. Der Phänotyp der Erkrankung wird nach heutigem Verständnis durch Modulatorgene beeinflusst, zu denen auch die Mitglieder der CLCA-Familie (Calcium-aktivierter Chloridkanal Regulator, engl. *calcium-activated chloride channel regulator*) gehören könnten. Um den Einfluss des Modulatorgens *mCLCA3* bei der Maus auf den Lungenphänotyp der Mukoviszidose zu untersuchen, wurde ein neues, doppelt transgenes Mausmodell generiert, das sich durch die fehlende Expression von *mCLCA3* (*mCLCA3*-knock-out, hier kurz: „m3-ko“) und die Überexpression von *ENaC* (*ENaC*-transgen, hier kurz: „*ENaC*-tg“) auszeichnet. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere zeigen den Mukoviszidose-typischen Lungenphänotyp. Es wurden vier Genotypen in zwei Altersgruppen (juvenil / 14 Tage alt, adult / 9 Wochen alt) vergleichend pathomorphologisch, -morphometrisch und molekularbiologisch charakterisiert. Dabei wurde der Genotyp *ENaC*-tg/m3-ko als zentraler Genotyp untersucht, während die Genotypen *ENaC*-tg/m3-wt, *ENaC*-wt/m3-ko, *ENaC*-wt/m3-wt als Vergleichs- bzw. als Kontrollgruppen dienten. Der *ENaC*-Status war dabei für den wesentlichen Phänotyp verantwortlich, während der *mCLCA3*-Status nur punktuell einen Einfluss als Modulator auszuüben schien.

Das phänotypische Bild der adulten Tiere des Genotyps *ENaC*-tg/m3-ko wurde dabei im Vergleich zu den Tieren des Genotyps *ENaC*-tg/m3-wt durch eine signifikant geringere Schleimmenge (engl. *mucus volume density*) und eine abgeschwächte Becherzellhyperplasie im gesamten Respirationstrakt bei vergleichbarer Epithelzellhypertrophie und Entzündungsreaktion durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten gekennzeichnet.

Der *mCLCA3*-knock-out schien daher im adulten Mausmodell einen gewissen phänotypischen Rescue-Effekt zu verursachen, der sich sowohl auf die Schleimmenge als auch

ZUSAMMENFASSUNG

sekundär auf die Becherzellhyperplasie in Form einer Milderung der pulmonalen Veränderungen auszuwirken schien.

In der juvenilen Altersgruppe zeigten sich bei den ENaC-tg/m3-ko Tieren im Vergleich zu den Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt vor allem die intraluminalen Mukusakkumulationen in der Trachea, die Becherzellhyperplasie im gesamten Respirationstrakt mit Ausnahme der Tracheamitte, die Epithelzellhypertrophie in der Trachea und den großen Bronchien sowie Typ und Stärke der Entzündungsreaktion in einem ähnlichen Schweregrad. Eine signifikant stärkere Ausprägung der Becherzellhyperplasie fand sich hingegen bei den ENaC-tg/m3-ko Tieren lediglich in der Mitte der Trachea sowie eine signifikant größere Epithelzellhypertrophie ausschließlich in den mittelgroßen Bronchien. Zusammenfassend kann für die juvenilen Tiere des Genotyps ENaC-tg/m3-ko gesagt werden, dass sie sich phänotypisch tendenziell vergleichbar mit den juvenilen Tieren des Genotyps ENaC-tg/m3-wt darstellten, wobei sich die Epithelzellhypertrophie in den mittelgroßen und kleinen Bronchien, sowie die Becherzellhyperplasie in der Mitte der Trachea signifikant verstärkt fanden.

Scheinbar moduliert der mCLCA3-Status den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose im juvenilen Mausmodell im Gegensatz zum adulten Modell nicht, wobei die juvenilen Tiere gegenüber den adulten Tieren einen schwerwiegenderen Phänotyp aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der m3-knock-out bei adulten Mäusen im Mukoviszidose-Modell zu einer Verbesserung des Lungenphänotyps zu führen scheint und stützen somit die Hypothese, wonach m3 ein Modulator der Mukoviszidose sein könnte. Eine Unterdrückung von m3 in den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten könnte möglicherweise eine neue therapeutische Strategie darstellen, wobei die Rolle der altersbedingt unterschiedlichen Ausprägung dieses Effekts näher untersucht werden sollten.

8 Summary

Does mCLCA3 modify the pulmonary phenotype of Cystic Fibrosis?

Pathomorphological, pathomorphometrical and molecularbiological analyses of a new double transgenic murine model of Cystic Fibrosis

Kathleen Lange

Cystic Fibrosis is the most common lethal congenital pulmonary disease in humans. It is caused by mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* gene (*CFTR*) and leads to reduced secretion of chloride, increased absorption of sodium and water, reduction of airway surface liquid, dehydration of airway mucus, reduced pulmonary clearance, mucous airway obstruction and hyperplasia of airway goblet cells. A transgenic model in which mice overexpress the epithelial sodium channel (ENaC) appears suitable for investigating the lung pathology because it resembles the typical pulmonary phenotype of human cystic fibrosis. The phenotype of the disease is thought to be influenced by modifier genes including members of the CLCA family. To investigate the effect of the prospect modifier gene *mCLCA3* on the pulmonary phenotype, a new murine model was developed here. This new mouse model comprises mCLCA3-deficiency (mCLCA3-knock-out, here short: "m3-ko") and ENaC-overexpression (here short: "ENaC-tg"). These mice show the typical pulmonary phenotype of human cystic fibrosis. In this study, pathomorphological and pathomorphometrical changes as well as selected aspects of the molecular biology of these mice were characterized using four genotypes in juvenile and adult individuals in each genotype. The pivotal genotype is ENaC-tg/m3-ko whereas ENaC-tg/m3-wt, ENaC-wt/m3-ko and ENaC-wt/m3-wt function as comparative groups.

The major pulmonary phenotype was determined by the ENaC-overexpression whereas the deficient mCLCA3 expression modified the phenotype only selectively.

Adult ENaC-tg/m3-ko mice were characterized by reduced hyperplasia of airway goblet cells and significantly decreased mucus volume density in the whole respiratory tract in comparison to adult ENaC-tg/m3-wt mice.

Thus deficiency of mCLCA3 seemed to cause a phenotypical rescue effect affecting mucus volume density and hyperplasia of airway goblet cells and thus attenuated the pulmonary modifications in adult ENaC-tg mice.

SUMMARY

Juvenile ENaC-tg/m3-ko mice showed a similar severity of mucous obstruction in the trachea, hyperplasia of goblet cells in the whole respiratory tract except the middle trachea, hypertrophy of epithelial cells in the trachea and large airways as well as the inflammatory response in comparison to the genotype ENaC-tg/m3-wt. Only in the middle trachea there was a significantly increased hyperplasia of goblet cells and in the medium airways there was a higher hypertrophy of epithelial cells in juvenile ENaC-tg/m3-ko mice compared with ENaC-tg/m3-wt mice. Taken together the juvenile ENaC-tg/m3-ko mice showed a similar severity of the pulmonary phenotype compared with juvenile ENaC-tg/m3-wt mice.

Although juvenile ENaC-tg/m3-ko mice showed a more severe phenotype than adult mice of the same genotype there was no obvious rescue effect induced by the mCLCA3-deficiency in young mice.

The results of this study show that the mCLCA3-knock-out seems to lead to an improvement of the pulmonary phenotype in adult cystic fibrosis mice and thus support the hypothesis that mCLCA3 could be a modifier of cystic fibrosis. Inhibition of mCLCA3 in the airways of cystic fibrosis patients could possibly represent a new therapeutic strategy. The role of age differences in this effect needs to be determined.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Regulation der Volumenhomöostase des ASL durch ATP, modifiziert nach Boucher, 2007	14
Abb. 2: Kaskade der Pathophysiologie der Mukoviszidose, modifiziert nach Ratjen, 2009	15
Abb. 3: Darstellung der Zuchtstrategie der doppelt transgenen Maus und Aufspaltung der Genotypen in der F1-Generation	35
Abb. 4: mCLCA3-Genkarte mit dargestellter Lage der Primer der „gob-5-PCR“	40
Abb. 5: mCLCA3-Genkarte mit dargestellter Lage der Primer der „mCLCA3-PCR“	40
Abb. 6: PCR-Bild „ENaC“	46
Abb. 7: Repräsentative Darstellung der „gob-5“-PCR	46
Abb. 8: Repräsentative Darstellung der „mCLCA3“-PCR	47
Abb. 9: Schematische Darstellung der makroskopischen Schnittführung (Blockpfeile)	48
Abb. 10: Darstellung der Arbeitsschritte bei der Bestimmung der Mucus volume density	53
Abb. 11: Körpergewichte der juvenilen Tiere	70
Abb. 12: Körpergewichte der adulten Tiere	71
Abb. 13: Mukusakkumulationen der juvenilen und adulten Tiere	76
Abb. 14: Typische Mukusakkumulationen in den großen Bronchien der adulten Tiere	77
Abb. 15: Mucus volume density der juvenilen und adulten Tiere	81
Abb. 16: Repräsentative Darstellung der Becherzellen in den Atemwegen der adulten Tiere, PAS-Reaktion, Balken = 20 µm	82
Abb. 17: Becherzellzahlen der juvenilen und adulten Tiere	87
Abb. 18: Repräsentative Darstellungen der Epithelhöhen in den Atemwegen der adulten Tiere, PAS-Reaktion, Balken= 20 µm;	89
Abb. 19: Epithelhöhen der juvenilen und adulten Tiere	93
Abb. 20: Entzündungszellen in den Atemwegen der juvenilen und adulten Tiere	97
Abb. 21: Muc4 ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.	99
Abb. 22: Muc5ac ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.	100
Abb. 23: Muc5b ist in keinem Mausmodell differentiell reguliert.	101
Abb. 24: mCLCA3 ist in adulten ENaC-tg/m3-wt Tieren im Vergleich zu den reinen wt-Tieren statistisch signifikant überexprimiert. Die fehlende mCLCA3-Expression bei Tieren mit m3-ko-Genotyp bestätigt den knock out-Status.	102
Abb. 25: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-tg/m3-ko	176
Abb. 26: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-tg/m3-wt	177

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 27: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-wt/m3-ko	178
Abb. 28: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-wt/m3-wt	179
Abb. 29: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-tg/m3-ko	180
Abb. 30: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-tg/m3-wt	181
Abb. 31: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-wt/m3-ko.....	182
Abb. 32: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-wt/m3-wt.....	183

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Ausprägung Mukoviszidose typischer Symptome nach (MALL et al., 2008)	26
Tabelle 2: Programm der Entwässerung und Paraffineinbettung im Tissue-Tek® VIP	36
Tabelle 3: DNA-Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer, Genotypisierung.....	41
Tabelle 4: PCR-Mix „ENaC“	41
Tabelle 5: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „ENaC“	42
Tabelle 6: PCR-Mix „Gob-5“	42
Tabelle 7: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „Gob-5“	43
Tabelle 8: PCR-Mix „mCLCA3“	43
Tabelle 9: Zeit-Temperatur-Programm, PCR „mCLCA3“	44
Tabelle 10: Länge der erwarteten PCR-Produkte, Genotypisierung	45
Tabelle 11: Protokoll des Entparaffinierens	49
Tabelle 12: Färbeprotokoll Hämalaun-Eosin	49
Tabelle 13: Färbeprotokoll Perjodsäure-Schiff-Reaktion	50
Tabelle 14: Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe	51
Tabelle 15: Färbeprotokoll Alcianblau-PAS-Färbung.....	51
Tabelle 16: Einteilung der Bronchien an Hand der Durchmesser ihrer Innenlumen	52
Tabelle 17: Score-System der intraluminalen Mukusakkumulationen in der Trachea.....	52
Tabelle 18: Score-System der intraluminalen Mukusakkumulationen in der Lunge, nach Livraghi et al. 2009.....	53
Tabelle 19: Score-System der Entzündungszellen in den Atemwegen	55
Tabelle 20: Mastermix „iScript“, reverse Transkription	57
Tabelle 21: Temperatur-Zeit-Protokoll der Reversen Transkription (cDNA-Synthese).....	58
Tabelle 22: Sequenzen der Primer und Sonden für die qPCR und deren Amplikongröße	61
Tabelle 23: PCR-Mix „Primer-Test“ für konventionelle PCR.....	62
Tabelle 24: Zeit-Temperatur-Programm „Primer-Test“ für konventionelle PCR.....	62
Tabelle 25: PCR-Mix „Primer-Test mit SYBR green I“	63
Tabelle 26: Temperatur-Zeit-Protokoll „Primer-Test mit SYBR green I“	63
Tabelle 27: PCR-Mix „qPCR“	65
Tabelle 28: Temperatur-Zeit-Protokoll „qPCR“	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 29: fragmentation buffer, febit	67
Tabelle 30: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene, sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-ko vs. adult ENaC-tg/m3-wt.....	104
Tabelle 31: Darstellung der 24 am stärksten regulierten Gene inklusive ENaC sowie zusätzlich mCLCA3, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-ko vs. adult ENaC-wt/m3-ko	105
Tabelle 32: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-tg/m3-wt vs. adult ENaC-wt/m3-wt	106
Tabelle 33: Darstellung der 23 am stärksten regulierten Gene sowie zusätzlich mCLCA3 und ENaC, Vergleichsgruppe adult ENaC-wt/m3-ko vs. adult ENaC-wt/m3-wt.....	107
Tabelle 34: Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	112
Tabelle 35: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Mucus volume density in nl/mm ² mit Daten der Literatur.....	121
Tabelle 36: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran mit Daten der Literatur	122
Tabelle 37: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der Epithelhöhen in µm mit Daten der Literatur.....	124
Tabelle 38: Deskriptive Statistik der Körpergewichte der juvenilen Mäuse	168
Tabelle 39: Deskriptive Statistik der Körpergewichte der adulten Mäuse	168
Tabelle 40: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, juvenile Tiere, große Bronchien.....	168
Tabelle 41: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, adulte Tiere, große Bronchien	169
Tabelle 42: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, juvenile Tiere, mittelgroße Bronchien ...	169
Tabelle 43: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, adulte Tiere, mittelgroße Bronchien	169
Tabelle 44: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in dem kranialen Abschnitt der Trachea (T1).....	170
Tabelle 45: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in der Mitte der Trachea (T2).....	170
Tabelle 46: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in dem kaudalen Abschnitt der Trachea (T3).....	171
Tabelle 47: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den großen Bronchien (L1).....	171
Tabelle 48: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den mittelgroßen Bronchien (L2)	172

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 49: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den kleinen Bronchien (L3).....	172
Tabelle 50: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in dem kranialen Abschnitt der Trachea (T1)	173
Tabelle 51: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in der Mitte der Trachea (T2).....	173
Tabelle 52: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in dem kaudalen Abschnitt der Trachea (T3)	174
Tabelle 53: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in den großen Bronchien (L1).....	174
Tabelle 54: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in den mittelgroßen Bronchien (L2).....	175
Tabelle 55: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in in den kleinen Bronchien (L3).....	175
Tabelle 56: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; gesamter Respirationstrakt ..	192
Tabelle 57: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen T1 u. T2.....	193
Tabelle 58: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen T3 u. L1	194
Tabelle 59: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen L2 u. L3	195
Tabelle 60: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; gesamter Respirationstrakt.....	196
Tabelle 61: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen T1 u. T2	197
Tabelle 62: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen T3 u. L1	198
Tabelle 63: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen L2 u. L3.....	199
Tabelle 64: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, gesamter Respirationstrakt	200
Tabelle 65: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen T1 u. T2	201
Tabelle 66: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen T3 u. L1	202
Tabelle 67: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen L2 u. L3	203
Tabelle 68: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, gesamter Respirationstrakt.....	204
Tabelle 69: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen T1 u. T2	205
Tabelle 70: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen T3 u. L1.....	206
Tabelle 71: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen L2 u. L3.....	207
Tabelle 72: Mann-Whitney-Test, Körpergewicht der juvenilen Tiere	208
Tabelle 73: Mann-Whitney-Test, Körpergewicht der adulten Tiere	209

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 74: Belegungscode der Microarray-Analyse.....	210
---	-----

11 **Literaturverzeichnis**

ABDEL-GHANY, CHENG, ELBLE, LIN, *et al.* (2003).

The Interacting Binding Domains of the Beta(4) Integrin and Calcium-Activated Chloride Channels (Clcas) in Metastasis.

J Biol Chem, 278, (49), S. 49406-49416

ABMAN, OGLE, BUTLER-SIMON, RUMACK, *et al.* (1988).

Role of Respiratory Syncytial Virus in Early Hospitalizations for Respiratory Distress of Young Infants with Cystic Fibrosis.

J Pediatr, 113, (5), S. 826-830

AGNEL, VERMAT,CULOUSCOU (1999).

Identification of Three Novel Members of the Calcium-Dependent Chloride Channel (Cacc) Family Predominantly Expressed in the Digestive Tract and Trachea.

FEBS Lett, 455, (3), S. 295-301

AWAD, EL-GAMEL, HASLETON, TURNER, *et al.* (1998).

Genotypic Variation in the Transforming Growth Factor-Beta1 Gene: Association with Transforming Growth Factor-Beta1 Production, Fibrotic Lung Disease, and Graft Fibrosis after Lung Transplantation.

Transplantation, 66, (8), S. 1014-1020

BALTIMORE, CHRISTIE,SMITH (1989).

Immunohistopathologic Localization of Pseudomonas Aeruginosa in Lungs from Patients with Cystic Fibrosis. Implications for the Pathogenesis of Progressive Lung Deterioration.

Am Rev Respir Dis, 140, (6), S. 1650-1661

BARANOV, IVASCHENKO, BAKAY, ASEEV, *et al.* (1996).

Proportion of the Gstm1 0/0 Genotype in Some Slavic Populations and Its Correlation with Cystic Fibrosis and Some Multifactorial Diseases.

Hum Genet, 97, (4), S. 516-520

BARRO-SORIA, SCHREIBER,KUNZELMANN (2008).

Bestrophin 1 and 2 Are Components of the Ca(2+) Activated Cl(-) Conductance in Mouse Airways.

Biochim Biophys Acta, 1783, (10), S. 1993-2000

LITERATURVERZEICHNIS

BASBAUM, LI, GENSCHE, GALLUP, *et al.* (2002).

Mechanisms by Which Gram-Positive Bacteria and Tobacco Smoke Stimulate Mucin Induction through the Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr).

Novartis Found Symp, 248, S. 171-176; discussion 176-180, 277-182

BECKER, SAUER, MUHLEBACH, HIRSH, *et al.* (2004).

Cytokine Secretion by Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells.

Am J Respir Crit Care Med, 169, (5), S. 645-653

BIJVELDS (2003).

Both Defective Lipolysis and Impaired Fatty Acid Uptake Contribute to Fat Malabsorption in Cystic Fibrosis Mice.

Pediatr Pulmonol Suppl, 25, S. 340

BORTHWICK, WEST, KEIGHREN, FLOCKHART, *et al.* (1999).

Murine Submucosal Glands Are Clonally Derived and Show a Cystic Fibrosis Gene-Dependent Distribution Pattern.

Am J Respir Cell Mol Biol, 20, (6), S. 1181-1189

BOTHE, BRAUN, MUNDHENK, GRUBER (2008).

Murine Mclca6 Is an Integral Apical Membrane Protein of Non-Goblet Cell Enterocytes and Co-Localizes with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

J Histochem Cytochem, 56, (5), S. 495-509

BOTHE, MUNDHENK, BECK, KAUP, *et al.* (2012).

Impaired Autoproteolytic Cleavage of Mclca6, a Murine Integral Membrane Protein Expressed in Enterocytes, Leads to Cleavage at the Plasma Membrane Instead of the Endoplasmic Reticulum.

Mol Cells, 33, (3), S. 251-257

BOUCHER (2007).

Cystic Fibrosis: A Disease of Vulnerability to Airway Surface Dehydration.

Trends Mol Med, 13, (6), S. 231-240

LITERATURVERZEICHNIS

BOUCHER, STUTTS, KNOWLES, CANTLEY, *et al.* (1986).

Na⁺ Transport in Cystic Fibrosis Respiratory Epithelia. Abnormal Basal Rate and Response to Adenylate Cyclase Activation.

J Clin Invest, 78, (5), S. 1245-1252

BOUWMAN, ROEP, ROOS (2006).

Mannose-Binding Lectin: Clinical Implications for Infection, Transplantation, and Autoimmunity.

Hum Immunol, 67, (4-5), S. 247-256

BRAUN, MUNDHENK, RANGE, GRUBER (2010).

