

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

**Klonierung und Charakterisierung
des ersten equinen CLCA-Homologen, eCLCA1,
und erste Untersuchungen zu seiner Bedeutung
bei chronisch-obstruktiver Bronchiolitis des Pferdes**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von
Friederike Range, geb. Anton
Tierärztin aus Celle

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3191

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. med. vet. Achim D. Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Achim D. Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)

Zweiter Gutachter: PD Dr. med. vet. Bianca Carstanjen

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Karl Dietrich Weyrauch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, horse diseases, respiratory diseases, ion channels, chloride, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, gene expression, lasers, microdissection (MeSH)

Tag der Promotion: 18.04.2008

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: 978-3-86664-531-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

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 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin - 030-45494866
verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab publiziert:

Zeitschriften mit Peer-Review:

1. **Overexpression of eCLCA1 in Small Airways of Horses with Recurrent Airway Obstruction**

Anton, F., Leverkoehne, I., Mundhenk, L., Thoreson, W.B., Gruber, A.D.
Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 53 (8), 2005, 1011-1021

2. **eCLCA1 is a Soluble Secreted Glycoprotein Overexpressed due to Goblet Cell Hyperplasia and Metaplasia in Horses with Recurrent Airway Obstruction**

Range, F., Mundhenk, L., Gruber, A.D.
Veterinary Pathology, 44 (6), 2007, 901-911

Abstracts:

3. **Überexpression von eCLCA1 in den kleinen Atemwegen bei Pferden mit chronisch-obstruktiver Bronchiolitis**

Anton, F., Leverkoehne, I., Mundhenk, L., Thoreson, W.B., Gruber, A.D.
Pferdeheilkunde, 22 (1), 2006, 85-86

Kongressbeiträge:

Vorträge:

4. **Überexpression des equinen Calcium-aktivierten Chloridkanals eCLCA1 im Bronchialepithel von Pferden mit chronisch-obstruktiver Bronchiolitis (COB)**

Anton, F., Leverkoehne, I., Mundhenk, L., Thoreson, W.B., Gruber A.D.
48. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft
Wuppertal, 17.-18.05.2005

5. **Calcium-Activated Chloride Channels in Equine Recurrent Airway Obstruction (RAO): What is the role of eCLCA1?**

Range, F., Leverkoehne, I., Mundhenk, L., Thoreson, W.B., Gruber, A.D.
24. Jahrestagung der European Society of Veterinary Pathology
Edinburgh, 31.08.-02.09.2006

6. Welche Rolle spielen CLCA-Proteine bei der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis (COB) des Pferdes? Neue Erkenntnisse und neue Fragen

Mundhenk, L., Range, F. und Gruber, A.D.

50. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft

Fulda, 10.-11.03.2007

Posterpräsentation:

7. Cloning and Molecular Characterization of eCLCA1, a Putative Calcium-Activated Chloride Channel in the Equine Lung and its Significance in Equine Chronic Bronchiolitis

Range, F., Leverkoehne, I., Mundhenk, L., Thoreson, W.B., Gruber, A.D.