Quantitative Expression Analyses of Candidates for Alternative Anion Conductance in Cystic Fibrosis Mouse Models.

J Cyst Fibros, 9, (5), S. 351-364

BRIDGES, NEWTON, PILEWSKI, DEVOR, *et al.* (2001).

Na⁺ Transport in Normal and Cf Human Bronchial Epithelial Cells Is Inhibited by Bay 39-9437.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 281, (1), S. L16-23

BROUILLARD, BENSALÉM, HINZPETER, TONDELIER, *et al.* (2005).

Blue Native/Sds-Page Analysis Reveals Reduced Expression of the Mclca3 Protein in Cystic Fibrosis Knock-out Mice.

Mol Cell Proteomics, 4, (11), S. 1762-1775

BUTTON, PICHER, BOUCHER (2007).

Differential Effects of Cyclic and Constant Stress on Atp Release and Mucociliary Transport by Human Airway Epithelia.

J Physiol, 580, (Pt. 2), S. 577-592

CALDWELL, BOUCHER, STUTTS (2004).

Serine Protease Activation of near-Silent Epithelial Na⁺ Channels.

Am J Physiol Cell Physiol, 286, (1), S. C190-194

LITERATURVERZEICHNIS

CARLSSON, SJOHOLM, ERIKSSON, THIEL, *et al.* (2005).

Deficiency of the Mannan-Binding Lectin Pathway of Complement and Poor Outcome in Cystic Fibrosis: Bacterial Colonization May Be Decisive for a Relationship.

Clin Exp Immunol, 139, (2), S. 306-313

CASTALDO, FUCCIO, SALVATORE, RAI, *et al.* (2001).

Liver Expression in Cystic Fibrosis Could Be Modulated by Genetic Factors Different from the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Genotype.

Am J Med Genet, 98, (4), S. 294-297

CASTRO-GINER, KOGEVINAS, MACHLER, DE CID, *et al.* (2008).

Tnfa -308g>a in Two International Population-Based Cohorts and Risk of Asthma.

Eur Respir J, 32, (2), S. 350-361

CELEDON, LANGE, RABY, LITONJUA, *et al.* (2004).

The Transforming Growth Factor-Beta1 (Tgfb1) Gene Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).

Hum Mol Genet, 13, (15), S. 1649-1656

CHEN, KONO, GOLENBOCK, REED, *et al.* (2007).

Identification of a Key Pathway Required for the Sterile Inflammatory Response Triggered by Dying Cells.

Nat Med, 13, (7), S. 851-856

CHENG, GREGORY, MARSHALL, PAUL, *et al.* (1990).

Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis.

Cell, 63, (4), S. 827-834

CHURCH, WRIGHT (2005).

Proteases and Emphysema.

Curr Opin Pulm Med, 11, (2), S. 153-159

CLARKE, GRUBB, YANKASKAS, COTTON, *et al.* (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), S. 479-483

LITERATURVERZEICHNIS

COLLACO,CUTTING (2008).

Update on Gene Modifiers in Cystic Fibrosis.

Curr Opin Pulm Med, 14, (6), S. 559-566

COLLACO, VANSCOY, BREMER, MCDUGAL, *et al.* (2008).

Interactions between Secondhand Smoke and Genes That Affect Cystic Fibrosis Lung Disease.

Jama, 299, (4), S. 417-424

COLLEDGE, ABELLA, SOUTHERN, RATCLIFF, *et al.* (1995).

Generation and Characterization of a Delta F508 Cystic Fibrosis Mouse Model.

Nat Genet, 10, (4), S. 445-452

COLLINS (1992).

Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications.

Science, 256, (5058), S. 774-779

COSTERTON, STEWART, GREENBERG (1999).

Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.

Science, 284, (5418), S. 1318-1322

COWLEY, WANG, GOSSELIN, RADZIOCH, *et al.* (1997).

Mucociliary Clearance in Cystic Fibrosis Knockout Mice Infected with *Pseudomonas Aeruginosa*.

Eur Respir J, 10, (10), S. 2312-2318

CRESSMAN, HICKS, FUNKHOUSER, BACKLUND, *et al.* (1998).

The Relationship of Chronic Mucin Secretion to Airway Disease in Normal and C_{tr}-Deficient Mice.

Am J Respir Cell Mol Biol, 19, (6), S. 853-866

CURRAN, COHN Advances in Mucous Cell Metaplasia: A Plug for Mucus as a Therapeutic Focus in Chronic Airway Disease.

Am J Respir Cell Mol Biol, 42, (3), S. 268-275

LITERATURVERZEICHNIS

DAVIDSON, DORIN (2001).

The Cf Mouse: An Important Tool for Studying Cystic Fibrosis.

Expert Rev Mol Med, S. 1-27

DAVIES, PARSEK, PEARSON, IGLEWSKI, *et al.* (1998).

The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm.

Science, 280, (5361), S. 295-298

DAVIS (2006).

Cystic Fibrosis since 1938.

Am J Respir Crit Care Med, 173, (5), S. 475-482

DE LISLE (1995).

Increased Expression of Sulfated Gp300 and Acinar Tissue Pathology in Pancreas of Cftr(-/-) Mice.

Am J Physiol, 268, (4 Pt 1), S. G717-723

DELANEY, ALTON, SMITH, LUNN, *et al.* (1996).

Cystic Fibrosis Mice Carrying the Missense Mutation G551d Replicate Human Genotype-Phenotype Correlations.

Embo J, 15, (5), S. 955-963

DEVOR, PILEWSKI (1999).

Utp Inhibits Na⁺ Absorption in Wild-Type and Deltaf508 Cftr-Expressing Human Bronchial Epithelia.

Am J Physiol, 276, (4 Pt 1), S. C827-837

DICKINSON, SMITH, WEBB, KILANOWSKI, *et al.* (2002).

The Severe G480c Cystic Fibrosis Mutation, When Replicated in the Mouse, Demonstrates Mistrafficking, Normal Survival and Organ-Specific Bioelectrics.

Hum Mol Genet, 11, (3), S. 243-251

DONALDSON, BENNETT, ZEMAN, KNOWLES, *et al.* (2006).

Mucus Clearance and Lung Function in Cystic Fibrosis with Hypertonic Saline.

N Engl J Med, 354, (3), S. 241-250

LITERATURVERZEICHNIS

- DONALDSON,BOUCHER (2007).
Sodium Channels and Cystic Fibrosis.
Chest, 132, (5), S. 1631-1636
- DORIN, DICKINSON, EMSLIE, CLARKE, *et al.* (1992).
Successful Targeting of the Mouse Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene in Embryonal Stem Cells.
Transgenic Res, 1, (2), S. 101-105
- DORING, KROGH-JOHANSEN, WEIDINGER,HOIBY (1994).
Allotypes of Alpha 1-Antitrypsin in Patients with Cystic Fibrosis, Homozygous and Heterozygous for Deltaf508.
Pediatr Pulmonol, 18, (1), S. 3-7
- DRUMM, KONSTAN, SCHLUCHTER, HANDLER, *et al.* (2005).
Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis.
N Engl J Med, 353, (14), S. 1443-1453
- EISEN,MINCHINTON (2003).
Impact of Mannose-Binding Lectin on Susceptibility to Infectious Diseases.
Clin Infect Dis, 37, (11), S. 1496-1505
- ELBLE,PAULI (2001).
Tumor Suppression by a Proapoptotic Calcium-Activated Chloride Channel in Mammary Epithelium.
J Biol Chem, 276, (44), S. 40510-40517
- ELBLE, WALIA, CHENG, CONNON, *et al.* (2006).
The Putative Chloride Channel Hclca2 Has a Single C-Terminal Transmembrane Segment.
J Biol Chem, 281, (40), S. 29448-29454
- ELKINS, ROBINSON, ROSE, HARBOUR, *et al.* (2006).
A Controlled Trial of Long-Term Inhaled Hypertonic Saline in Patients with Cystic Fibrosis.
N Engl J Med, 354, (3), S. 229-240

LITERATURVERZEICHNIS

EVANS, THORESON, BECK (2004).

Molecular and Functional Analyses of Two New Calcium-Activated Chloride Channel Family Members from Mouse Eye and Intestine.

J Biol Chem, 279, (40), S. 41792-41800

FIRSOV, GAUTSCHI, MERILLAT, ROSSIER, *et al.* (1998).

The Heterotetrameric Architecture of the Epithelial Sodium Channel (Enac).

Embo J, 17, (2), S. 344-352

FLAMANT, HENRION-CAUDE, BOELLE, BREMONT, *et al.* (2004).

Glutathione-S-Transferase M1, M3, P1 and T1 Polymorphisms and Severity of Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis.

Pharmacogenetics, 14, (5), S. 295-301

FREEDMAN, KATZ, PARKER, LAPOSATA, *et al.* (1999).

A Membrane Lipid Imbalance Plays a Role in the Phenotypic Expression of Cystic Fibrosis in Cftr(-/-) Mice.

Proc Natl Acad Sci U S A, 96, (24), S. 13995-14000

FRENCH, VAN DOORNINCK, PETERS, VERBEEK, *et al.* (1996).

A Delta F508 Mutation in Mouse Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Results in a Temperature-Sensitive Processing Defect in Vivo.

J Clin Invest, 98, (6), S. 1304-1312

GARRED, PRESSLER, MADSEN, FREDERIKSEN, *et al.* (1999).

Association of Mannose-Binding Lectin Gene Heterogeneity with Severity of Lung Disease and Survival in Cystic Fibrosis.

J Clin Invest, 104, (4), S. 431-437

GEDDES, SHINER (1989).

Cystic Fibrosis--from Lung Damage to Symptoms.

Acta Paediatr Scand Suppl, 363, S. 52-56; discussion 56-57

GIBSON, LEWIS, AFFLECK, AITKEN, *et al.* (2005).

Hclca1 and Mclca3 Are Secreted Non-Integral Membrane Proteins and Therefore Are Not Ion Channels.

J Biol Chem, 280, (29), S. 27205-27212

LITERATURVERZEICHNIS

- GILLJAM, MOLTYANER, DOWNEY, DEVLIN, *et al.* (2004).
Airway Inflammation and Infection in Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens.
Am J Respir Crit Care Med, 169, (2), S. 174-179
- GOSS, EDWARDS, RAMSEY, AITKEN, *et al.* (2009).
Patient-Reported Respiratory Symptoms in Cystic Fibrosis.
J Cyst Fibros, 8, (4), S. 245-252
- GOSS, NEWSOM, SCHILDCROUT, SHEPPARD, *et al.* (2004).
Effect of Ambient Air Pollution on Pulmonary Exacerbations and Lung Function in Cystic Fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med, 169, (7), S. 816-821
- GOVAN, NELSON (1992).
Microbiology of Lung Infection in Cystic Fibrosis.
Br Med Bull, 48, (4), S. 912-930
- GRAY, WINPENNY, PORTEOUS, DORIN, *et al.* (1994).
Cftr and Calcium-Activated Chloride Currents in Pancreatic Duct Cells of a Transgenic Cf Mouse.
Am J Physiol, 266, (1 Pt 1), S. C213-221
- GRAY, WINPENNY, VERDON, MCALROY, *et al.* (1995).
Chloride Channels and Cystic Fibrosis of the Pancreas.
Biosci Rep, 15, (6), S. 531-541
- GREALLY, HUSSEIN, COOK, SAMPSON, *et al.* (1993).
Sputum Tumour Necrosis Factor-Alpha and Leukotriene Concentrations in Cystic Fibrosis.
Arch Dis Child, 68, (3), S. 389-392
- GREENWOOD, MILLER, OHYA, HOROWITZ (2002).
The Large Conductance Potassium Channel Beta-Subunit Can Interact with and Modulate the Functional Properties of a Calcium-Activated Chloride Channel, Clca1.
J Biol Chem, 277, (25), S. 22119-22122

LITERATURVERZEICHNIS

GRUBB,BOUCHER (1999).

Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for Cystic Fibrosis.

Physiol Rev, 79, (1 Suppl), S. S193-214

GRUBER, ELBLE, JI, SCHREUR, *et al.* (1998a).

Genomic Cloning, Molecular Characterization, and Functional Analysis of Human Clca1, the First Human Member of the Family of Ca²⁺-Activated Cl⁻ Channel Proteins.

Genomics, 54, (2), S. 200-214

GRUBER, FULLER, ELBLE, BENOS, *et al.* (2000).

The Clca Gene Family: A Novel Family of Putative Chloride Channels. .

Current Genomics, 1:201-222,

GRUBER, GANDHI,PAULI (1998b).

The Murine Calcium-Sensitive Chloride Channel (Mcacc) Is Widely Expressed in Secretory Epithelia and in Other Select Tissues.

Histochem Cell Biol, 110, (1), S. 43-49

GUGGINO,STANTON (2006).

New Insights into Cystic Fibrosis: Molecular Switches That Regulate Cftr.

Nat Rev Mol Cell Biol, 7, (6), S. 426-436

HAMANN, GIBSON, DAVIES, JOWETT, *et al.* (2009).

Human Clca1 Modulates Anionic Conduction of Calcium-Dependent Chloride Currents.

J Physiol, 587, (Pt 10), S. 2255-2274

HAMOSH, KING, ROSENSTEIN, COREY, *et al.* (1992).

Cystic Fibrosis Patients Bearing Both the Common Missense Mutation Gly----Asp at Codon 551 and the Delta F508 Mutation Are Clinically Indistinguishable from Delta F508

Homozygotes, except for Decreased Risk of Meconium Ileus.

Am J Hum Genet, 51, (2), S. 245-250

HASTY, O'NEAL, LIU, MORRIS, *et al.* (1995).

Severe Phenotype in Mice with Termination Mutation in Exon 2 of Cystic Fibrosis Gene.

Somat Cell Mol Genet, 21, (3), S. 177-187

LITERATURVERZEICHNIS

HEWSON, HAAS, BARTLETT, MESSAGE, *et al.* (2010).

Rhinovirus Induces Muc5ac in a Human Infection Model and in Vitro Via Nf-Kappab and Egfr Pathways.

Eur Respir J, 36, (6), S. 1425-1435

HIRSH, ZHANG, ZAMURS, FLEEGLE, *et al.* (2008).

Pharmacological Properties of N-(3,5-Diamino-6-Chloropyrazine-2-Carbonyl)-N'-4-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy) Phenyl]Butyl-Guanidine Methanesulfonate (552-02), a Novel Epithelial Sodium Channel Blocker with Potential Clinical Efficacy for Cystic Fibrosis Lung Disease.

J Pharmacol Exp Ther, 325, (1), S. 77-88

HU, PENG, HU,RAN (2007).

Association of Tumor Necrosis Factor Alpha 308 G/a Gene Promoter Polymorphism with the Presence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis.

Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 30, (8), S. 588-594

HULL,THOMSON (1998).

Contribution of Genetic Factors Other Than Cftr to Disease Severity in Cystic Fibrosis.

Thorax, 53, (12), S. 1018-1021

INGLIS,WILSON (2005).

Cystic Fibrosis and Airway Submucosal Glands.

Pediatr Pulmonol, 40, (4), S. 279-284

IWAMURA, KIMURA, SHINODA, ENDO, *et al.* (2007).

Schnurri-2 Regulates Th2-Dependent Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness.

Int Immunol, 19, (6), S. 755-762

JI, SU, KEDAR, LI, *et al.* (2006).

Delta-Subunit Confers Novel Biophysical Features to Alpha Beta Gamma-Human Epithelial Sodium Channel (Enac) Via a Physical Interaction.

J Biol Chem, 281, (12), S. 8233-8241

JOO, IROKAWA, ROBBINS,WINE (2006).

Hyopsecretion, Not Hyperabsorption, Is the Basic Defect of Cystic Fibrosis Airway Glands.

J Biol Chem, 281, (11), S. 7392-7398

LITERATURVERZEICHNIS

KEREM, ROMMENS, BUCHANAN, MARKIEWICZ, *et al.* (1989).

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis.

Science, 245, (4922), S. 1073-1080

KINNMAN, LINDBLAD, HOUSSET, BUENTKE, *et al.* (2000).

Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Liver Tissue from Patients with Cystic Fibrosis.

Hepatology, 32, (2), S. 334-340

KNOWLES,BOUCHER (2002).

Mucus Clearance as a Primary Innate Defense Mechanism for Mammalian Airways.

J Clin Invest, 109, (5), S. 571-577

KNOWLES, GATZY,BOUCHER (1981).

Increased Bioelectric Potential Difference across Respiratory Epithelia in Cystic Fibrosis.

N Engl J Med, 305, (25), S. 1489-1495

KNOWLES, ROBINSON, WOOD, PUE, *et al.* (1997).

Ion Composition of Airway Surface Liquid of Patients with Cystic Fibrosis as Compared with Normal and Disease-Control Subjects.

J Clin Invest, 100, (10), S. 2588-2595

KOCH, CUPPENS, RAINISIO, MADESSANI, *et al.* (2001).

European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (Ercf): Comparison of Major Disease Manifestations between Patients with Different Classes of Mutations.

Pediatr Pulmonol, 31, (1), S. 1-12

KOEHLER, SAJJAN, CHOW, MARTIN, *et al.* (2003).

Protection of Cftr Knockout Mice from Acute Lung Infection by a Helper-Dependent Adenoviral Vector Expressing Cftr in Airway Epithelia.

Proc Natl Acad Sci U S A, 100, (26), S. 15364-15369

KOMIYA, TANIGAWA,HIROHASHI (1999).

Cloning and Identification of the Gene Gob-5, Which Is Expressed in Intestinal Goblet Cells in Mice.

Biochem Biophys Res Commun, 255, (2), S. 347-351

LITERATURVERZEICHNIS

KOO, KIM, JETTEN, BELLONI, *et al.* (2002).

Overexpression of Mucin Genes Induced by Interleukin-1 Beta, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Lipopolysaccharide, and Neutrophil Elastase Is Inhibited by a Retinoic Acid Receptor Alpha Antagonist.

Exp Lung Res, 28, (4), S. 315-332

KOTARU, HEJAL, FINIGAN, CORENO, *et al.* (2003).

Desiccation and Hypertonicity of the Airway Surface Fluid and Thermally Induced Asthma.

J Appl Physiol, 94, (1), S. 227-233

LAZAROWSKI,BOUCHER (2001).

Utp as an Extracellular Signaling Molecule.

News Physiol Sci, 16, S. 1-5

LAZAROWSKI, TARRAN, GRUBB, VAN HEUSDEN, *et al.* (2004).

Nucleotide Release Provides a Mechanism for Airway Surface Liquid Homeostasis.

J Biol Chem, 279, (35), S. 36855-36864

LEDERMANN (2000).

Embryonic Stem Cells and Gene Targeting.

Exp Physiol, 85, (6), S. 603-613

LEVERKOEHNE,GRUBER (2002).

The Murine Mclca3 (Alias Gob-5) Protein Is Located in the Mucin Granule Membranes of Intestinal, Respiratory, and Uterine Goblet Cells.

J Histochem Cytochem, 50, (6), S. 829-838

LI, ROMIEU, WU, SIENRA-MONGE, *et al.* (2007).

Genetic Polymorphisms in Transforming Growth Factor Beta-1 (Tgfb1) and Childhood Asthma and Atopy.

Hum Genet, 121, (5), S. 529-538

LINDEMANN, DOCKTER,TÜMMLER (2004).

Mukoviszidose. Zystische Fibrose.

Stuttgart: Thieme

LITERATURVERZEICHNIS

- LIVRAGHI, GRUBB, HUDSON, WILKINSON, *et al.* (2009).
Airway and Lung Pathology Due to Mucosal Surface Dehydration in β -Epithelial Na⁺ Channel-Overexpressing Mice: Role of Tnf- α and IL-4 α Signaling, Influence of Neonatal Development, and Limited Efficacy of Glucocorticoid Treatment.
J Immunol, 182, (7), S. 4357-4367
- LOEWEN, BEKAR, WALZ, FORSYTH, *et al.* (2004).
Pclca1 Lacks Inherent Chloride Channel Activity in an Epithelial Colon Carcinoma Cell Line.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 287, (1), S. G33-41
- LONG, SYPEK, ASKEW, FISH, *et al.* (2006).
Gob-5 Contributes to Goblet Cell Hyperplasia and Modulates Pulmonary Tissue Inflammation.
Am J Respir Cell Mol Biol, 35, (3), S. 357-365
- LONG, WILLIAMS, CASTILE (2004).
Structural Airway Abnormalities in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis.
J Pediatr, 144, (2), S. 154-161
- MAITRA, KUMAR (2005).
Diseases of Infancy and Childhood
Robbins and Cotran
- MAK, LEUNG, HO, LAW, *et al.* (2006).
Analysis of Tgf-Beta(1) Gene Polymorphisms in Hong Kong Chinese Patients with Asthma.
J Allergy Clin Immunol, 117, (1), S. 92-96
- MALL (2008).
Role of Cilia, Mucus, and Airway Surface Liquid in Mucociliary Dysfunction: Lessons from Mouse Models.
J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 21, (1), S. 13-24
- MALL (2009).
Role of the Amiloride-Sensitive Epithelial Na⁺ Channel in the Pathogenesis and as a Therapeutic Target for Cystic Fibrosis Lung Disease.
Exp Physiol, 94, (2), S. 171-174

LITERATURVERZEICHNIS

MALL, GRUBB, HARKEMA, O'NEAL, *et al.* (2004).

Increased Airway Epithelial Na⁺ Absorption Produces Cystic Fibrosis-Like Lung Disease in Mice.

Nat Med, 10, (5), S. 487-493

MALL, HARKEMA, TROJANEK, TREIS, *et al.* (2008).

Development of Chronic Bronchitis and Emphysema in Beta-Epithelial Na⁺ Channel-Overexpressing Mice.

Am J Respir Crit Care Med, 177, (7), S. 730-742

MALL, WISSNER, GONSKA, CALENBORN, *et al.* (2000).

Inhibition of Amiloride-Sensitive Epithelial Na⁽⁺⁾ Absorption by Extracellular Nucleotides in Human Normal and Cystic Fibrosis Airways.

Am J Respir Cell Mol Biol, 23, (6), S. 755-761

MATSUI, GRUBB, TARRAN, RANDELL, *et al.* (1998).

Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease.

Cell, 95, (7), S. 1005-1015

MATSUI, VERGHESE, KESIMER, SCHWAB, *et al.* (2005).

Reduced Three-Dimensional Motility in Dehydrated Airway Mucus Prevents Neutrophil Capture and Killing Bacteria on Airway Epithelial Surfaces.

J Immunol, 175, (2), S. 1090-1099

MATSUI, WAGNER, HILL, SCHWAB, *et al.* (2006).

A Physical Linkage between Cystic Fibrosis Airway Surface Dehydration and Pseudomonas Aeruginosa Biofilms.

Proc Natl Acad Sci U S A, 103, (48), S. 18131-18136

MATTHEWS, SPECTOR, LEMM, POTTER (1963).

Studies on Pulmonary Secretions. I. The over-All Chemical Composition of Pulmonary Secretions from Patients with Cystic Fibrosis, Bronchiectasis, and Laryngectomy.

Am Rev Respir Dis, 88, S. 199-204

LITERATURVERZEICHNIS

MCCRAY, ZABNER, JIA, WELSH, *et al.* (1999).

Efficient Killing of Inhaled Bacteria in Deltaf508 Mice: Role of Airway Surface Liquid Composition.

Am J Physiol, 277, (1 Pt 1), S. L183-190

MCELROY, PRINCE, WEITKAMP, REESE, *et al.* (2011).

Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Dependent Depletion of Mucus in Immature Small Intestine: A Potential Role in Neonatal Necrotizing Enterocolitis.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 301, (4), S. G656-666

MEARNS (1992).

Cystic Fibrosis: The First 50 Years.

Cystic fibrosis current topics 15, S. 217-250

MEYERHOLZ, STOLTZ, PEZZULO, WELSH (2010).

Pathology of Gastrointestinal Organs in a Porcine Model of Cystic Fibrosis.

Am J Pathol, 176, (3), S. 1377-1389

MIZUTA, OSAWA, MIZUTA, XU, *et al.* (2008).

Functional Expression of Gabab Receptors in Airway Epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol, 39, (3), S. 296-304

MOSKOWITZ, FOSTER, EMERSON, GIBSON, *et al.* (2005).

Use of Pseudomonas Biofilm Susceptibilities to Assign Simulated Antibiotic Regimens for Cystic Fibrosis Airway Infection.

J Antimicrob Chemother, 56, (5), S. 879-886

MRUGACZ, MINAROWSKA (2002).

Eye Symptoms of Cystic Fibrosis.

Klin Oczna, 104, (5-6), S. 418-420

MÜLLER. (2003).

Mukoviszidose- Frühe Diagnose Verlängert Das Leben.

ÄP- Pädiatrie.

LITERATURVERZEICHNIS

MUNDHENK, ALFALAH, ELBLE, PAULI, *et al.* (2006).

Both Cleavage Products of the Mclca3 Protein Are Secreted Soluble Proteins.

J Biol Chem, 281, (40), S. 30072-30080

MUNDHENK, JOHANNESSON, ANAGNOSTOPOULOU, BRAUN, *et al.* (2012).

Mclca3 Does Not Contribute to the Calcium-Activated Chloride Conductance in Mouse Airways.

Am J Respir Cell Mol Biol, 47, (1), S. 87-93

NAKANISHI, MORITA, IWASHITA, SAGIYA, *et al.* (2001).

Role of Gob-5 in Mucus Overproduction and Airway Hyperresponsiveness in Asthma.

Proc Natl Acad Sci U S A, 98, (9), S. 5175-5180

O'NEAL, HASTY, MCCRAY, CASEY, *et al.* (1993).

A Severe Phenotype in Mice with a Duplication of Exon 3 in the Cystic Fibrosis Locus.

Hum Mol Genet, 2, (10), S. 1561-1569

OHWADA, WATANABE, OKUYAMA, OHKAWARA, *et al.* (2007).

The Involvement of Type 1a Angiotensin II Receptors in the Regulation of Airway Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma.

Clin Exp Allergy, 37, (11), S. 1720-1727

OKADA, NICHOLAS, KREDA, LAZAROWSKI, *et al.* (2006).

Physiological Regulation of Atp Release at the Apical Surface of Human Airway Epithelia.

J Biol Chem, 281, (32), S. 22992-23002

OPPENHEIMER (1976).

Pathology of Cystic Fibrosis: Review of the Literature and Comparison with 146 Autopsied Cases.

Perspectives in Paediatric Pathology.

New York: Rosenberg, HS, Bolande RP

PARAD, GERARD, ZURAKOWSKI, NICHOLS, *et al.* (1999).

Pulmonary Outcome in Cystic Fibrosis Is Influenced Primarily by Mucoïd Pseudomonas Aeruginosa Infection and Immune Status and Only Modestly by Genotype.

Infect Immun, 67, (9), S. 4744-4750

LITERATURVERZEICHNIS

PATEL, BRETT, HOLTZMAN (2009).

The Role of Clca Proteins in Inflammatory Airway Disease.

Annu Rev Physiol, 71, S. 425-449

PATEL, MORTON, KIM, ALEVY, *et al.* (2006).

Genetic Segregation of Airway Disease Traits Despite Redundancy of Calcium-Activated Chloride Channel Family Members.

Physiol Genomics, 25, (3), S. 502-513

PAWLOWSKI, LEPISTO, MEINANDER, SIVARS, *et al.* (2006).

Novel Conserved Hydrolase Domain in the Clca Family of Alleged Calcium-Activated Chloride Channels.

Proteins, 63, (3), S. 424-439

PEREZ, ISSLER, COTTON, KELLEY, *et al.* (2007).

Cftr Inhibition Mimics the Cystic Fibrosis Inflammatory Profile.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 292, (2), S. L383-395

PETERS, VAN DOORNINCK, FRENCH, RATCLIFF, *et al.* (1997).

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mediates the Cyclic Adenosine Monophosphate-Induced Fluid Secretion but Not the Inhibition of Resorption in Mouse Gallbladder Epithelium.

Hepatology, 25, (2), S. 270-277

PFORTE (2002).

Copd- Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankungen.

Stuttgart: Thieme Verlag

PICHER, BURCH, BOUCHER (2004).

Metabolism of P2 Receptor Agonists in Human Airways: Implications for Mucociliary Clearance and Cystic Fibrosis.

J Biol Chem, 279, (19), S. 20234-20241

PIER, GROUT, ZAIDI, OLSEN, *et al.* (1996).

Role of Mutant Cftr in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections.

Science, 271, (5245), S. 64-67

LITERATURVERZEICHNIS

PLOG, GROTZSCH, KLYMIUK, KOBALZ, *et al.* (2012).

The Porcine Chloride Channel Calcium-Activated Family Member Pclca4a Mirrors Lung Expression of the Human Hclca4.

J Histochem Cytochem, 60, (1), S. 45-56

PLOG, MUNDHENK, KLYMIUK, GRUBER (2009).

Genomic, Tissue Expression, and Protein Characterization of Pclca1, a Putative Modulator of Cystic Fibrosis in the Pig.

J Histochem Cytochem, 57, (12), S. 1169-1181

PONS, MARCHAND, D'ATHIS, SAUVAGE, *et al.* (2000).

French Multicenter Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial on Nebulized Amiloride in Cystic Fibrosis Patients. The Amiloride-Aflm Collaborative Study Group.

Pediatr Pulmonol, 30, (1), S. 25-31

POTTER, MATTHEWS, SPECTOR, LEMM (1967).

Studies on Pulmonary Secretions. II. Osmolality and the Ionic Environment of Pulmonary Secretions from Patients with Cystic Fibrosis, Bronchiectasis, and Laryngectomy.

Am Rev Respir Dis, 96, (1), S. 83-87

POTTER, SPECTOR, MATTHEWS, LEMM (1969).

Studies on Pulmonary Secretions. 3. The Nucleic Acids in Whole Pulmonary Secretions from Patients with Cystic Fibrosis, Bronchiectasis, and Laryngectomy.

Am Rev Respir Dis, 99, (6), S. 909-916

PROESMANS, VERMEULEN, DE BOECK (2008).

What's New in Cystic Fibrosis? From Treating Symptoms to Correction of the Basic Defect.

Eur J Pediatr, 167, (8), S. 839-849

PULLEYN, NEWTON, ADCOCK, BARNES (2001).

Tgfbeta1 Allele Association with Asthma Severity.

Hum Genet, 109, (6), S. 623-627

RANDELL, BOUCHER (2006).

Effective Mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health.

Am J Respir Cell Mol Biol, 35, (1), S. 20-28

LITERATURVERZEICHNIS

RATCLIFF, EVANS, CUTHBERT, MACVINISH, *et al.* (1993).

Production of a Severe Cystic Fibrosis Mutation in Mice by Gene Targeting.

Nat Genet, 4, (1), S. 35-41

RAVIV, GIASSON, KAMPF, GOHY, *et al.* (2003).

Lubrication by Charged Polymers.

Nature, 425, (6954), S. 163-165

REINHARDT, KRAEMER (2001).

Cystische Fibrose.

Berlin: Springer Verlag

REYNAERT, VAN DER SCHUEREN, DEGEEST, MANIN, *et al.* (2000).

Morphological Changes in the Vas Deferens and Expression of the Cystic Fibrosis

Transmembrane Conductance Regulator (Cftr) in Control, Deltaf508 and Knock-out Cftr Mice During Postnatal Life.

Mol Reprod Dev, 55, (2), S. 125-135

RIBEIRO, PARADISO, SCHWAB, PEREZ-VILAR, *et al.* (2005).

Chronic Airway Infection/Inflammation Induces a Ca²⁺-I-Dependent Hyperinflammatory Response in Human Cystic Fibrosis Airway Epithelia.

J Biol Chem, 280, (18), S. 17798-17806

RIORDAN (2005).

Assembly of Functional Cftr Chloride Channels.

Annu Rev Physiol, 67, S. 701-718

RIORDAN, ROMMENS, KEREM, ALON, *et al.* (1989).

Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA.

Science, 245, (4922), S. 1066-1073

RITZKA, STANKE, JANSEN, GRUBER, *et al.* (2004).

The Clca Gene Locus as a Modulator of the Gastrointestinal Basic Defect in Cystic Fibrosis.

Hum Genet, 115, (6), S. 483-491

LITERATURVERZEICHNIS

ROBICHAUD, TUCK, KARGMAN, TAM, *et al.* (2005).

Gob-5 Is Not Essential for Mucus Overproduction in Preclinical Murine Models of Allergic Asthma.

Am J Respir Cell Mol Biol, 33, (3), S. 303-314

ROCK, O'NEAL, GABRIEL, RANDELL, *et al.* (2009).

Transmembrane Protein 16a (Tmem16a) Is a Ca²⁺-Regulated Cl⁻ Secretory Channel in Mouse Airways.

J Biol Chem, 284, (22), S. 14875-14880

ROGERS, ABRAHAM, BROGDEN, ENGELHARDT, *et al.* (2008 a).

The Porcine Lung as a Potential Model for Cystic Fibrosis.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 295, (2), S. L240-263

ROGERS, STOLTZ, MEYERHOLZ, OSTEDGAARD, *et al.* (2008 b).

Disruption of the Cfr Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs.

Science, 321, (5897), S. 1837-1841

ROSE, VOYNOW (2006).

Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease.

Physiol Rev, 86, (1), S. 245-278

ROWNTREE, HARRIS (2003).

The Phenotypic Consequences of Cfr Mutations.

Ann Hum Genet, 67, (Pt 5), S. 471-485

ROZMAHEL, WILSCHANSKI, MATIN, PLYTE, *et al.* (1996).

Modulation of Disease Severity in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficient Mice by a Secondary Genetic Factor.

Nat Genet, 12, (3), S. 280-287

SCHOLTE, DAVIDSON, WILKE, DE JONGE (2004).

Animal Models of Cystic Fibrosis.

J Cyst Fibros, 3 Suppl 2, S. 183-190

LITERATURVERZEICHNIS

- SMITH, BUCKLEY, WU, SAENPHIMMACHAK, *et al.* (2006).
Genetic Adaptation by *Pseudomonas Aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients.
Proc Natl Acad Sci U S A, 103, (22), S. 8487-8492
- SMITH, TRAVIS, GREENBERG, WELSH (1996).
Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid.
Cell, 85, (2), S. 229-236
- SNOUWAERT, BRIGMAN, LATOUR, MALOUF, *et al.* (1992).
An Animal Model for Cystic Fibrosis Made by Gene Targeting.
Science, 257, (5073), S. 1083-1088
- SONG, SALINAS, NIELSON, VERKMAN (2006).
Hyperacidity of Secreted Fluid from Submucosal Glands in Early Cystic Fibrosis.
Am J Physiol Cell Physiol, 290, (3), S. C741-749
- SRIRAMULU, LUNSDORF, LAM, ROMLING (2005).
Microcolony Formation: A Novel Biofilm Model of *Pseudomonas Aeruginosa* for the Cystic Fibrosis Lung.
J Med Microbiol, 54, (Pt 7), S. 667-676
- STEAGALL, BARROW, GLASGOW, MENDOZA, *et al.* (2007).
Beta-2-Adrenergic Receptor Polymorphisms in Cystic Fibrosis.
Pharmacogenet Genomics, 17, (6), S. 425-430
- STUTTS, CANESSA, OLSEN, HAMRICK, *et al.* (1995).
Cftr as a Camp-Dependent Regulator of Sodium Channels.
Science, 269, (5225), S. 847-850
- STUTTS, ROSSIER, BOUCHER (1997).
Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Inverts Protein Kinase a-Mediated Regulation of Epithelial Sodium Channel Single Channel Kinetics.
J Biol Chem, 272, (22), S. 14037-14040

LITERATURVERZEICHNIS

SU, WEN, FENG, XIAO, *et al.* (2005).

Transforming Growth Factor-Beta1 Gene Polymorphisms Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Chinese Population.

Acta Pharmacol Sin, 26, (6), S. 714-720

TARRAN, BUTTON, PICHER, PARADISO, *et al.* (2005).

Normal and Cystic Fibrosis Airway Surface Liquid Homeostasis. The Effects of Phasic Shear Stress and Viral Infections.

J Biol Chem, 280, (42), S. 35751-35759

TARRAN, GRUBB, GATZY, DAVIS, *et al.* (2001a).

The Relative Roles of Passive Surface Forces and Active Ion Transport in the Modulation of Airway Surface Liquid Volume and Composition.

J Gen Physiol, 118, (2), S. 223-236

TARRAN, GRUBB, PARSONS, PICHER, *et al.* (2001b).

The Cf Salt Controversy: In Vivo Observations and Therapeutic Approaches.

Mol Cell, 8, (1), S. 149-158

TARRAN, TROUT, DONALDSON, BOUCHER (2006).

Soluble Mediators, Not Cilia, Determine Airway Surface Liquid Volume in Normal and Cystic Fibrosis Superficial Airway Epithelia.

J Gen Physiol, 127, (5), S. 591-604

TESFAIGZI (2008).

Regulation of Mucous Cell Metaplasia in Bronchial Asthma.

Curr Mol Med, 8, (5), S. 408-415

TETAERT, PIERRE, DEMEYER, HUSSON, *et al.* (2007).

Dietary N-3 Fatty Acids Have Suppressive Effects on Mucin Upregulation in Mice Infected with *Pseudomonas Aeruginosa*.

Respir Res,

THEVENOD, ROUSSA, BENOS, FULLER (2003).

Relationship between a Hco₃⁻-Permeable Conductance and a Clca Protein from Rat Pancreatic Zymogen Granules.

Biochem Biophys Res Commun, 300, (2), S. 546-554

LITERATURVERZEICHNIS

- TOMASHEFSKI, BRUCE, STERN, DEARBORN, *et al.* (1985).
Pulmonary Air Cysts in Cystic Fibrosis: Relation of Pathologic Features to Radiologic Findings and History of Pneumothorax.
Hum Pathol, 16, (3), S. 253-261
- TREVISIOL, BONIOTTO, GIGLIO, POLI, *et al.* (2005).
Mbl2 Polymorphisms Screening in a Regional Italian Cf Center.
J Cyst Fibros, 4, (3), S. 189-191
- VAN DER DOEF, SLIEKER, STAAB, ALIZADEH, *et al.* Association of the Clca1 P.S357n Variant with Meconium Ileus in European Patients with Cystic Fibrosis.
J Pediatr Gastroenterol Nutr, 50, (3), S. 347-349
- VAN DOORNINCK, FRENCH, VERBEEK, PETERS, *et al.* (1995).
A Mouse Model for the Cystic Fibrosis Delta F508 Mutation.
Embo J, 14, (18), S. 4403-4411
- VAN HEECKEREN, SCARIA, SCHLUCHTER, FERKOL, *et al.* (2004).
Delivery of Cftr by Adenoviral Vector to Cystic Fibrosis Mouse Lung in a Model of Chronic Pseudomonas Aeruginosa Lung Infection.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 286, (4), S. L717-726
- VANDESOMPELE, DE PRETER, PATTYN, POPPE, *et al.* (2002).
Accurate Normalization of Real-Time Quantitative Rt-Pcr Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.
Genome Biol, 3, (7),
- VERKMAN, SONG, THIAGARAJAH (2003).
Role of Airway Surface Liquid and Submucosal Glands in Cystic Fibrosis Lung Disease.
Am J Physiol Cell Physiol, 284, (1), S. C2-15
- WATT, LAZAROWSKI, BOUCHER (1998).
Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator-Independent Release of Atp. Its Implications for the Regulation of P2y2 Receptors in Airway Epithelia.
J Biol Chem, 273, (22), S. 14053-14058

LITERATURVERZEICHNIS

WELSH, SMITH (1993).

Molecular Mechanisms of Cftr Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis.
Cell, 73, (7), S. 1251-1254

WHEELER, BARRETT, BENSON, BRYANT, *et al.* (2008).

Database Resources of the National Center for Biotechnology Information.
Nucleic Acids Res, 36, (Database issue), S. D13-21

WHITEHEAD, WALKER, BERMAN, FOSTER, *et al.* (2003).

Allergen-Induced Airway Disease Is Mouse Strain Dependent.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 285, (1), S. L32-42

WILSCHANSKI, ROZMAHEL, BEHARRY, KENT, *et al.* (1996).

In Vivo Measurements of Ion Transport in Long-Living Cf Mice.
Biochem Biophys Res Commun, 219, (3), S. 753-759

WINE, JOO (2004).

Submucosal Glands and Airway Defense.
Proc Am Thorac Soc, 1, (1), S. 47-53

WU, CHAU, YOUNG, POKORNY, *et al.* (2004).

Transforming Growth Factor-Beta1 Genotype and Susceptibility to Chronic Obstructive
Pulmonary Disease.
Thorax, 59, (2), S. 126-129

WU, KROUSE, WINE (2007).

Acinar Origin of Cftr-Dependent Airway Submucosal Gland Fluid Secretion.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 292, (1), S. L304-311

XAUBET, MARIN-ARGUEDAS, LARIO, ANCOCHEA, *et al.* (2003).

Transforming Growth Factor-Beta1 Gene Polymorphisms Are Associated with Disease
Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med, 168, (4), S. 431-435

XIANG, WANG, LIU, HIROTA, *et al.* (2007).