24. Symposium der Veterinary Comparative Respiratory Society

Jena, 08.-10.10.2006

Für Alex
und
meine Familie

Inhalt

ABKÜRZUNGEN.....	V
GLOSSAR AUSGEWÄHLTER MOLEKULARBIOLOGISCHER BEGRIFFE.....	VII
1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 ANIONENKANÄLE	3
2.1.1 Liganden-gesteuerte Chloridkanäle	3
2.1.2 CLC-Kanalfamilie	4
2.1.3 <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (CFTR)- Chloridkanal	5
2.1.4 <i>Volume Regulated Anion Channel</i> (VRAC)	6
2.1.5 Intrazelluläre Chloridkanäle (CLIC).....	7
2.1.6 <i>Outwardly Rectifying Chloride Channel</i> (ORCC)	7
2.1.7 Kalzium-aktivierte Chloridkanäle.....	8
2.2 DIE CLCA-GENFAMILIE	9
2.2.1 Struktur der CLCA-Proteine	11
2.2.2 Regulation der CLCA-assoziierten Chloridleitfähigkeit	12
2.2.3 Die CLCA-Familienmitglieder.....	13
2.2.3.1 CLCA-Vertreter des Menschen.....	13
2.2.3.2 CLCA-Vertreter der Maus	14
2.2.3.3 CLCA-Vertreter des Rindes	16
2.2.3.4 CLCA-Vertreter des Schweines	17
2.2.3.5 CLCA-Vertreter der Ratte	17
2.3 MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON CLCA-PROTEINEN.....	18
2.3.1 Chloridkanäle und zystische Fibrose	18
2.3.2 CLCA-Homologe und Asthma bronchiale	19
2.4 CHRONISCH-OBSTRUKTIVE BRONCHIOLITIS DER PFERDE.....	21
2.4.1 Begriffsbestimmung	21
2.4.2 Prävalenz	22
2.4.3 Klinik	22
2.4.4 Ätiologie	22
2.4.5 Pathogenese.....	23
2.4.6 Pathologisches Bild.....	24

3.	ARBEITSHYPOTHESE, ZIELE UND VERSUCHSPLANUNG	26
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	28
4.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND PROBENGEWINNUNG	28
4.2	FORMALINFIXIERUNG , PARAFFINEINBETTUNG UND HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN	29
4.3	PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	29
4.3.1	Allgemeine Handhabung.....	29
4.3.2	Isolierung der Gesamt-RNA.....	30
4.3.3	Aufreinigung der Gesamt-RNA	30
4.3.4	Gewinnung der poly-A ⁺ -RNA	31
4.3.5	Reverse Transkription.....	31
4.4	IDENTIFIZIERUNG EINER CLCA-CDNA-SEQUENZ BEIM PFERD.....	32
4.4.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
4.4.2	cDNA-Präzipitation.....	34
4.4.3	Gelextraktion und Aufreinigung des PCR-Produktes	35
4.4.4	RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)	35
4.5	KLONIERUNG DER ECLCA1-CDNA	39
4.6	QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION (qPCR) IM <i>REAL TIME</i> -MODUS.....	43
4.6.1	Referenzfaktor (<i>Housekeeping</i> -Gen) EF-1a	45
4.6.2	Herstellung der Mengenstandards	45
4.6.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) I: <i>TaqMan</i> -Sonden....	45
4.6.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) II: <i>SYBRGreen</i>	48
4.6.5	Quantifizierung der Genexpression	50
4.7	MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN	50
4.8	ERMITTLUNG DER ECLCA1-EXPRESSION PRO BECHERZELLE	50
4.8.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung für die Lasermikrodissektion.....	51
4.8.2	Färbung der Kryostatschnitte mittels PAS-Reaktion.....	51
4.8.3	Bestimmung der Becherzellzahl	52
4.8.4	Lasermikrodissektion und RNA-Isolation	52
4.8.5	Reverse Transkription mit Superskript III.....	52
4.8.6	Quantifizierung der eCLCA1 Expression pro Becherzelle	53
4.9	NACHWEIS DER ECLCA 1-MRNA MITTELS NORTHERN-BLOTING	54
4.10	NACHWEIS DES ECLCA1-PROTEINS MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE	56
4.10.1	Herstellung eines Proteinlysates aus Gesamtgewebsproben.....	56
4.10.2	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
4.10.3	Westernblotanalyse	58
4.11	ECLCA1-PROTEINNACHWEIS AM HISTOLOGISCHEN PRÄPARAT	59

4.11.1	Herstellung von Antikörpern gegen eCLCA1	59
4.11.2	Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex Methode (ABC-Methode)	60
5.	ERGEBNISSE	62
5.1	IDENTIFIZIERUNG EINES EQUINEN CLCA-HOMOLOGEN	62
5.2	SEQUENZIERUNG VON ECLCA1	63
5.3	PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG	66
5.4	BEURTEILUNG DER LUNGENGESUNDHEIT DER UNTERSUCHTEN PFERDE	67
5.5	ECLCA1-EXPRESSIONSMUSTER BEI GESUNDEN PFERDEN	68
5.5.1	Quantitative RT PCR: mRNA-Nachweis	68
5.5.2	Immunhistochemischer Nachweis des eCLCA1-Proteins im Gewebe ..	70
5.6	EXPRESSION VON ECLCA1 BEI PFERDEN MIT COB	76
5.6.1	Quantifizierung der eCLCA1-mRNA-Expressionshöhen	76
5.6.2	Immunhistochemischer Nachweis des eCLCA1-Proteins bei COB	77
5.6.3	Vergleich der eCLCA1-mRNA-Menge in COB-kranken und gesunden Pferdelungen.....	78
5.6.4	Vergleich der Größe des eCLCA1-Proteins in COB-kranken und gesunden Pferdelungen	79
5.6.5	Quantifizierung der Bercherzellhyperplasie und der eCLCA1- exprimierenden Zellen	80
5.6.6	Quantifizierung der eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle mittels Lasermikrodissektion und quantitativer RT-PCR.....	84
6.	DISKUSSION	86
6.1	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES ERSTEN EQUINEN CLCA-VERTRETERS ..	86
6.2	METHODISCHE ASPEKTE: MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER ERMITTLUNG DER MRNA- KOPIENZAHLEN NACH LASER-CAPTURE-MICRODISSECTION	93
7.	ZUSAMMENFASSUNG	95
8.	SUMMARY	97
9.	LITERATURVERZEICHNIS	99
10.	ANHANG	113
10.1	UNTERSUCHTE PFERDE.....	113
10.2	REAGENZIEREN, LÖSUNGEN UND PROTOKOLLE FÜR FORMALINFIXIERUNG, PARAFFINEINBETTUNG UND FÄRBUNGEN.....	116
10.3	REAGENZIEREN, LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHEN ARBEITEN	118

10.4 REAGENZIEN, LÖSUNGEN, PUFFER UND WASSER FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN ARBEITEN	119
10.4.1 Reagenzien und Kits für die RNA-Isolierung	119
10.4.2 Reagenzien und Protokolle für die Northern Blot Hybridisierung.....	120
10.4.3 Reagenzien und Protokolle für die Western Blot Analyse	122
10.5 ORGANISCHE LÖSUNGSMITTEL	124
10.6 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	124
10.7 ERGEBNISSE ZU DEN MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN (ROHDATEN).....	125
11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135
12. DANKSAGUNG	136

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
bidest.	Bidestillata (lat. für: doppelt destilliert)
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
C	Cytosin
CaCC	Kalzium-aktivierte Chloridkanäle (engl. <i>calcium-activated chloride channels</i> ,
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CF	Zystische Fibrose (engl. <i>cystic fibrosis</i>)
CLCA	Kalzium-aktivierte Chloridkanäle (engl. <i>chloride channel, calcium activated</i>)
COB	chronisch-obstruktive Bronchitis bzw. Bronchiolitis
d	Tag (engl. <i>day</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destillata (lat. für: einfach destilliert)
DIDS	Di-Isothiocyantostilben-Disulfonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1a	Elongationsfaktor 1a
engl.	englisch / aus dem Englischen
et al.	et alii (lat. für: und andere)
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluorescein
x g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
G	Guanin
ggr.	geringgradig