A Gabaergic System in Airway Epithelium Is Essential for Mucus Overproduction in Asthma.
Nat Med, 13, (7), S. 862-867

LITERATURVERZEICHNIS

YOUNG, NEWBIGGING, CHOI, KEET, *et al.* (2007).

Amelioration of Cystic Fibrosis Intestinal Mucous Disease in Mice by Restoration of Mlca3.
Gastroenterology, 133, (6), S. 1928-1937

YU, ZHOU, WEN,XIAO Flagellin/Tlr5 Responses Induce Mucus Hypersecretion by Activating
Egfr Via an Epithelial Cell Signaling Cascades.

Exp Cell Res,

ZABNER, SMITH, KARP, WIDDICOMBE, *et al.* (1998).

Loss of Cftr Chloride Channels Alters Salt Absorption by Cystic Fibrosis Airway Epithelia in
Vitro.

Mol Cell, 2, (3), S. 397-403

ZAHM, GAILLARD, DUPUIT, HINNRASKY, *et al.* (1997).

Early Alterations in Airway Mucociliary Clearance and Inflammation of the Lamina Propria in
Cf Mice.

Am J Physiol, 272, (3 Pt 1), S. C853-859

ZEIHER, EICHWALD, ZABNER, SMITH, *et al.* (1995).

A Mouse Model for the Delta F508 Allele of Cystic Fibrosis.

J Clin Invest, 96, (4), S. 2051-2064

ZHOU, TREIS, SCHUBERT, HARM, *et al.* (2008).

Preventive but Not Late Amiloride Therapy Reduces Morbidity and Mortality of Lung Disease
in Betaenac-Overexpressing Mice.

Am J Respir Crit Care Med, 178, (12), S. 1245-1256

ZUELZER,NEWTON (1949).

The Pathogenesis of Fibrocystic Disease of the Pancreas; a Study of 36 Cases with Special
Reference to the Pulmonary Lesions.

Pediatrics, 4, (1), S. 53-69

12 Anhang

12.1 Zusammenstellung der detaillierten Untersuchungsergebnisse

12.1.1 Deskriptive Statistik der Körpergewichte

Tabelle 38: Deskriptive Statistik der Körpergewichte der juvenilen Mäuse

Genotyp	Juvenile Tiere	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Körpergewicht (g)	5	5,90	9,50	8,60	8,18	1,45
ENaC-tg / m3-wt	Körpergewicht (g)	8	6,10	10,00	7,50	7,83	1,43
ENaC-wt / m3-ko	Körpergewicht (g)	7	5,60	10,00	6,60	7,29	1,70
ENaC-wt / m3-wt	Körpergewicht (g)	5	3,50	9,70	8,00	7,34	2,36

Tabelle 39: Deskriptive Statistik der Körpergewichte der adulten Mäuse

Genotyp	Adulte Tiere	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Körpergewicht (g)	5	20,20	25,20	21,80	22,25	2,36
ENaC-tg / m3-wt	Körpergewicht (g)	5	20,60	28,50	24,50	24,04	3,34
ENaC-wt / m3-ko	Körpergewicht (g)	5	17,90	29,20	25,00	24,03	5,71
ENaC-wt / m3-wt	Körpergewicht (g)	4	19,30	26,50	22,80	22,85	3,49

12.1.2 Deskriptive Statistik der *Mucus volume density* (nl/mm)

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden an Hand des jeweils Schleim-reichsten Bronchus eines jeden Tieres berechnet.

Tabelle 40: Deskriptive Statistik der *Mucus volume density*, juvenile Tiere, große Bronchien

Genotyp	Juvenile Tiere, große Bronchien	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	<i>Mucus volume density</i> (nl/mm ²)	5	0,97	22,36	7,94	8,44
ENaC-tg / m3-wt	<i>Mucus volume density</i> (nl/mm ²)	13	0,06	71,83	20,94	22,54
ENaC-wt / m3-ko	<i>Mucus volume density</i> (nl/mm ²)	5	0,05	10,08	2,71	4,26
ENaC-wt / m3-wt	<i>Mucus volume density</i> (nl/mm ²)	10	0,08	1,94	0,93	0,72

ANHANG

Tabelle 41: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, adulte Tiere, große Bronchien

Genotyp	Adulte Tiere, große Bronchien	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	12	0,19	44,47	16,30	14,82
ENaC-tg / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	7	0,65	56,62	29,42	19,41
ENaC-wt / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	3	0,11	3,22	1,64	1,27
ENaC-wt / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	4	0,04	4,66	2,51	1,65

Tabelle 42: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, juvenile Tiere, mittelgroße Bronchien

Genotyp	Juvenile Tiere, mittlere Bronchien	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	7	0,18	13,08	8,47	5,4
ENaC-tg / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	8	0,91	21,97	9,21	7,52
ENaC-wt / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	9	0,00	3,53	0,80	1,13
ENaC-wt / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	3	0,05	3,79	1,53	1,62

Tabelle 43: Deskriptive Statistik der Mucus volume density, adulte Tiere, mittelgroße Bronchien

Genotyp	Adulte Tiere, mittlere Bronchien	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	9	0,00	7,35	2,90	3,06
ENaC-tg / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	13	0,16	21,56	14,03	4,53
ENaC-wt / m3-ko	Mucus volume density (nl/mm ²)	9	0,00	2,07	0,74	0,79
ENaC-wt / m3-wt	Mucus volume density (nl/mm ²)	8	0,00	1,15	0,48	0,36

12.1.3 **Deskriptive Statistik der Becherzellanzahl pro mm Basalmembran**

Tabelle 44: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in dem kranialen Abschnitt der Trachea (T1)

Genotyp	Juvenile Tiere: T1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	13,65	31,33	21,09	22,02	8,88
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	10,80	48,15	13,43	24,13	20,85
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	5,36	23,59	9,41	12,79	9,57
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	2,23	18,14	13,51	12,38	6,35
Genotyp	Adulte Tiere: T1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	0,00	25,00	1,20	7,60	10,65
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	11,17	33,55	17,94	20,15	9,70
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,85	1,95	1,09	1,25	0,52
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	0,93	40,05	3,59	12,04	18,79

Tabelle 45: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in der Mitte der Trachea (T2)

Genotyp	Juvenile Tiere: T2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	47,88	54,89	51,10	51,29	3,51
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	2,53	43,01	20,84	22,09	17,95
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	7,34	32,44	23,79	21,19	12,75
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	12,28	13,15	12,82	12,77	0,37
Genotyp	Adulte Tiere: T2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	0,93	22,00	1,92	6,92	8,94
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	1,48	29,42	4,00	9,59	11,64
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	0,00	3,00	1,00	1,45	1,20
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	0,49	27,64	7,16	10,61	11,78

ANHANG

Tabelle 46: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in dem kaudalen Abschnitt der Trachea (T3)

Genotyp	Juvenile Tiere: T3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	25,26	36,41	29,57	30,20	4,61
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	33,13	63,84	44,41	46,45	15,27
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	20,65	59,06	34,40	37,13	18,92
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	2	4,81	7,31	6,06	6,06	1,77
Genotyp	Adulte Tiere: T3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	2,59	4,93	3,45	3,67	1,18
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	7,00	34,56	10,05	17,20	15,11
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,00	8,50	4,29	4,27	4,36
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	0,00	12,03	1,38	3,62	4,93

Tabelle 47: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den großen Bronchien (L1)

Genotyp	Juvenile Tiere: L1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	23,62	52,31	34,51	36,81	14,48
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	17,79	55,26	35,32	36,22	13,97
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	1,14	35,50	27,13	19,63	15,31
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	0,00	48,32	45,08	31,13	27,01
Genotyp	Adulte Tiere: L1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	0,86	31,09	6,09	12,18	12,28
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	11,15	54,96	31,53	32,29	20,66
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	7,62	49,01	22,75	24,59	17,16
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	0,00	26,69	9,70	11,52	13,63

ANHANG

Tabelle 48: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den mittelgroßen Bronchien (L2)

Genotyp	Juvenile Tiere: L2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	2	15,11	32,40	23,76	23,76	12,22
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	5	2,87	59,77	25,62	27,32	20,68
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	5	0,00	16,10	0,00	3,22	7,20
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	0,00	17,24	8,82	8,72	8,33
Genotyp	Adulte Tiere: L2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,76	8,48	6,61	5,62	3,52
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	2	2,93	49,95	26,44	26,44	33,25
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,00	2,38	0,55	0,87	1,13
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	2	0,00	2,33	1,17	1,17	1,65

Tabelle 49: Deskriptive Statistik, Becherzellen pro mm Basalmembran der juvenilen und adulten Tiere in den kleinen Bronchien (L3)

Genotyp	Juvenile Tiere: L3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	0,00	19,51	14,55	11,35	10,14
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	0,00	5,44	3,74	3,06	2,78
Genotyp	Adulte Tiere: L3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Becherzellen pro mm	3	1,09	6,74	2,19	3,34	3,00
ENaC-tg / m3-wt	Becherzellen pro mm	3	0,00	46,17	0,00	15,39	26,66
ENaC-wt / m3-ko	Becherzellen pro mm	4	0,00	3,84	0,00	0,96	1,92
ENaC-wt / m3-wt	Becherzellen pro mm	4	0,00	2,25	0,00	0,56	1,13

12.1.4 **Deskriptive Statistik der Epithelhöhen**

Tabelle 50: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in dem kranialen Abschnitt der Trachea (T1)

Genotyp	Juvenile Tiere: T1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	73	16,16	34,17	22,82	23,97	4,57
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	61	18,76	32,44	24,47	24,97	3,30
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	49	11,67	20,08	14,92	15,10	1,77
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	104	10,14	23,06	17,09	17,18	2,53

Genotyp	Adulte Tiere: T1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	101	11,38	29,53	17,34	17,93	3,33
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	79	13,62	22,37	18,84	18,24	2,20
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	80	10,02	25,23	14,76	15,61	3,25
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	52	10,63	24,11	15,95	15,19	3,29

Tabelle 51: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in der Mitte der Trachea (T2)

Genotyp	Juvenile Tiere: T2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	53	14,42	32,80	22,52	23,67	5,29
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	96	15,33	36,37	24,72	25,22	5,09
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	44	11,37	22,42	17,82	17,38	2,95
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	90	9,08	24,70	15,53	16,14	3,38

Genotyp	Adulte Tiere: T2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	163	10,54	20,78	15,95	16,18	2,44
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	98	10,34	27,55	16,71	17,09	3,68
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	79	11,88	22,63	15,82	16,49	2,84
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	91	9,05	25,07	16,39	16,27	3,72

ANHANG

Tabelle 52: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in dem kaudalen Abschnitt der Trachea (T3)

Genotyp	Juvenile Tiere: T3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	55	12,55	32,40	22,85	22,96	5,30
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	62	11,31	36,65	26,61	24,87	6,61
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	49	9,84	22,63	15,78	16,05	3,48
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	38	11,65	19,70	15,37	15,52	1,97

Genotyp	Adulte Tiere: T3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	67	11,00	28,01	16,62	16,54	3,45
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	52	15,37	30,94	19,82	21,51	4,08
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	88	6,10	31,46	11,79	12,94	4,91
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	46	10,32	28,63	18,36	18,81	4,40

Tabelle 53: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in den großen Bronchien (L1)

Genotyp	Juvenile Tiere: L1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	82	6,61	25,81	13,76	14,03	3,64
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	232	5,77	39,68	13,02	14,17	5,58
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	110	6,16	18,50	9,80	10,34	2,75
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	71	6,41	15,91	9,92	10,23	2,56

Genotyp	Adulte Tiere: L1	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	90	10,20	41,82	20,16	22,24	6,94
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	68	10,15	35,80	22,63	22,49	6,51
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	60	13,33	40,88	26,69	26,30	6,26
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	53	9,68	40,41	23,52	25,44	6,44

ANHANG

Tabelle 54: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in den mittelgroßen Bronchien (L2)

Genotyp	Juvenile Tiere: L2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	52	6,36	22,15	13,81	13,66	3,75
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	134	5,06	27,10	9,94	11,71	5,57
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	139	5,41	24,18	8,62	9,54	3,69
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	59	5,88	10,98	8,09	8,10	1,19

Genotyp	Adulte Tiere: L2	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	47	7,72	29,21	16,28	17,17	4,70
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	64	7,36	42,37	16,21	18,75	7,84
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	72	8,57	27,05	17,33	17,79	3,43
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	24	8,89	25,28	15,58	16,69	5,05

Tabelle 55: Deskriptive Statistik der Epithelhöhen (μm) der juvenilen und adulten Tiere in den kleinen Bronchien (L3)

Genotyp	Juvenile Tiere: L3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	9	6,45	9,50	8,81	8,58	0,96
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	41	5,95	15,11	9,93	10,45	2,26
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	32	6,48	12,30	8,70	8,97	1,54
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	53	4,86	11,95	8,71	9,01	1,57

Genotyp	Adulte Tiere: L3	n	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	SD
ENaC-tg / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	48	6,12	31,76	17,40	17,44	5,12
ENaC-tg / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	48	3,37	30,36	15,61	16,65	5,14
ENaC-wt / m3-ko	Epithelhöhe (μm)	48	7,59	47,32	16,25	16,65	5,58
ENaC-wt / m3-wt	Epithelhöhe (μm)	60	9,06	31,78	14,83	15,42	3,55