h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
hgr.	hochgradig
IL	Interleukin
LCM	Lasermikrodissektion (engl. <i>laser capture microdissection</i>)
lat.	lateinisch / aus dem Lateinischen
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mgr.	mittelgradig
n	Anzahl der Tiere / Untersuchung
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>),
p.a.	pro analysi (lat. für: zur Analyse)
PAS	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PKA	Proteinkinase A
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (lat. <i>potentia hydrogenii</i>)
RAO	wiederkehrende Atemwegsobstruktion (engl. <i>recurrent airway obstruction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	reverse T ranskription
RT-PCR	reverse T ranskription-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	reverse T ranskription- q uantitative Polymerase-Kettenre-aktion
sec.	Sekunde (engl. second)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SSC	Natriumchlorid / Natriumcitrat-Lösung (engl. <i>sodium chloride / sodium citrate</i>)
T	Thymin
TTBS	Tween-haltige, Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>tween containing tris-buffered saline</i>)
TAMRA	6-Carboxy- T etramethylrhodamin
T _m	Schmelzpunkt (engl. melting temperature)
™	Warenzeichen (engl. <i>trademark</i>)
VK	Variationskoeffizient
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

GLOSSAR AUSGEWÄHLTER MOLEKULARBIOLOGISCHER BEGRIFFE

- *5'-Ende*: Bereich einer Nukleinsäuresequenz, an dem die Transkription beginnt; bezeichnet nach der freien Bindungsstelle am 5'-Kohlenstoffatom des endständigen Nukleotids
- *3'-Ende*: Bereich einer Nukleinsäuresequenz, an dem die Transkription endet; bezeichnet nach der freien Bindungsstelle am 3'-Kohlenstoffatom des endständigen Nukleotids
- *Amplifikat, Amplikon*: Produkt einer DNA-Vervielfältigung durch PCR; wird von *Primern* begrenzt
- *Amplifikation*: Vermehrung; *hier*: Vervielfältigung von DNA
- *Denaturierung von Nukleinsäuren*: Trennung komplementärer Nukleinsäurestränge, z.B. durch Erhitzen
- *DNA-Polymerase* („*Taq-Polymerase*“, „*T.th.-Polymerase*“ etc.): Enzym, das zu einer vorliegenden DNA-Sequenz die Synthetisierung eines basenkomplementären DNA-Stranges anregt und reguliert
- *Extension*: Verlängerung eines *Primers* durch Anheftung von zu einer DNA-Vorlage komplementären Nukleotiden
- *Hybridisierung*: Anlagerung basenkomplementärer Nukleinsäuresequenzen
- *Konservierte Sequenzen*: Abschnitte weitgehend identischer Nukleinsäuresequenzen in unterschiedlichen Spezies oder unterschiedlichen Genen
- *mRNA* (engl. *messenger RNA*): Boten-RNA zur Übertragung der genetischen Information aus dem Zellkern in das Zytoplasma; dient dort als Vorlage für die Proteinbiosynthese
- *Not I-Linker*: an einen *Primer* angehängte Sequenz, die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Not I* beinhaltet

- *oligo-dT-Primer*: Oligonukleotid aus 16-20 Thyminen, bindet an Poly-A-Schwänze der mRNA, *Primer* für die reverse Transkription
- *Polymerase-Kettenreaktion, PCR* (engl. *polymerase chain reaction*): molekularbiologisches Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA
- *Primer, Oligonukleotidprimer*: synthetisches Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu einem definierten Abschnitt einer DNA- oder RNA-Vorlage ist und dessen 3'-Ende als Startpunkt für eine Polymerase oder reverse Transkriptase dient; die *Primer* begrenzen das Amplikon.
- *random primer, random hexamers*: Gemisch von Oligonukleotiden (meist Hexameren) mit unterschiedlichen, zufälligen Basenabfolgen als Startsequenzen für die reverse Transkription
- *reverse Transkription*: Umschreiben von RNA in DNA durch Synthese einer komplementären DNA (cDNA) mittels eines Enzyms (reverse Transkriptase)
- *RT-PCR*: reverse Transkription und anschließende Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung einer RNA-Sequenz in multiple DNA-Kopien
- *Sonde*: markierte DNA- oder RNA-Sequenz, die eine komplementäre Basenabfolge zu der gesuchten DNA- oder RNA-Sequenz aufweist
- *template*: RNA- oder DNA-Vorlage zur basenkomplementären Anlagerung einer Sonde oder eines *Primers*
- *Thermocycler*: Heizblock mit programmierbarem Temperaturverlauf
- *Threshold Cycle (Ct-Wert)*: gibt den errechneten PCR-Zyklus an, bei dem erste Amplifikate in der quantitativen PCR detektiert werden
- *time increment*: Verlängerung der Elongationszeit pro PCR-Zyklus, um die sinkende Aktivität der Polymerase und die sinkende Konzentration einzelner Reaktionskomponenten auszugleichen

- *Transkription*: Synthese einer Boten-RNA an einer einzelsträngigen DNA-Vorlage; Umschreiben der genetischen Information von DNA in Boten-RNA (mRNA)

1. Einleitung

Die CLCA-Genfamilie (engl. *chloride channels, calcium activated*) ist eine in den frühen 1990er Jahren entdeckte Genfamilie, deren Mitglieder eine Ca^{2+} -aktivierte Cl^- Leitfähigkeit zu vermitteln scheinen. Bis heute wurden 16 CLCA-Vertreter in fünf verschiedenen Säugetierarten identifiziert und teilweise charakterisiert.

CLCA-Proteine weisen eine Vielzahl gemeinsamer Merkmale auf. Während in älteren Studien noch für die meisten CLCA-Vertreter vier bis fünf Transmembrandomänen angenommen wurden, wird in neueren Studien die Existenz zweier strukturell unterschiedlicher Gruppen von CLCA-Proteinen postuliert. Die Proteine der einen Gruppe weisen eine C-terminale Transmembrandomäne auf. Bei den CLCA-Vertretern der anderen Gruppe, zu der auch hCLCA1 des Menschen und sein Pendant bei der Maus, mCLCA3, gehören, handelt es sich um sezernierte Proteine, für die sich keine Transmembrandomäne nachweisen ließ. Das Expressionsmuster von hCLCA1 und mCLCA3 weist eine enge Korrelation zu schleimproduzierenden Zellen des Respirations- und Intestinaltraktes, insbesondere den zytoplasmatischen Granula von Becherzellen, auf. Eine Funktion bei der Synthese, Kondensation oder Sekretion von Muzinen in Becherzellen wird daher postuliert.

Darüber hinaus konnte für beide Vertreter eine Beteiligung an der Pathogenese von Erkrankungen mit sekretorischer Dysfunktion, wie dem Asthma bronchiale, nachgewiesen werden. In einem murinen, immunologisch induzierten Modell für Asthma bronchiale wurde gezeigt, dass mCLCA3 eine Schlüsselfunktion bei der Becherzellendifferenzierung übernimmt. Eine Adenovirus-vermittelte *antisense*-Unterdrückung der mCLCA3-Expression führte zu einer wesentlichen Verminderung der Mukusproduktion und Verbesserung des Asthma-Phänotyps, wohingegen eine experimentell induzierte Überexpression zu einer verstärkten Mukusproduktion und Verschlechterung des Krankheitsbildes führte. Ähnliches konnte für hCLCA1 und mCLCA3 in einer *in vitro* Studie bestätigt werden, in der eine heterologe Überexpression der beiden Vertreter in einer humanen, mukoepidermoiden Zelllinie zu einer Becherzellmetaplasie und Muzinproduktion in der Zelllinie führte. Während hCLCA1 bei Menschen mit Asthma bronchiale deutlich überexprimiert ist, ist mCLCA3 im murinen Asthmodell ebenfalls stark vermehrt.