12.1.5 Graphische Darstellung der Becherzellzahlen der Einzeltiere

12.1.5.1 Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere

12.1.5.1.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko

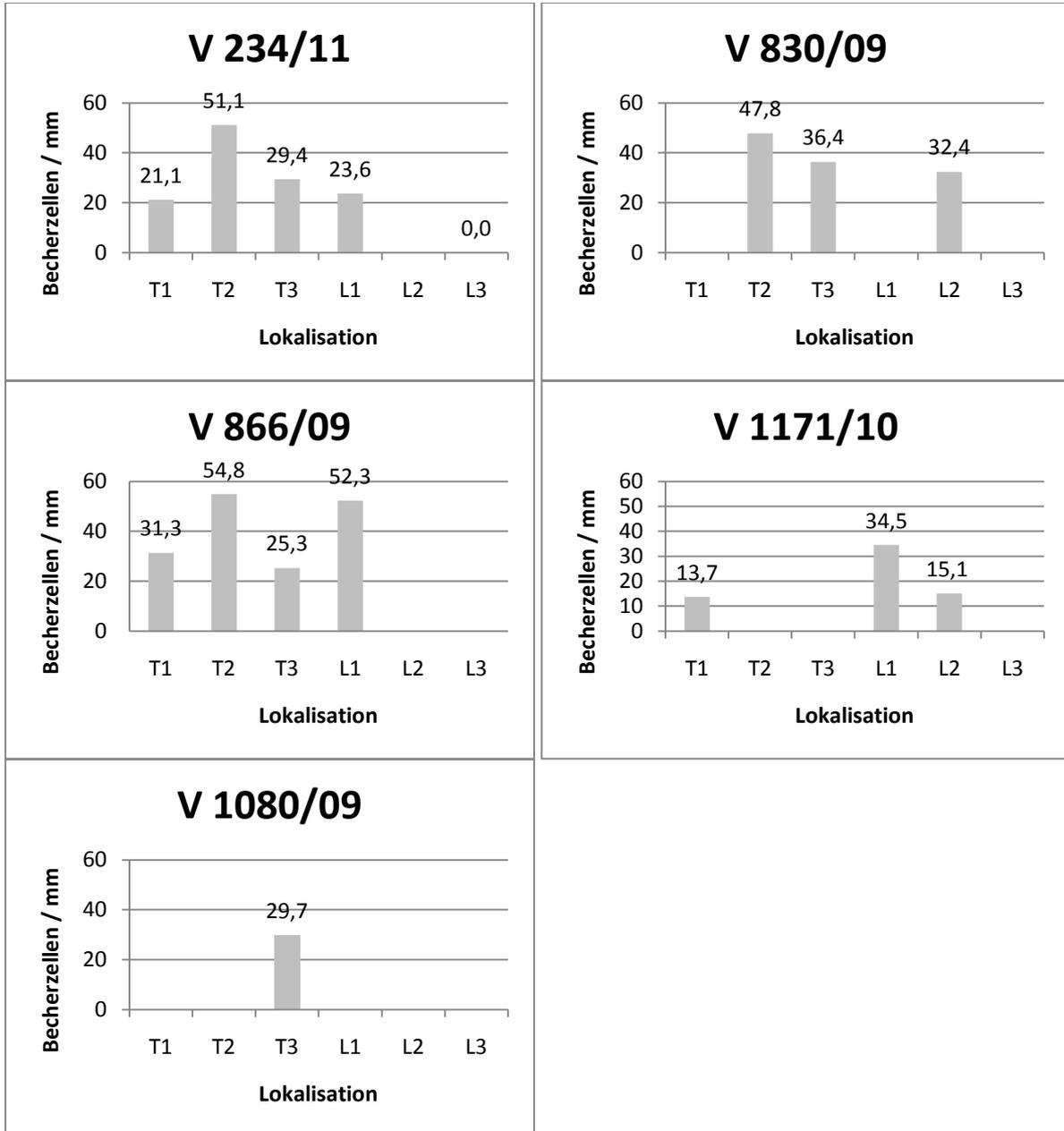


Abb. 25: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-tg/m3-ko

12.1.5.1.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt

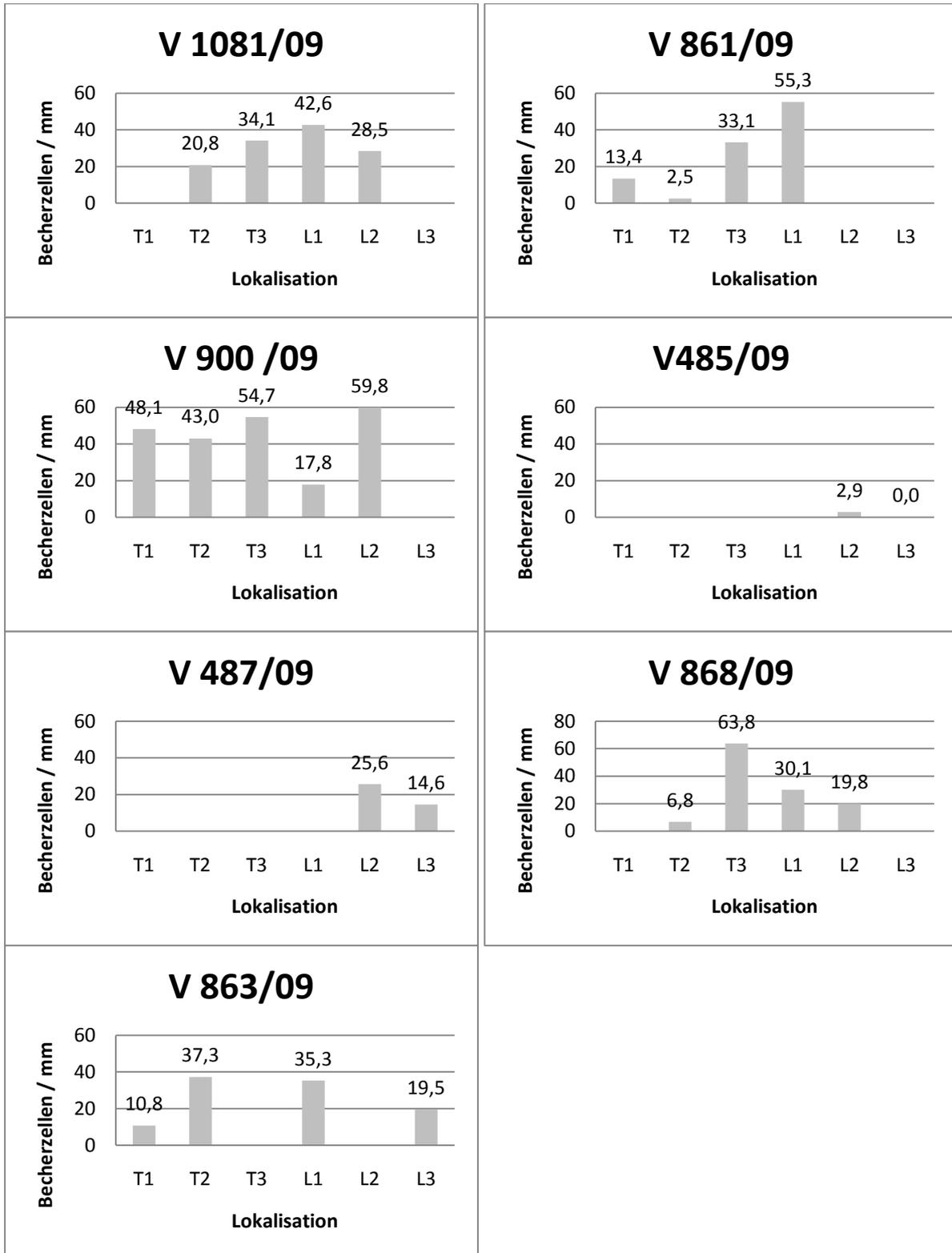


Abb. 26: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-tg/m3-wt

12.1.5.1.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko

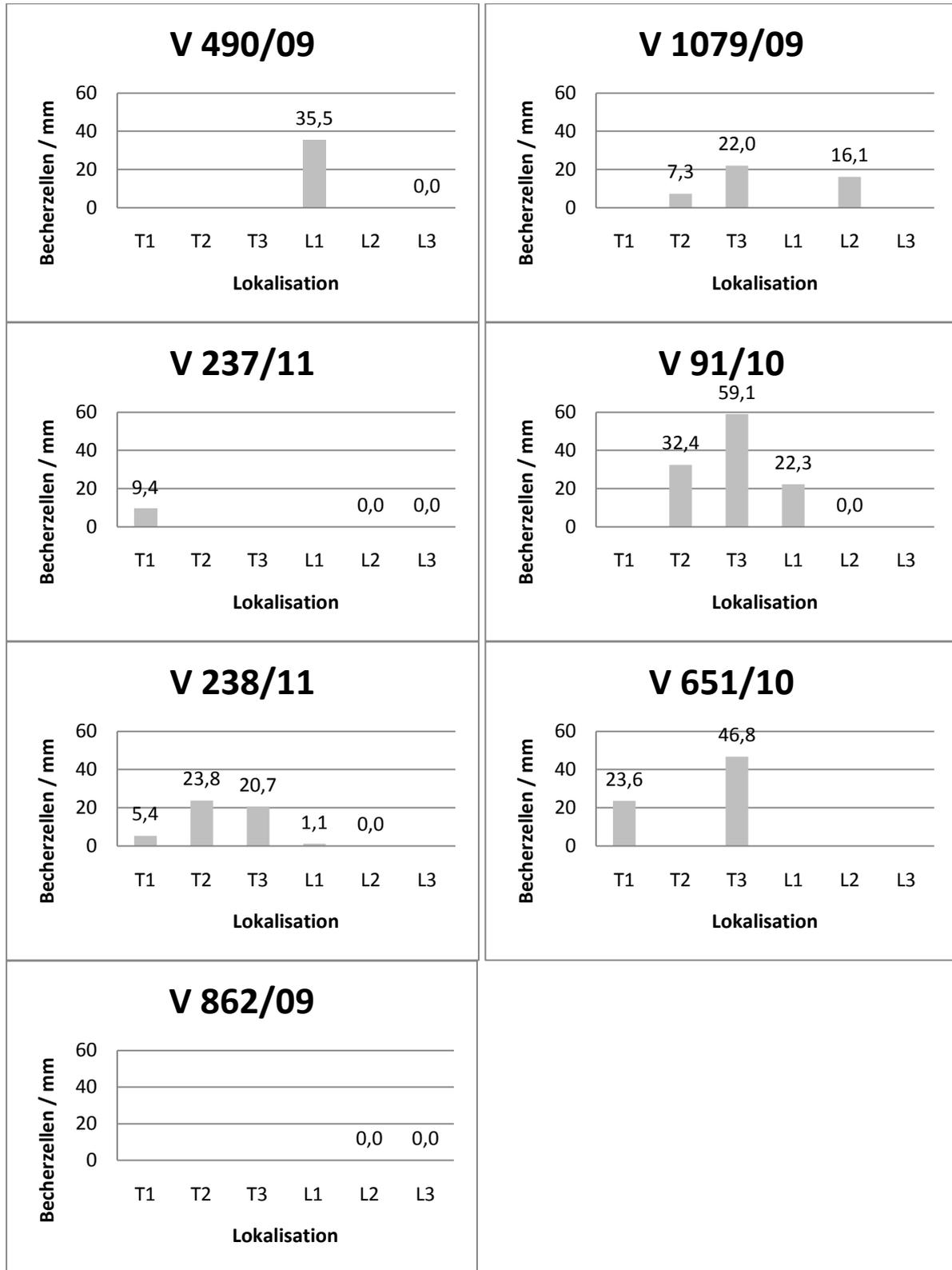


Abb. 27: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-wt/m3-ko

12.1.5.1.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt

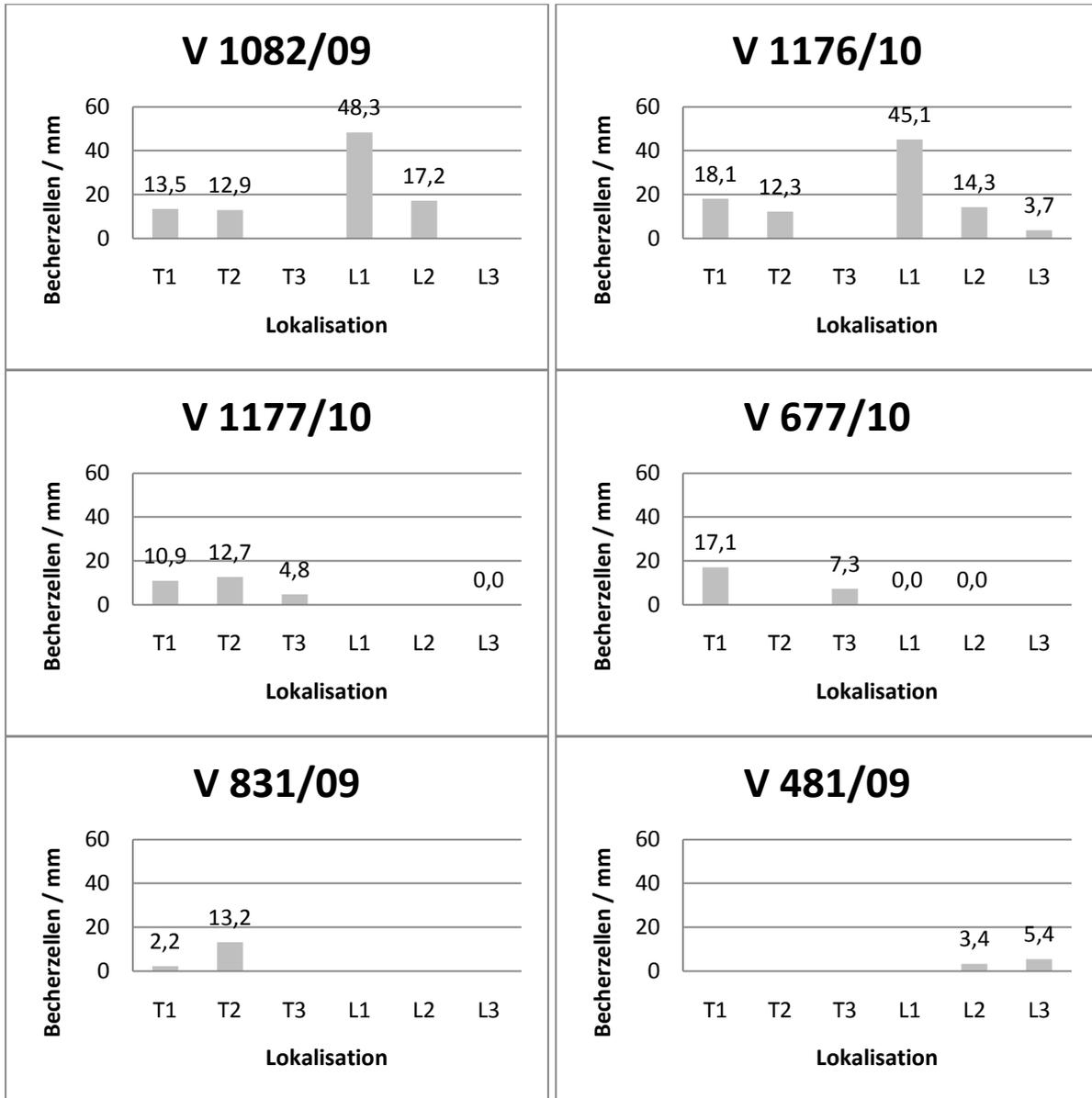


Abb. 28: Darstellung der Becherzellzahlen der juvenilen Einzeltiere, ENaC-wt/m3-wt

12.1.5.2 Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere

12.1.5.2.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko

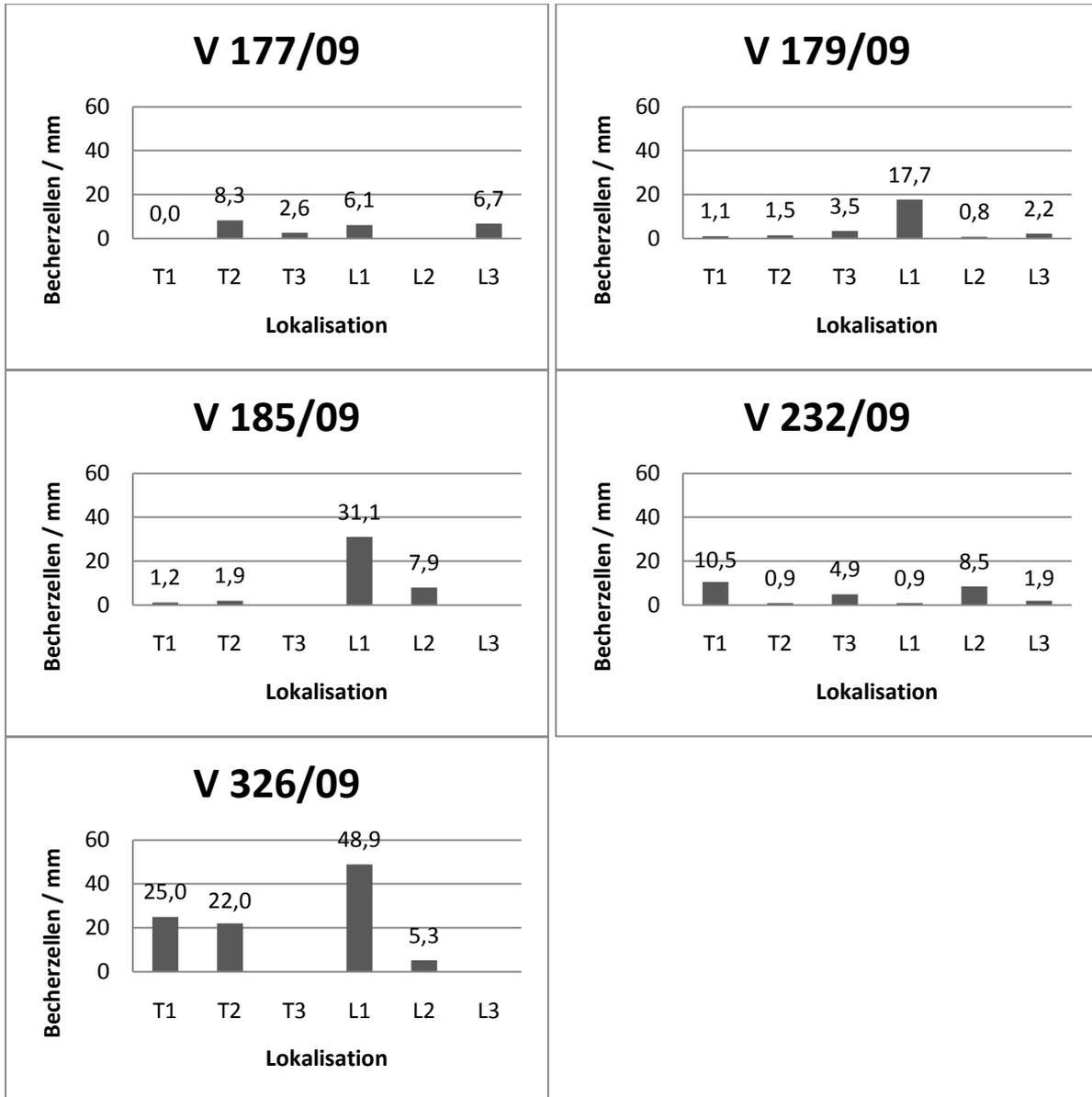


Abb. 29: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-tg/m3-ko

12.1.5.2.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt

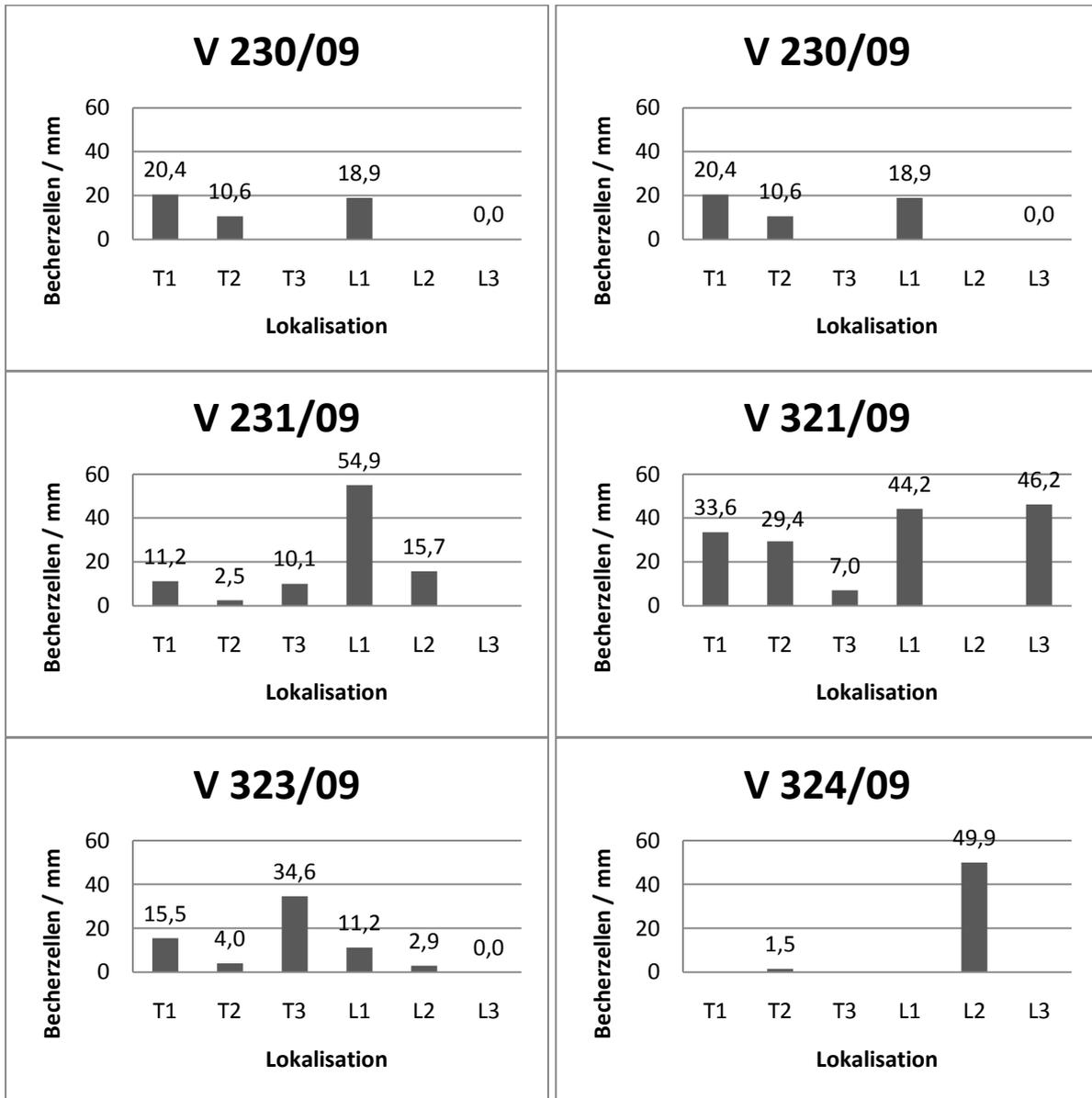


Abb. 30: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-tg/m3-wt

12.1.5.2.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko

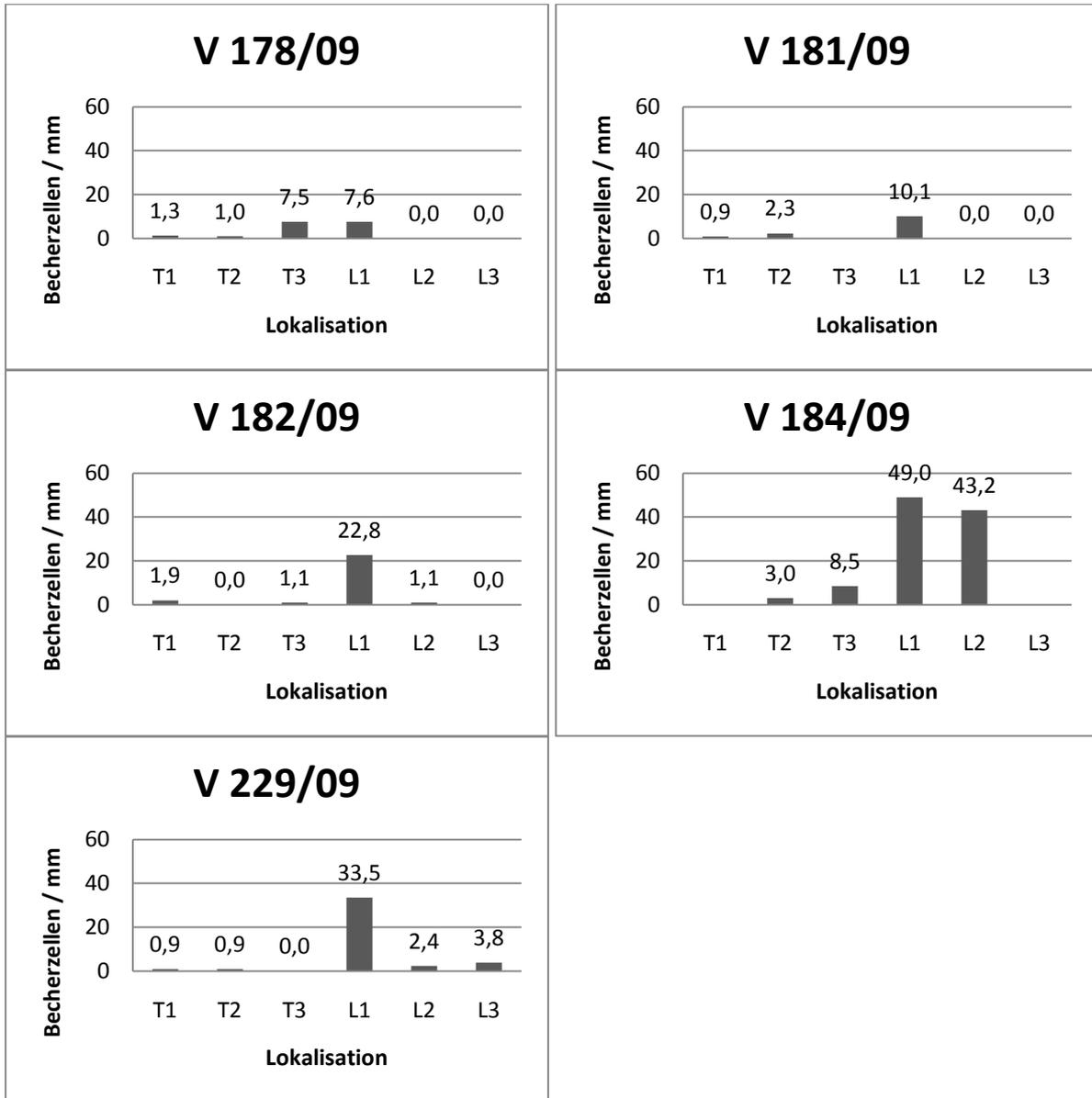


Abb. 31: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-wt/m3-ko

12.1.5.2.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt

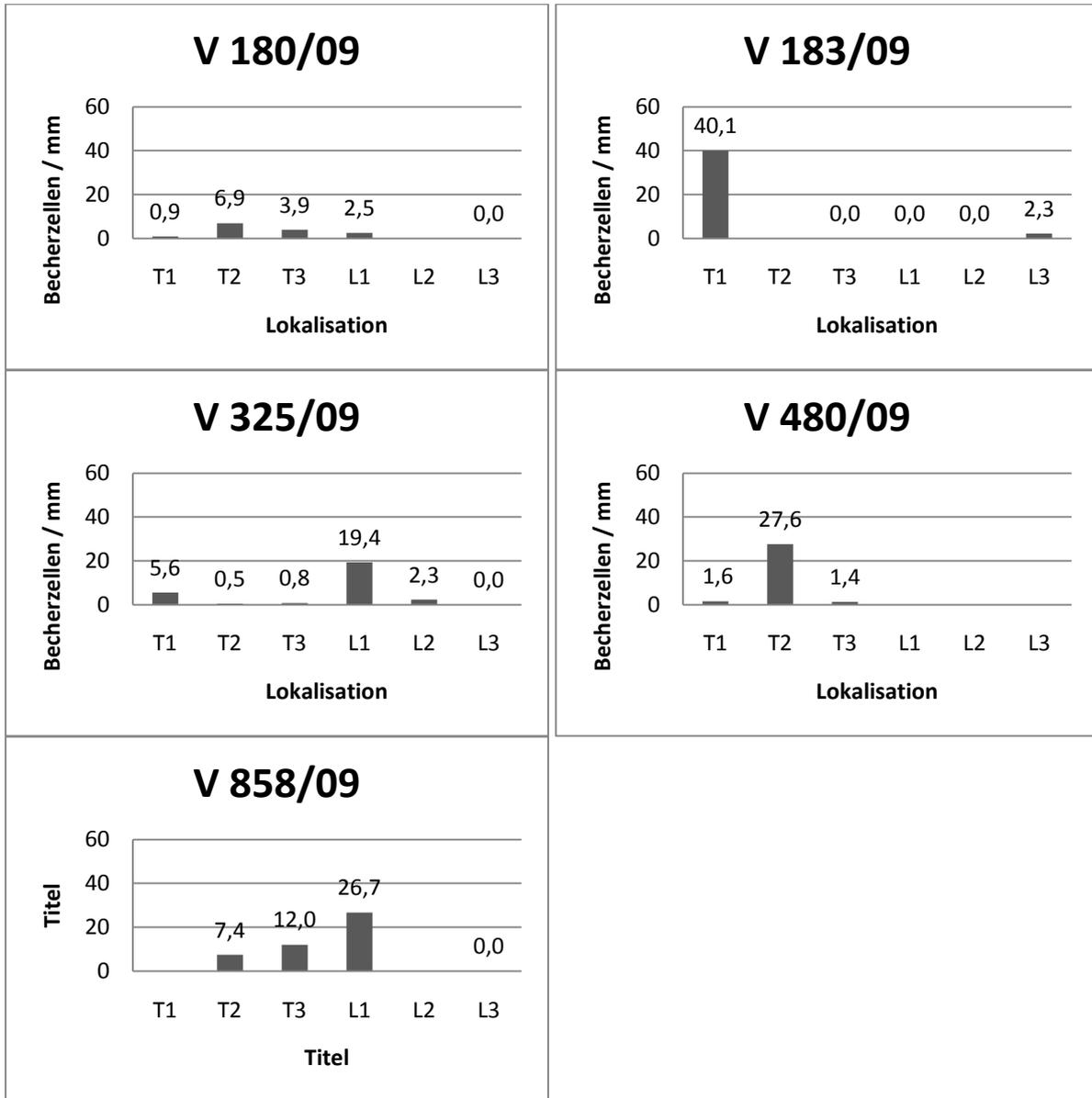
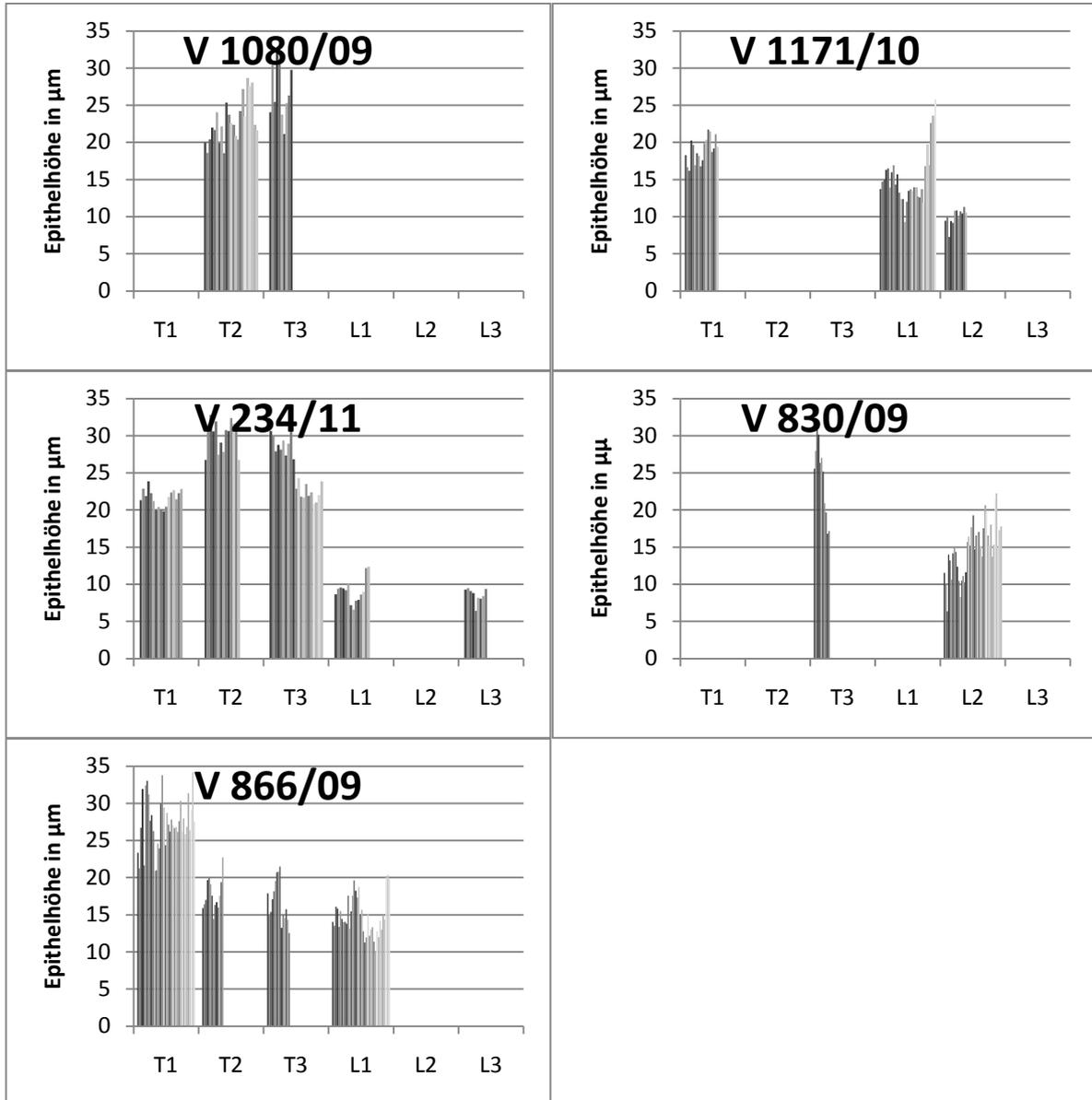


Abb. 32: Darstellung der Becherzellzahlen der adulten Einzeltiere, ENaC-wt/m3-wt

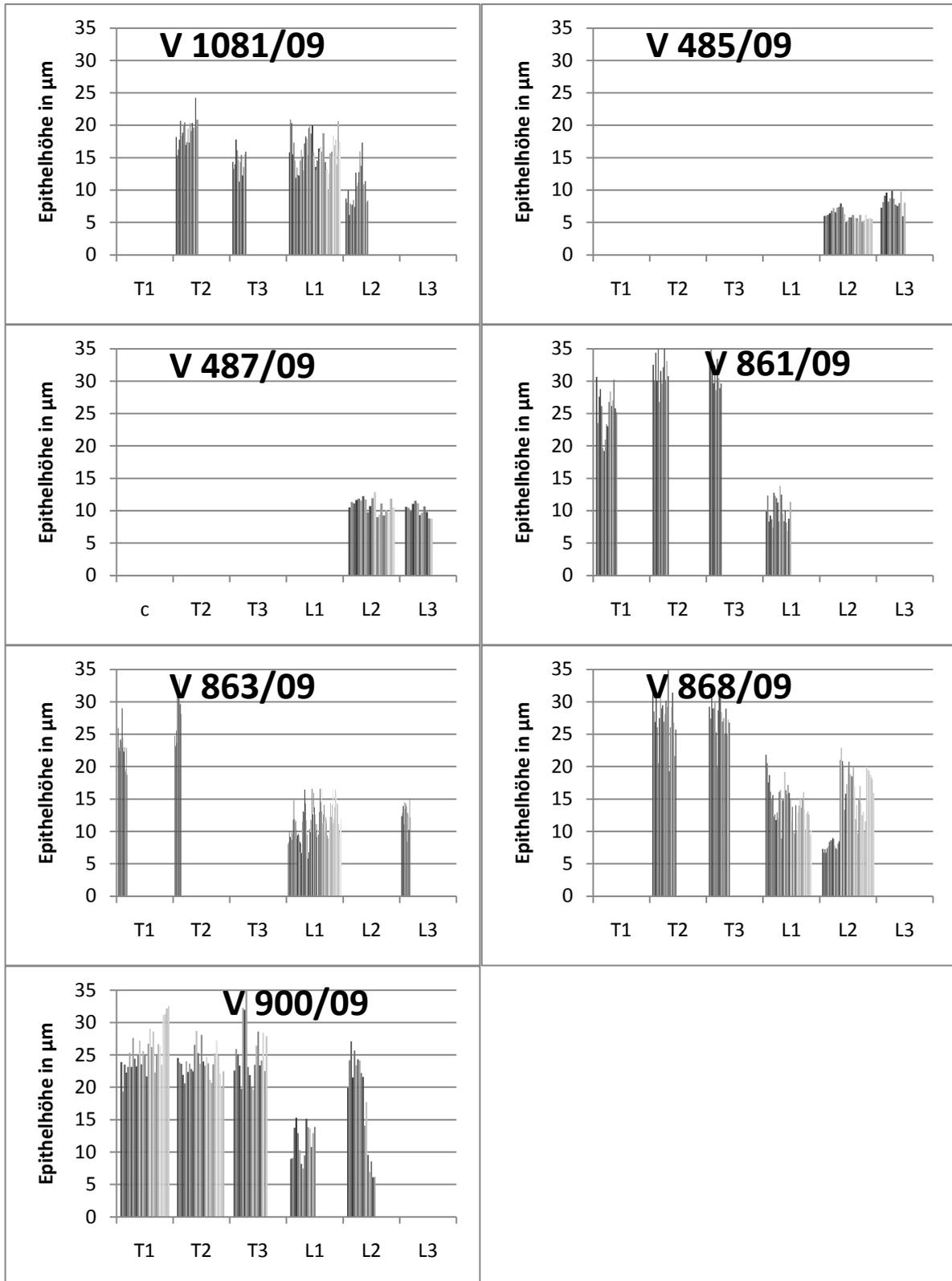
12.1.6 Graphische Darstellung der Epithelhöhen

12.1.6.1 Darstellung der Epithelhöhen der juvenilen Einzeltiere

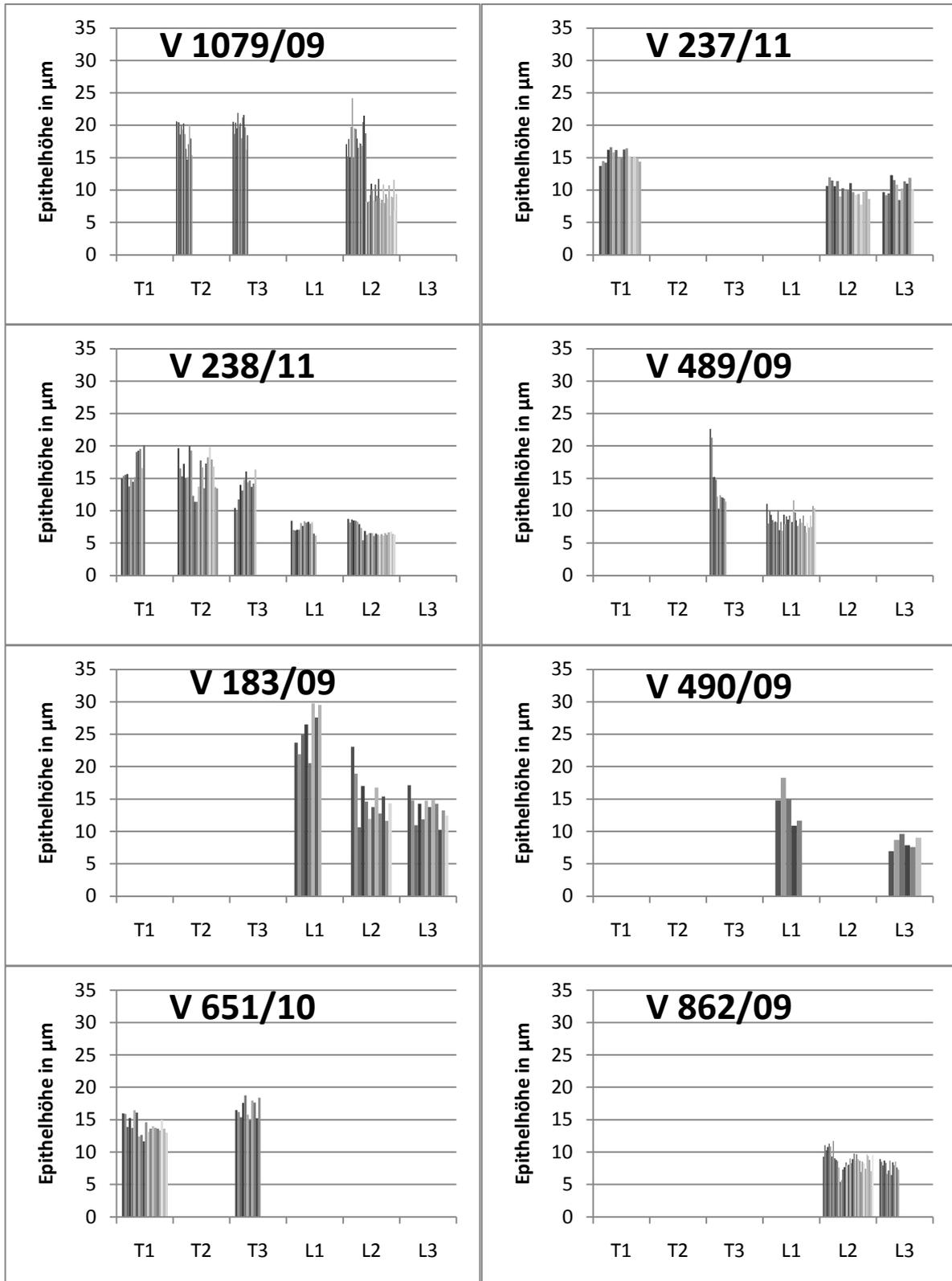
12.1.6.1.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko

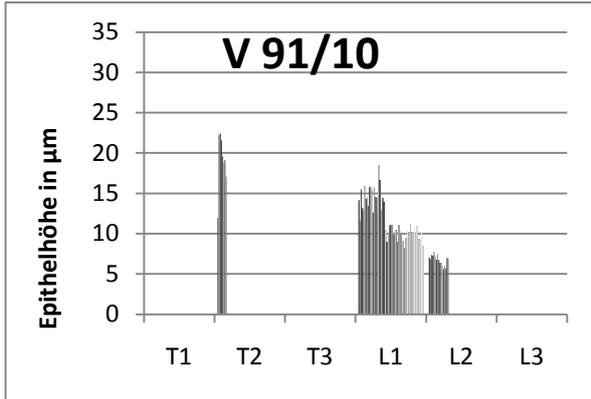


12.1.6.1.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt

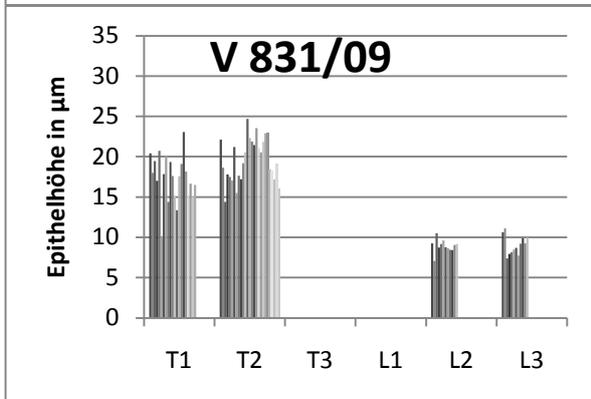
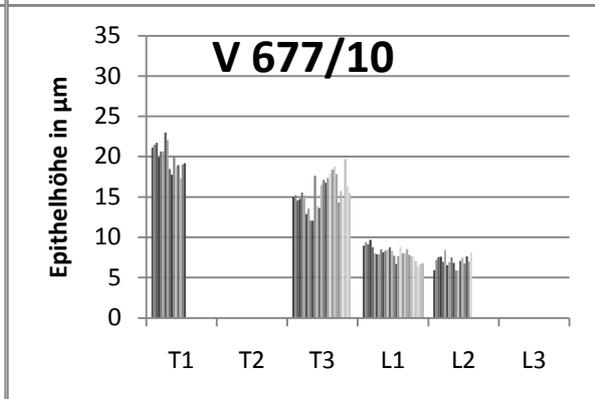
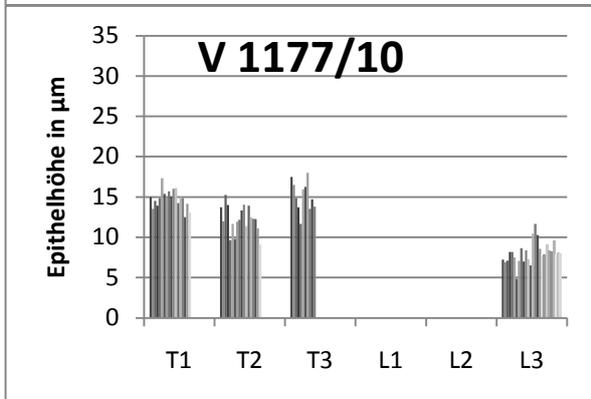
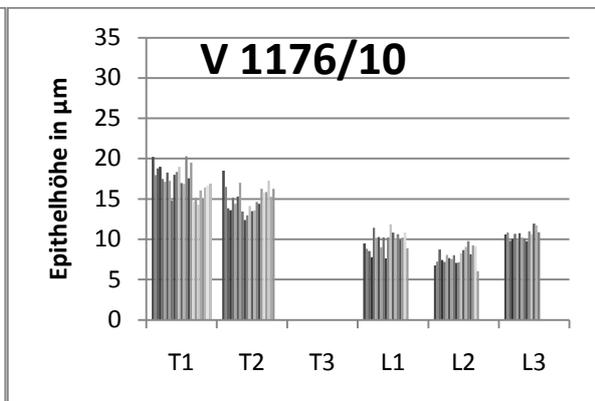
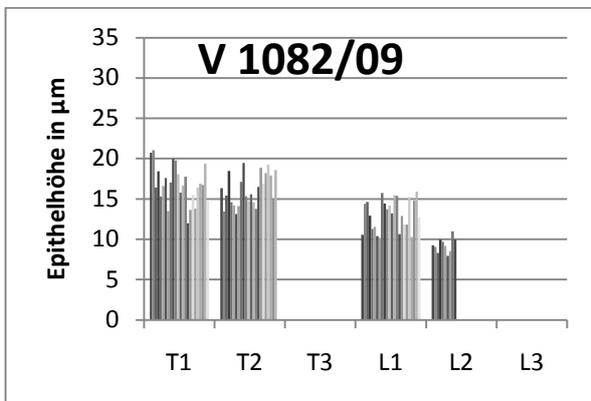