Die chronisch-obstruktive Bronchiolitis der Pferde (COB; *recurrent airway obstruction*, RAO), ist eine relativ weit verbreitete Atemwegserkrankung, welche vorwiegend im Stall gehaltene Pferde betrifft. Zentraler Pathomechanismus der COB ist eine Obstruktion der terminalen Atemwege, bedingt durch eine Hyperplasie der Bronchialschleimhaut mit Hyper- und Metaplasie der Becherzellen, einer hieraus resultierenden Dyskrinie und einer Bronchokonstriktion. Die COB der Pferde weist zahlreiche klinische, funktionelle und histologische Parallelen zum Asthma bronchiale des Menschen auf.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Studie besteht darin, dass ein equiner Orthologe zu hCLCA1 und mCLCA3 mit einer ähnlich bedeutenden Rolle bei der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis der Pferde existiert.

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion mit nachfolgender *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) einen equinen CLCA-Vertreter zu identifizieren und zu klonieren und anschließend das Expressionsmuster mittels quantitativer RT-PCR und nach Generierung spezifischer anti-eCLCA1-Antikörper, mittels Immunhistochemie in gesunden und in COB-kranken Pferden zu ermitteln. Die Expression von eCLCA1 in Becherzellen auf Einzelzellebene sollte ebenfalls mit Hilfe der quantitativen RT-PCR nach *laser capture microdissection* (LCM) vergleichend bei COB-kranken und gesunden Pferden bestimmt werden.

Die erworbenen Erkenntnisse sollen zu einem weiterreichenden Verständnis des Pathomechanismus bei COB, insbesondere der pathologischen Bedeutung von eCLCA1, beitragen. Wie bereits für mCLCA3 gezeigt, könnten CLCA-Proteine, hier eCLCA1, interessante Ziele für neue therapeutische Ansätze zur Modulation der Dyskrinie bei COB darstellen.

2. Literaturübersicht

2.1 Anionenkanäle

Anionenkanäle umfassen eine strukturell heterogene Gruppe von Kanalproteinen mit einem gemeinsamen funktionellen Charakteristikum, nämlich der Formung einer Pore innerhalb der Zellmembran, durch die Anionen passieren können. Da Chloridionen unter physiologischen Bedingungen mit dem geringsten energetischen Aufwand transportiert werden können, vermitteln die Kanäle am häufigsten Chloridionenströme und werden daher oft auch als Chloridkanäle bezeichnet. Die physiologische Funktion von Chloridkanälen besteht im Wesentlichen in Volumen- und pH-Regulation, transepitheliale Transport von Ionen und Wasser, Regulation der Zellerregbarkeit und Neutralisierung von Kationengradienten in interzellulären Kompartimenten (Jentsch et al., 2002).

Anionenkanäle können auf Grund ihrer unterschiedlichen Steuerungsmechanismen in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Liganden-gesteuerte Kanäle wie γ -Amino-Buttersäure- und Glyzin-Rezeptoren, die sich nach der Bindung eines extrazellulären Liganden öffnen, die spannungsgesteuerten Chloridkanäle (CLC) und der phosphorylierungs-regulierte *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) -Kanal sind im Hinblick auf ihre physiologische Funktion, Kanaleigenschaft und Molekularstruktur bereits ausführlich untersucht. Weit weniger gut charakterisiert sind hingegen die volumenregulierten Anionenkanäle (engl. *volume regulated anion channel*, VRAC), die Familie der putativen, intrazellulären Chloridkanäle (CLIC), die *outwardly rectifying chloride channel* (ORCC) und die Kalzium-aktivierten Chloridkanäle einschließlich der Bestrophine (Jentsch et al., 2002; Eggermont, 2004).