12.1.6.1.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko



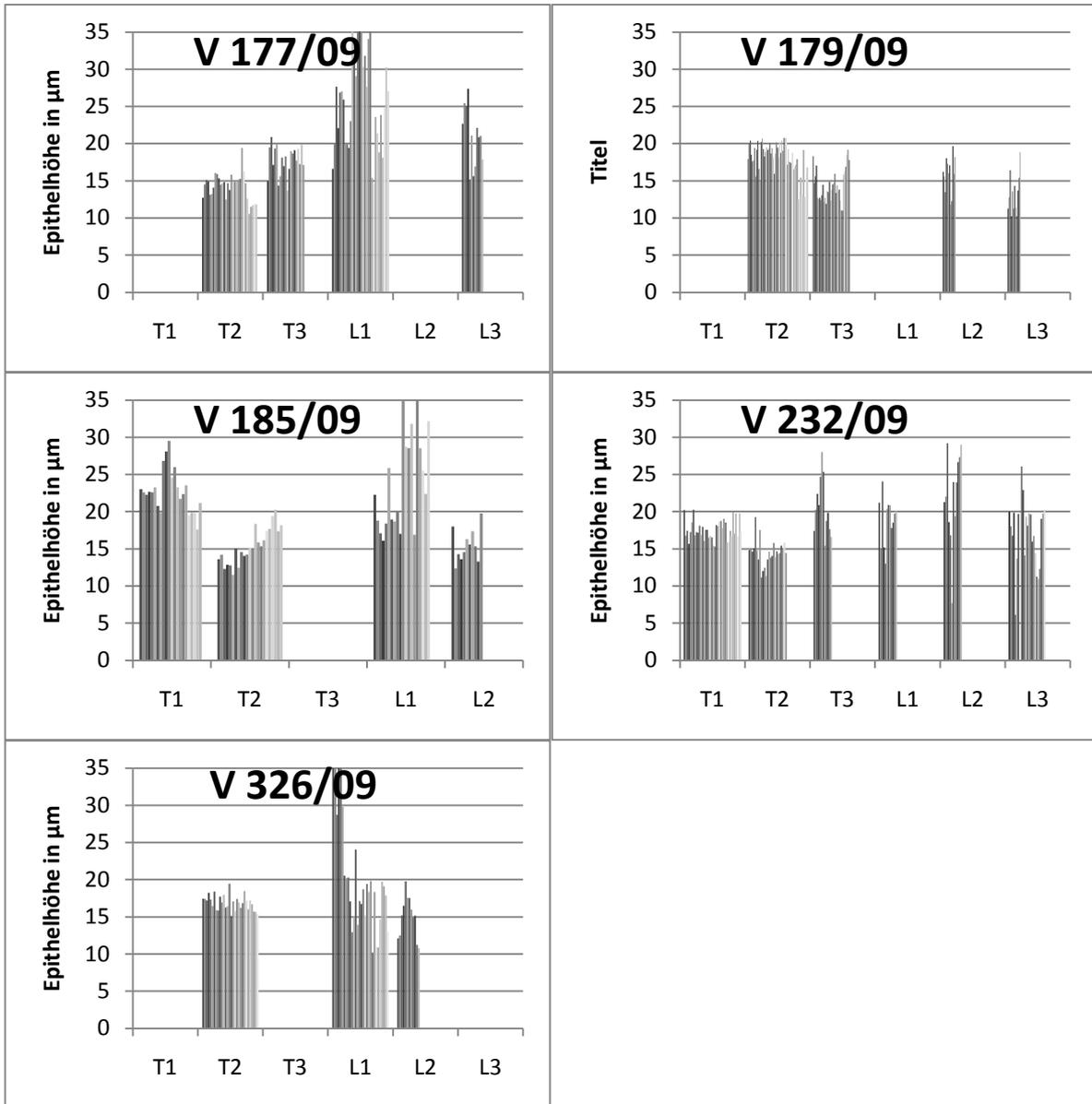


12.1.6.1.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt

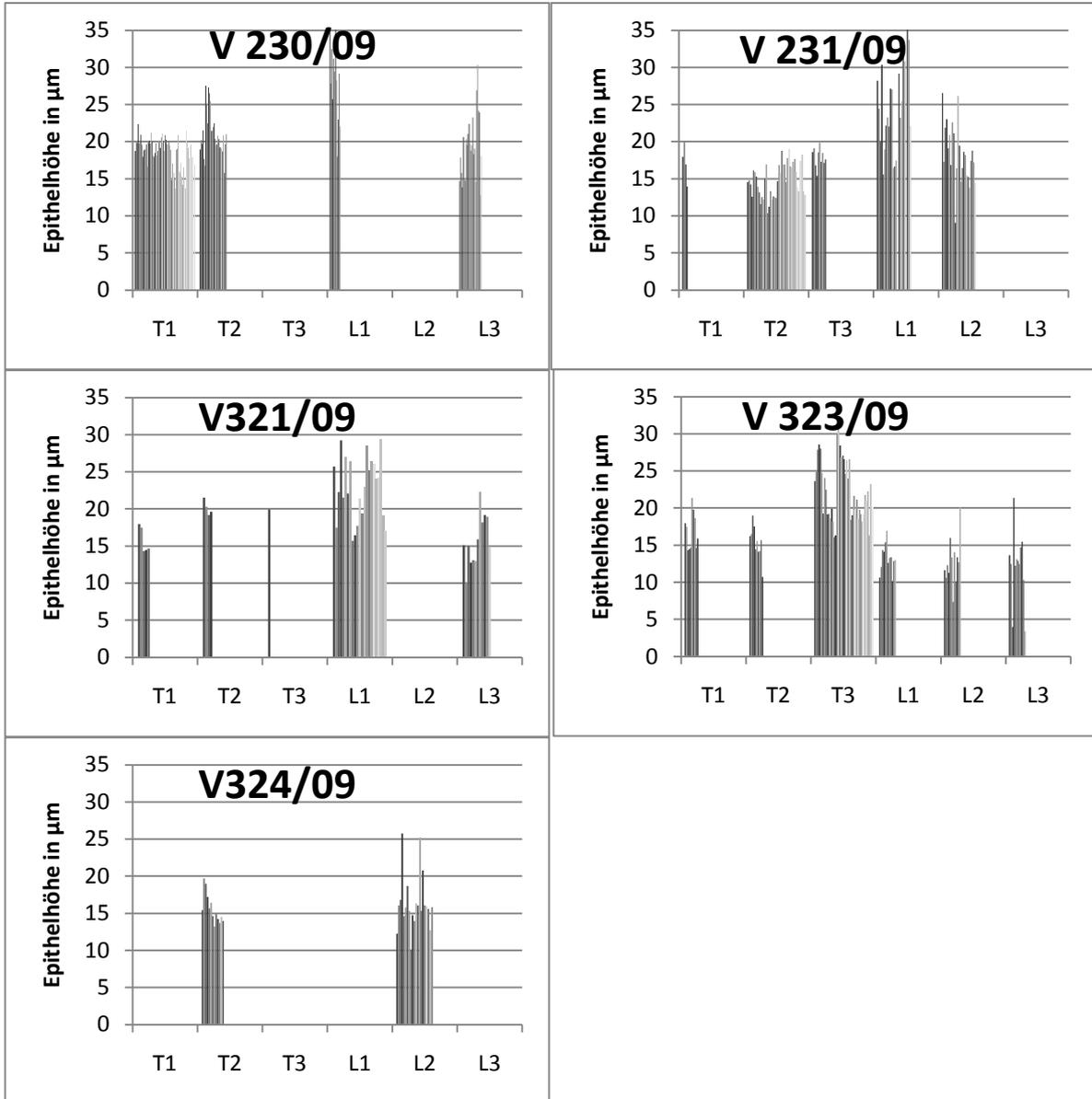


12.1.6.2 Darstellung der Epithelhöhen der adulten Einzeltiere

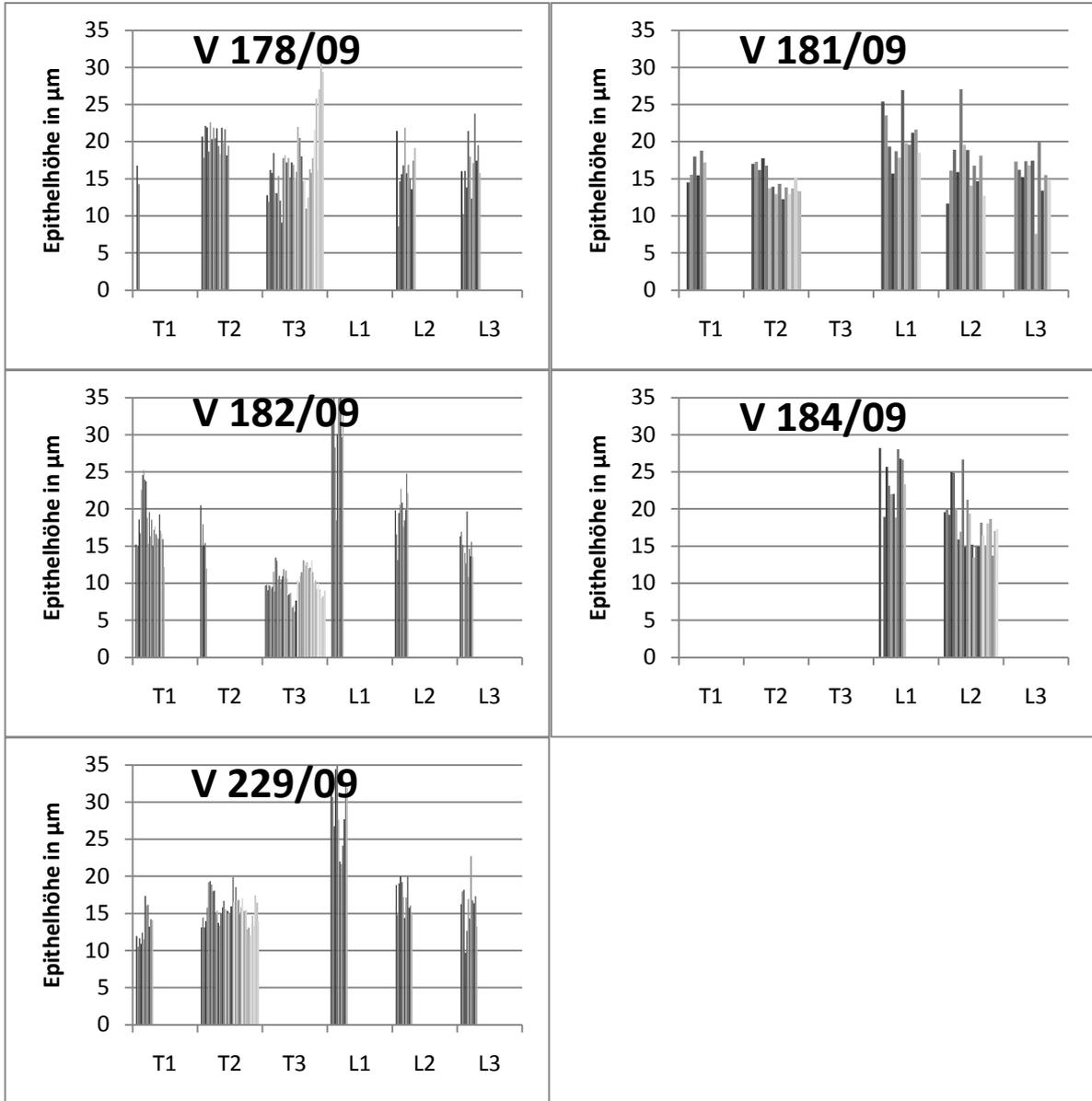
12.1.6.2.1 Genotyp: ENaC-tg/m3-ko



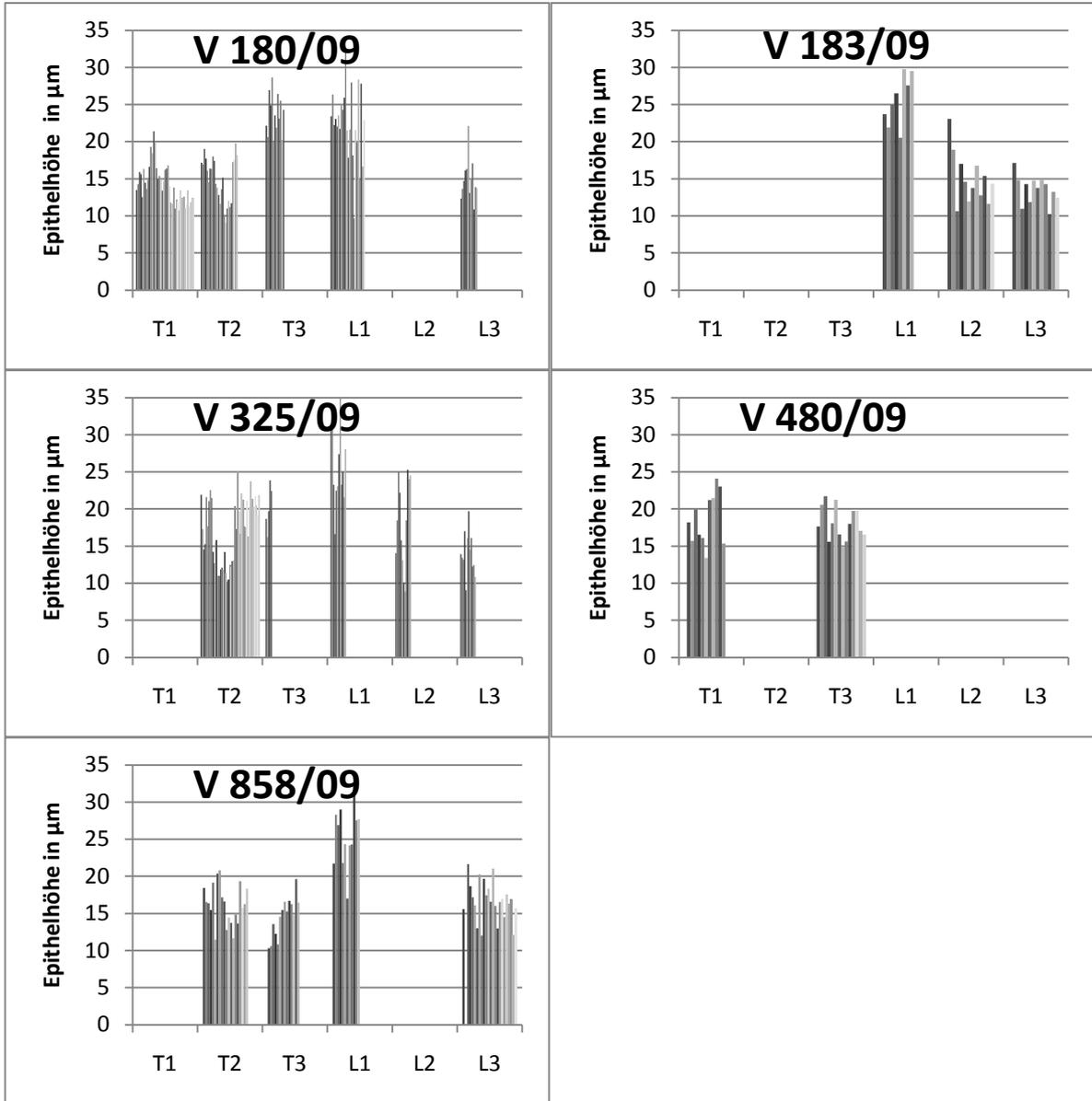
12.1.6.2.2 Genotyp: ENaC-tg/m3-wt



12.1.6.2.3 Genotyp: ENaC-wt/m3-ko



12.1.6.2.4 Genotyp: ENaC-wt/m3-wt



12.1.7 Statistische Kennzahlen für die Anzahl der Becherzellen und die Epithelhöhen

12.1.7.1 Mann-Whitney-Test

Tabelle 56: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; gesamter Respirationstrakt

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
gesamt	ENaC-tg / m3-ko	16	22,1	353,5	0,644
	ENaC-tg / m3-wt	25	20,3	507,5	
	ENaC-tg / m3-ko	16	24,9	399,5	0,009
	ENaC-wt / m3-ko	22	15,5	341,5	
	ENaC-tg / m3-wt	25	28,4	711,5	0,017
	ENaC-wt / m3-ko	22	18,9	416,5	
	ENaC-tg / m3-wt	25	29,2	731,5	0,001
	ENaC-wt / m3-wt	21	16,6	349,5	
	ENaC-tg / m3-ko	16	26,4	422,5	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	21	13,3	280,5	
	ENaC-wt / m3-ko	22	22,7	500,5	0,687
	ENaC-wt / m3-wt	21	21,2	445,4	

ANHANG

Tabelle 57: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen T1 u. T2

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T1	ENaC-tg / m3-ko	3	4,0	12,0	0,700
	ENaC-tg / m3-wt	3	3,0	9,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	4,3	13,0	0,400
	ENaC-wt / m3-ko	3	2,6	8,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	6,3	19,0	0,143
	ENaC-wt / m3-wt	5	3,4	17,0	
	ENaC-tg / m3-wt	3	4,3	13,0	0,400
	ENaC-wt / m3-ko	3	2,6	8,0	
	ENaC-tg / m3-wt	3	4,6	14,0	1,000
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,4	22,0	
	ENaC-wt / m3-ko	3	4,3	13,0	1,000
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,6	23,0	
T2	ENaC-tg / m3-ko	3	7,0	21,0	0,036
	ENaC-tg / m3-wt	5	3,0	15,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	5,0	15,0	0,100
	ENaC-wt / m3-ko	3	2,0	6,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	6,0	18,0	0,057
	ENaC-wt / m3-wt	4	2,5	10,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	4,4	22,0	1,000
	ENaC-wt / m3-ko	3	4,6	14,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	5,4	27,0	0,730
	ENaC-wt / m3-wt	4	4,5	18,0	
	ENaC-wt / m3-ko	3	4,6	14,0	0,629
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,5	14,0	

ANHANG

Tabelle 58: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen T3 u. L1

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz	
T3	ENaC-tg / m3-ko	4	3,0	12,0	0,114	
	ENaC-tg / m3-wt	4	6,0	24,0		
	ENaC-tg / m3-ko	4	4,5	18,0	1,000	
	ENaC-wt / m3-ko	4	4,5	18,0		
	ENaC-tg / m3-ko	4	4,5	18,0	0,133	
	ENaC-wt / m3-wt	2	1,5	3,0		
	ENaC-tg / m3-wt	4	5,2	21,0	0,486	
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,7	15,0		
	ENaC-tg / m3-wt	4	4,5	18,0	0,133	
	ENaC-wt / m3-wt	2	1,5	3,0		
	ENaC-wt / m3-ko	4	4,5	18,0	0,133	
	ENaC-wt / m3-wt	2	1,5	3,0		
	L1	ENaC-tg / m3-ko	3	4,3	13,0	1,000
		ENaC-tg / m3-wt	5	4,6	23,0	
ENaC-tg / m3-ko		3	5,0	15,0	0,400	
ENaC-wt / m3-ko		4	3,2	13,0		
ENaC-tg / m3-ko		3	3,6	11,0	1,000	
ENaC-wt / m3-wt		3	3,3	10,0		
ENaC-tg / m3-wt		5	6,0	30,0	0,286	
ENaC-wt / m3-ko		4	3,7	15,0		
ENaC-tg / m3-wt		5	4,4	22,0	1,000	
ENaC-wt / m3-wt		3	4,6	14,0		
ENaC-wt / m3-ko		4	3,5	14,0	0,629	
ENaC-wt / m3-wt		3	4,6	14,0		

ANHANG

Tabelle 59: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, juvenile Tiere; Lokalisationen L2 u. L3

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz	
L2	ENaC-tg / m3-ko	2	4,0	8,0	1,000	
	ENaC-tg / m3-wt	5	4,0	20,0		
	ENaC-tg / m3-ko	2	6,0	12,0	0,190	
	ENaC-wt / m3-ko	5	3,2	16,0		
	ENaC-tg / m3-ko	2	5,0	10,0	0,267	
	ENaC-wt / m3-wt	4	2,7	11,0		
	ENaC-tg / m3-wt	5	7,8	39,0	0,016	
	ENaC-wt / m3-ko	5	3,2	16,0		
	ENaC-tg / m3-wt	5	6,4	32,0	0,111	
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,2	13,0		
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,0	20,0	0,286	
	ENaC-wt / m3-wt	4	6,2	25,0		
	L3	ENaC-tg / m3-ko	1	1,5	1,5	0,500
		ENaC-tg / m3-wt	3	2,8	8,5	
ENaC-tg / m3-ko		1	2,5	2,5	1,000	
ENaC-wt / m3-ko		3	2,5	7,5		
ENaC-tg / m3-ko		1	1,5	1,5	0,500	
ENaC-wt / m3-wt		3	2,8	8,5		
ENaC-tg / m3-wt		3	4,5	13,5	0,200	
ENaC-wt / m3-ko		4	2,5	7,5		
ENaC-tg / m3-wt		3	4,1	12,5	0,400	
ENaC-wt / m3-wt		3	2,8	8,5		
ENaC-wt / m3-ko		3	2,5	7,5	0,200	
ENaC-wt / m3-wt		3	4,5	13,5		

ANHANG

Tabelle 60: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; gesamter Respirationstrakt

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
gesamt	ENaC-tg / m3-ko	25	18,7	469,0	0,009
	ENaC-tg / m3-wt	21	29,1	612,0	
	ENaC-tg / m3-ko	25	29,7	743,5	0,078
	ENaC-wt / m3-ko	26	22,4	582,5	
	ENaC-tg / m3-wt	21	31,4	660,0	0,001
	ENaC-wt / m3-ko	26	18,0	468,0	
	ENaC-tg / m3-wt	21	28,4	597,0	0,003
	ENaC-wt / m3-wt	23	17,0	393,0	
	ENaC-tg / m3-ko	25	27,1	679,5	0,166
	ENaC-wt / m3-wt	23	21,5	496,5	
	ENaC-wt / m3-ko	26	24,8	646,5	0,943
	ENaC-wt / m3-wt	23	25,1	578,5	

ANHANG

Tabelle 61: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen T1 u. T2

Lokalisatio	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T1	ENaC-tg / m3-ko	5	3,6	18,0	0,111
	ENaC-tg / m3-wt	4	6,7	27,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	5,4	27,0	0,730
	ENaC-wt / m3-ko	4	4,5	18,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	4,6	23,0	0,730
	ENaC-wt / m3-wt	4	5,5	22,0	
	ENaC-tg / m3-wt	4	6,5	26,0	0,029
	ENaC-wt / m3-ko	4	2,5	10,0	
	ENaC-tg / m3-wt	4	5,5	22,0	0,343
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,5	14,0	
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,2	13,0	0,200
	ENaC-wt / m3-wt	4	5,7	23,0	
T2	ENaC-tg / m3-ko	5	4,6	23,0	0,421
	ENaC-tg / m3-wt	5	6,4	32,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	6,6	33,0	0,310
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,4	22,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	4,8	24,0	0,905
	ENaC-wt / m3-wt	4	5,2	21,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	7,4	37,0	0,056
	ENaC-wt / m3-ko	5	3,6	18,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	5,0	25,0	1,000
	ENaC-wt / m3-wt	4	5,0	20,0	
	ENaC-wt / m3-ko	5	3,8	19,0	0,190
	ENaC-wt / m3-wt	4	6,5	26,0	

ANHANG

Tabelle 62: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen T3 u. L1

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T3	ENaC-tg / m3-ko	3	2,0	6,0	0,100
	ENaC-tg / m3-wt	3	5,0	15,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	4,0	12,0	1,000
	ENaC-wt / m3-ko	4	4,0	16,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	5,3	16,0	0,571
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,0	20,0	
	ENaC-tg / m3-wt	3	5,3	16,0	0,229
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,0	12,0	
	ENaC-tg / m3-wt	3	6,3	19,0	0,143
	ENaC-wt / m3-wt	5	3,4	17,0	
	ENaC-wt / m3-ko	4	5,1	20,5	0,905
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,9	24,5	
L1	ENaC-tg / m3-ko	5	3,6	18,0	0,111
	ENaC-tg / m3-wt	4	6,7	27,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	4,0	20,0	0,151
	ENaC-wt / m3-ko	5	7,0	35,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	5,4	27,0	0,730
	ENaC-wt / m3-wt	4	4,5	18,0	
	ENaC-tg / m3-wt	4	5,7	23,0	0,556
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,4	22,0	
	ENaC-tg / m3-wt	4	5,5	22,0	0,343
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,5	14,0	
	ENaC-wt / m3-ko	5	6,0	30,0	0,286
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,7	15,0	

ANHANG

Tabelle 63: Mann-Whitney-Test, Becherzellen pro mm, adulte Tiere; Lokalisationen L2 u. L3

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
L2	ENaC-tg / m3-ko	4	3,2	13,0	0,800
	ENaC-tg / m3-wt	2	4,0	8,0	
	ENaC-tg / m3-ko	4	6,0	24,0	0,114
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,0	12,0	
	ENaC-tg / m3-ko	4	4,2	17,0	0,267
	ENaC-wt / m3-wt	2	2,0	4,0	
	ENaC-tg / m3-wt	2	5,5	11,0	0,133
	ENaC-wt / m3-ko	4	2,5	10,0	
	ENaC-tg / m3-wt	2	3,5	7,0	0,333
	ENaC-wt / m3-wt	2	1,5	3,0	
L3	ENaC-wt / m3-ko	4	3,5	14,0	1,000
	ENaC-wt / m3-wt	2	3,5	7,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	4,0	12,0	0,700
	ENaC-tg / m3-wt	3	3,0	9,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	5,3	16,0	0,229
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,0	12,0	
	ENaC-tg / m3-ko	3	5,3	16,0	0,229
	ENaC-wt / m3-wt	4	3,0	12,0	
	ENaC-tg / m3-wt	3	4,3	13,0	0,857
	ENaC-wt / m3-ko	4	3,7	15,0	
ENaC-tg / m3-wt	3	4,3	13,0	0,857	
ENaC-wt / m3-wt	4	3,7	15,0		
ENaC-wt / m3-ko	4	4,6	18,5	0,886	
ENaC-wt / m3-wt	4	4,3	17,5		

ANHANG

Tabelle 64: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, gesamter Respirationstrakt

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
gesamt	ENaC-tg / m3-ko	324	531,2	172133,0	0,000
	ENaC-tg / m3-wt	626	446,6	279592,0	
	ENaC-tg / m3-ko	324	505,2	163689,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	423	273,5	115689,0	
	ENaC-tg / m3-wt	626	608,4	380875,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	423	401,5	169849,5	
	ENaC-tg / m3-wt	626	575,4	360221,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	415	438,8	182140,0	
	ENaC-tg / m3-ko	324	474,2	153652,5	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	415	288,6	119777,5	
	ENaC-wt / m3-ko	423	383,2	162132,5	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	415	456,4	189408,5	

ANHANG

Tabelle 65: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen T1 u. T2

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz	
T1	ENaC-tg / m3-ko	73	62,4	4556,0	0,097	
	ENaC-tg / m3-wt	61	73,6	4489,0		
	ENaC-tg / m3-ko	73	85,2	6225,0	0,000	
	ENaC-wt / m3-ko	49	26,0	1278,0		
	ENaC-tg / m3-ko	73	131,8	9627,0	0,000	
	ENaC-wt / m3-wt	10	58,9	6126,0		
	ENaC-tg / m3-wt	61	79,7	4866,0	0,000	
	ENaC-wt / m3-ko	49	25,2	1239,0		
	ENaC-tg / m3-wt	61	132,3	8070,5	0,000	
	ENaC-wt / m3-wt	10	54,1	5624,5		
	ENaC-wt / m3-ko	49	50,5	2474,5	0,000	
	ENaC-wt / m3-wt	10	89,5	9306,5		
	T2	ENaC-tg / m3-ko	53	66,9	3545,5	0,089
		ENaC-tg / m3-wt	96	79,5	7629,5	
		ENaC-tg / m3-ko	53	63,6	3371,0	0,000
		ENaC-wt / m3-ko	44	31,4	1382,0	
ENaC-tg / m3-ko		53	106,6	5651,5	0,000	
ENaC-wt / m3-wt		90	51,6	4644,5		
ENaC-tg / m3-wt		96	88,6	8506,0	0,000	
ENaC-wt / m3-ko		44	31,0	1364,0		
ENaC-tg / m3-wt		96	132,5	12721,5	0,000	
ENaC-wt / m3-wt		90	51,9	4669,5		
ENaC-wt / m3-ko		44	78,7	3462,5	0,020	
ENaC-wt / m3-wt		90	62,0	5582,5		

ANHANG

Tabelle 66: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen T3 u. L1

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T3	ENaC-tg / m3-ko	55	52,8	2902,5	0,061
	ENaC-tg / m3-wt	62	64,5	4000,5	
	ENaC-tg / m3-ko	55	69,7	3833,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	49	33,2	1626,5	
	ENaC-tg / m3-ko	55	61,6	3389,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	38	25,8	982,0	
	ENaC-tg / m3-wt	62	73,3	4542,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	49	34,2	1674,0	
	ENaC-tg / m3-wt	62	64,3	3985,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	38	28,0	1065,0	
L1	ENaC-wt / m3-ko	49	45,7	2241,0	0,467
	ENaC-wt / m3-wt	38	41,8	1587,0	
	ENaC-tg / m3-ko	82	166,7	13671,0	0,285
	ENaC-tg / m3-wt	23	154,2	35784,0	
	ENaC-tg / m3-ko	82	128,5	10533,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	11	72,7	7994,5	
	ENaC-tg / m3-ko	82	98,3	8063,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	71	52,4	3718,0	
	ENaC-tg / m3-wt	23	199,4	46264,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	11	112,6	12388,5	
ENaC-tg / m3-wt	23	170,5	39560,0	0,000	
ENaC-wt / m3-wt	71	91,5	6496,0		
ENaC-wt / m3-ko	11	91,5	10068,5	0,865	
ENaC-wt / m3-wt	71	90,2	6402,5		

ANHANG

Tabelle 67: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , juvenile Tiere, Lokalisationen L2 u. L3

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
L2	ENaC-tg / m3-ko	52	114,1	5932,0	0,001
	ENaC-tg / m3-wt	13	85,5	11459,0	
	ENaC-tg / m3-ko	52	140,1	7286,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	13	79,5	11050,0	
	ENaC-tg / m3-ko	52	82,2	4273,5	
	ENaC-wt / m3-wt	59	32,9	1942,5	0,000
	ENaC-tg / m3-wt	13	150,3	20136,0	0,006
	ENaC-wt / m3-ko	13	124,2	17265,0	
	ENaC-tg / m3-wt	13	107,0	14344,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	59	74,2	4377,0	
	ENaC-wt / m3-ko	13	104,6	14543,5	0,053
	ENaC-wt / m3-wt	59	87,4	5157,5	
L3	ENaC-tg / m3-ko	9	15,2	137,0	0,018
	ENaC-tg / m3-wt	41	27,8	1138,0	
	ENaC-tg / m3-ko	9	19,9	179,0	0,769
	ENaC-wt / m3-ko	32	21,3	682,0	
	ENaC-tg / m3-ko	9	27,4	247,0	0,466
	ENaC-wt / m3-wt	53	32,2	1706,0	
	ENaC-tg / m3-wt	41	43,5	1783,0	0,003
	ENaC-wt / m3-ko	32	28,7	918,0	
	ENaC-tg / m3-wt	41	57,1	2339,0	0,003
	ENaC-wt / m3-wt	53	40,1	2126,0	
	ENaC-wt / m3-ko	32	42,4	1357,5	0,867
	ENaC-wt / m3-wt	53	43,3	2297,5	

ANHANG

Tabelle 68: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, gesamter Respirationstrakt

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
gesamt	ENaC-tg / m3-ko	516	433,9	223933,0	0,000
	ENaC-tg / m3-wt	409	499,6	204342,0	
	ENaC-tg / m3-ko	516	497,4	256654,0	0,002
	ENaC-wt / m3-ko	427	441,3	188442,0	
	ENaC-tg / m3-wt	409	467,5	191198,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	427	371,6	158668,0	
	ENaC-tg / m3-wt	409	393,3	160871,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	326	336,2	109609,0	
	ENaC-tg / m3-ko	516	428,2	221226,5	0,278
	ENaC-wt / m3-wt	326	410,9	133676,5	
	ENaC-wt / m3-ko	427	366,4	156440,5	0,125
	ENaC-wt / m3-wt	326	390,9	127440,5	

ANHANG

Tabelle 69: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen T1 u. T2

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T1	ENaC-tg / m3-ko	10	83,7	8457,5	0,049
	ENaC-tg / m3-wt	79	99,2	7832,5	
	ENaC-tg / m3-ko	10	107,3	10840,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	80	70,4	5630,5	
	ENaC-tg / m3-ko	10	89,8	9078,0	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	52	51,9	2703,0	
	ENaC-tg / m3-wt	79	102,2	8069,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	80	58,1	4650,5	
	ENaC-tg / m3-wt	79	80,7	6372,5	0,000
	ENaC-wt / m3-wt	52	43,7	2273,5	
T2	ENaC-wt / m3-ko	80	69,3	5547,0	0,290
	ENaC-wt / m3-wt	52	62,1	3231,0	
	ENaC-tg / m3-ko	16	125,3	20437,5	0,121
	ENaC-tg / m3-wt	98	140,3	13753,5	
	ENaC-tg / m3-ko	16	120,3	19605,5	0,697
	ENaC-wt / m3-ko	79	124,0	9797,5	
	ENaC-tg / m3-ko	16	127,2	20740,5	0,940
	ENaC-wt / m3-wt	91	127,9	11644,5	
	ENaC-tg / m3-wt	98	91,9	9012,5	0,391
	ENaC-wt / m3-ko	79	85,3	6740,5	
ENaC-tg / m3-wt	98	99,6	9762,0	0,229	
ENaC-wt / m3-wt	91	90,0	8193,0		
ENaC-wt / m3-ko	79	87,5	6912,5	0,622	
ENaC-wt / m3-wt	91	83,8	7622,5		

ANHANG

Tabelle 70: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen T3 u. L1

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
T3	ENaC-tg / m3-ko	67	43,0	2882,0	0,000
	ENaC-tg / m3-wt	52	81,8	4258,0	
	ENaC-tg / m3-ko	67	102,5	6877,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	88	59,2	5212,5	
	ENaC-tg / m3-ko	67	49,7	3333,5	0,005
	ENaC-wt / m3-wt	46	67,5	3107,5	
	ENaC-tg / m3-wt	52	107,5	5593,5	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	88	48,6	4276,5	
	ENaC-tg / m3-wt	52	57,0	2966,5	0,005
	ENaC-wt / m3-wt	46	40,9	1884,5	
L1	ENaC-tg / m3-ko	90	77,7	6999,5	0,585
	ENaC-tg / m3-wt	68	81,7	5561,5	
	ENaC-tg / m3-ko	90	64,8	5832,0	0,000
	ENaC-wt / m3-ko	60	91,5	5493,0	
	ENaC-tg / m3-ko	90	66,1	5867,0	0,01
	ENaC-wt / m3-wt	53	83,5	4429,0	
	ENaC-tg / m3-wt	68	55,4	3771,5	0,003
	ENaC-wt / m3-ko	60	74,7	4484,5	
	ENaC-tg / m3-wt	68	57,6	3921,0	0,236
	ENaC-wt / m3-wt	53	65,2	3460,0	
ENaC-wt / m3-ko	60	62,3	3743,0	0,063	
ENaC-wt / m3-wt	53	50,9	2698,0		

ANHANG

Tabelle 71: Mann-Whitney-Test, Epithelhöhen in μm , adulte Tiere, Lokalisationen L2 u. L3

Lokalisation	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
L2	ENaC-tg / m3-ko	47	54,8	2578,0	0,747
	ENaC-tg / m3-wt	64	56,8	3638,0	
	ENaC-tg / m3-ko	47	54,5	2563,0	0,162
	ENaC-wt / m3-ko	72	63,5	4577,0	
	ENaC-tg / m3-ko	47	37,0	1739,0	0,568
	ENaC-wt / m3-wt	24	34,0	817,0	
	ENaC-tg / m3-wt	64	65,0	4160,5	0,330
	ENaC-wt / m3-ko	72	71,6	5155,5	
	ENaC-tg / m3-wt	64	46,0	2944,0	0,368
	ENaC-wt / m3-wt	24	40,50	972,0	
	ENaC-wt / m3-ko	72	51,3	3674,5	0,123
	ENaC-wt / m3-wt	24	40,9	981,5	
L3	ENaC-tg / m3-ko	48	50,4	2420,0	0,500
	ENaC-tg / m3-wt	48	46,5	2236,0	
	ENaC-tg / m3-ko	48	52,0	2497,5	0,214
	ENaC-wt / m3-ko	48	44,9	2158,5	
	ENaC-tg / m3-ko	48	62,3	2991,0	0,020
	ENaC-wt / m3-wt	60	48,2	2895,0	
	ENaC-tg / m3-wt	64	65,0	4160,5	0,761
	ENaC-wt / m3-ko	72	71,6	5155,5	
	ENaC-tg / m3-wt	48	59,8	2874,0	0,111
	ENaC-wt / m3-wt	60	50,2	3012,0	
	ENaC-wt / m3-ko	48	59,9	2877,5	0,106
	ENaC-wt / m3-wt	60	50,1	3008,5	

ANHANG

Tabelle 72: Mann-Whitney-Test, Körpergewicht der juvenilen Tiere

Körpergewicht	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
	ENaC-tg / m3-ko	5	7,5	37,5	0,74
	ENaC-tg / m3-wt	8	6,6	53,5	
	ENaC-tg / m3-ko	5	7,4	37,0	0,53
	ENaC-wt / m3-ko	7	5,8	41,0	
	ENaC-tg / m3-wt	8	9,1	73,0	0,336
	ENaC-wt / m3-ko	7	6,7	47,0	
	ENaC-tg / m3-wt	8	6,9	55,5	0,943
	ENaC-wt / m3-wt	5	7,1	35,5	
	ENaC-tg / m3-ko	5	6,0	30,0	0,69
	ENaC-wt / m3-wt	5	5,0	25,0	
	ENaC-wt / m3-ko	7	6,1	43,0	0,755
	ENaC-wt / m3-wt	5	7,0	35,0	

ANHANG

Tabelle 73: Mann-Whitney-Test, Körpergewicht der adulten Tiere

Körpergewicht	Genotyp	n	Mittlerer Rang	Rangsumme	Signifikanz
	ENaC-tg / m3-ko	5	3,7	15,0	0,286
	ENaC-tg / m3-wt	5	6,0	30,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	3,7	15,0	0,857
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,3	13,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	4,4	22,0	1,00
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,6	14,0	
	ENaC-tg / m3-wt	5	5,6	28,0	0,556
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,2	17,0	
	ENaC-tg / m3-ko	5	4,3	17,5	0,886
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,6	18,5	
	ENaC-wt / m3-ko	5	4,0	12,0	1,000
	ENaC-wt / m3-wt	5	4,0	16,0	

ANHANG

Tabelle 74: Belegungscode der Microarray-Analyse

	Proben
1	V 177/09
2	V 179/09
3	V 185/09
4	V 178/09
5	V 181/09
6	V 182/09
7	V 180/09
8	V 325/09
9	V 858/09
10	V 230/09
11	V 321/09
12	V 324/09

Danksagung

Die vorliegende Dissertation zum Thema

„Moduliert mCLCA3 den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?“

**Pathomorphologische, -morphometrische und molekularbiologische
Phänotypisierung eines neuen doppelt transgenen Lungen-Mausmodells
für Mukoviszidose**

entstand im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinen Dank **Herrn Prof. Dr. Achim Gruber** aussprechen für die Bereitstellung des Themas, die wertvollen Anregungen und Unterstützung in allen fachlichen Fragen und für die ausgezeichnete Betreuung während des Entstehungsprozesses der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Lars Mundhenk**, der mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und in besonderem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. med. Markus A. Mall** und Kollegen für die Bereitstellung der β -ENaC-transgenen Mäuse sowie für die freundliche Unterstützung bei methodischen Fragen und der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Frau **Jana Enders** und Frau **Monika Schaerig** für Ihre unterstützende Hilfe in allen Laborfragen, Herrn **Dieter Nehrig** und Herrn **Frank Weigner** für Ihre Unterstützung bei dem Transport der Mäuse sowie **Frau Hahn**, **Frau Harder** und **Frau Nehrig** für Ihre Hilfestellung bei der histologischen Aufarbeitung.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie danke ich für ihre Kollegialität, eine sehr nette Atmosphäre und so manches aufmunterndes Gespräch auf dem Gang.

ANHANG

Insbesondere danke ich meiner Kollegin, Zimmernachbarin und Freundin **Dr. Stephanie Plog** für ihre Unterstützung in allen beruflichen wie auch privaten Fragen- was hätte ich nur ohne dich gemacht? Auch Frau **Dr. Josephine Braun** möchte ich herzlich danken, die mir die Eingewöhnung im Institut so leicht gemacht hat und mich sehr herzlich in ihrem Büro aufgenommen hat.

Von Herzen möchte ich mich auch bei **Fabian** und **meiner Familie** bedanken, die mit ihrer vor allem seelischen und moralischen Unterstützung in großem Maße zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Und last but not least danke ich meinem kleinen Sohn **Fenno**, der mich mit seinem Lachen stets motiviert hat weiter zu machen..., auch wenn er lieber hüpfen wollte.

Kathleen Lange

Selbständigkeitserklärung

Ich, Kathleen Lange, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Moduliert mCLCA3 den pulmonalen Phänotyp der Mukoviszidose?

**Pathomorphologische, -morphometrische und molekularbiologische
Phänotypisierung eines neuen doppelt transgenen Lungen-Mausmodells für
Mukoviszidose“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Cammer, den 18. Oktober 2012

Kathleen Lange