2.1.1 Liganden-gesteuerte Chloridkanäle

Im zentralen Nervensystem von Säugetieren wird eine schnelle, inhibitorische Erregungsleitung in erster Linie durch γ -Aminobutyrat (GABA) und Glyzin vermittelt. Die Bindung dieser Substanzen an ihren entsprechenden Rezeptor führt zum Öffnen des Anionenkanals. Bei adulten Individuen führt dies zu einem Cl^- -Einstrom, was zu einer Hyperpolarisation des Neurons und somit zu einer Inhibierung der neuronalen Aktivität führt. In der frühen Entwicklungsphase induzieren GABA und Glyzin eine starke Depolarisation durch einen Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer Freisetzung von Neurotransmittern führt (Owens et al., 1996; Reichling et al., 1994). Diese exzitatorische Aktion resultiert aus einem höheren Cl^- -Gleichgewichtspotential in undifferenzierten Neuronen. Im Laufe der Entwicklung nimmt die intrazelluläre Cl^- -Konzentration ab. Dies geschieht zum Teil durch Aufregulation des Kationen-Transporters KCC2 (Hubner et al., 2001; Rivera et al., 1999).

Dies invertiert die GABA- und Glyzin-vermittelten Anionenströme von erregend zu inhibierend (Wang et al., 1994). Die physiologische Relevanz der frühen Exzitation ist bis heute unklar, vermutet wird eine Funktion in der neuronalen Entwicklung. GABA- und Glyzin-Rezeptoren werden vielfältig therapeutisch genutzt. Hier sind z.B. Antiepileptika, Anxiolytika, Sedativa, Hypnotika, Muskelrelaxantien und Anaesthetika zu nennen (Jentsch et al., 2002). Zusammen mit den nikotinergen Azetylcholin- und ionotropen Serotonin-Rezeptoren gehören GABA- und Glyzin-Rezeptoren zu der Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, die folgende, gemeinsame Struktur aufweisen: fünf Untereinheiten formen eine Pore, wobei jede Untereinheit aus einer ca. 200 Aminosäuren (AS) großen, extrazellulären, aminoterminalen Domäne mit vier putativen Transmembrandomänen und einer kleinen, ebenfalls extrazellulären, karboxyterminalen Domäne besteht. Zwischen den Transmembrandomänen zwei und drei liegt als konservierte Struktur der so genannte *Cys loop*, eine zytosolische Schleife von variabler Länge (Jentsch et al., 2002). Je nach Zusammenstellung der vier verschiedenen α -Untereinheiten und einer β -Untereinheit werden Leitfähigkeitswerte von 12-112 pS gemessen, bei einer Permeabilität von $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ (Bormann et al., 1987; Jentsch et al., 2002). Die Komposition der Untereinheiten wechselt im Laufe der postnatalen Hirnentwicklung. Für die GABA Rezeptoren konnten auf Basis ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften drei verschiedene GABA-Rezeptortypen identifiziert werden. GABA_A und GABA_C sind Cl⁻-Kanäle und GABA_B ist ein G-Protein-bindender Rezeptor (Kaupmann et al., 1997). Die verschiedenen GABA-Rezeptoren weisen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu verschiedenen, pharmakologischen Stoffen wie z.B. Barbituraten, Benzodiazepinen oder auch zu Ethanol auf (Jentsch et al., 2002).

2.1.2 CLC-Kanalfamilie

Als erster Vertreter dieser Genfamilie wurde der spannungsabhängige CLC-0 aus dem elektrischen Organ des Marmor-Zitterrochens isoliert und kloniert (Jentsch et al., 1990). Die seitdem entdeckten insgesamt neun CLC-Vertreter lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in drei Gruppen einteilen. Bei einer Gruppe handelt es sich um Kanäle der Plasmamembran, bei den beiden anderen Gruppen vorwiegend um Kanäle der Intrazellularmembranen. CLC-Kanäle kommen sowohl in Prokaryonten und Eukaryonten als auch in Pflanzen vor. Die CLC-Kanäle der Säugetiere zeigen ein breites Expressions- und Funktionsspektrum. So sind sie zum Beispiel an der Regulation des pH-Wertes und des Volumens der Zelle, an der Stabilisierung des Plasmamembranpotentials oder auch der Azidifizierung von Endosomen, Lysosomen und synaptischen Vesikeln beteiligt (Piwon et al., 2000). CLC-Kanäle sind spannungsregulierte Cl⁻-Kanäle, wobei jedoch der pH-Wert und extrazelluläre Anionenkonzentrationen bei der Aktivierung einiger Vertreter ebenfalls eine

Rolle spielen (Chen und Miller, 1996). Dutzler und Mitarbeiter (2002) konnten mittels Röntgenstrahlen die kristalline Struktur bakterieller CLC-Vertreter, des StCLC aus *Salmonella typhimurium* und des EcCLC aus *Escherichia coli*, analysieren und das zuvor vermutete Zwei-Kanal-Modell (Miller, 1982) bestätigen. Demnach besteht das bakterielle CLC-Protein aus 18 Helices, von denen die meisten die Membran nicht vollständig durchkreuzen und zudem nicht senkrecht zu dieser liegen. Aufgrund dieses komplizierten Aufbaus ergaben die klassischen, biochemischen Topologieanalysen mittels Glykosylierungs-Scan und Protease-Protektionsassay für das zuvor vermutete, aus 13 Transmembrandomänen bestehende Modell widersprüchliche Ergebnisse (Schmidt-Rose und Jentsch, 1997). Die beiden sanduhrförmigen Kanalporen werden durch je eine Untereinheit gebildet. Als möglicher Schließungsmechanismus wird ein Glutamatrest angenommen, der sich in der Nähe der Cl⁻-Bindungsstelle in der Pore befindet und durch hohe Chloridkonzentrationen verdrängt wird (Dutzler et al., 2002).

Eine Besonderheit im Aufbau weisen die Mitglieder CLC-Ka und CLC-Kb auf. Sie benötigen für ihre Funktion als Chloridkanal eine weitere β -Untereinheit, das Barttin. Aufgrund ihres vielfältigen Expressions- und Funktionsspektrums haben Defekte der CLC- Cl⁻-Kanäle sehr unterschiedliche Erkrankungen zur Folge. So führt z.B. eine Mutation der CLC-Ka- und CLC-Kb-Kanäle zu Taubheit und dem mit Hypotonie, Hyperkalziurie und hypokalämischer Alkalose einhergehenden Bartter's Syndrom. Ein Defekt des ausschließlich im Skelettmuskel zu findenden CLC-1 führt zu der Becker- und Thomsen-Myotonie des Menschen und verursacht den Phänotyp bei dem myotonischen Mausstamm ADR (engl. *arrested development of righting response*; Jentsch et al., 2002).

2.1.3 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Chloridkanal

Der erste Anionenkanal, der durch positionale Klonierung identifiziert werden konnte, ist der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Chloridkanal (Riordan et al., 1989). Er gehört zu der Familie der ATPase-Transporter oder ATP *binding cassette* (ABC)-Transporter und ist ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes, integrales Membranprotein (Rommens et al., 1989). Der CFTR-Kanal ist in der apikalen Membran vieler verschiedener Epithelien exprimiert, besonders aber im Darm, in den Luftwegen, in sekretorischen Drüsen, in den Gallengängen und im Nebenhoden. Im Herzmuskel konnte zudem eine alternative Spaltungsform gefunden werden (Horowitz et al., 1993).

Das CFTR-Protein besitzt zwölf Transmembrandomänen, von denen jeweils sechs als Tandem-Wiederholungssequenz angeordnet sind. Zu jeder Tandemsequenz gehört eine intrazelluläre Nukleotid-bindende Domäne (NBF-Domäne). Zwischen den beiden Tandem-

sequenzen liegt eine intrazelluläre, regulatorische Domäne, die so genannte R-Domäne mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen (Riordan et al., 1989). Der Leitwert des CFTR-Kanals liegt zwischen 6 und 10 pS (Berger et al., 1991) bei einer Anionenpermeabilität von $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson et al., 1991). Er lässt sich experimentell durch Diphenylamin-2-Carboxylsäure (DPC) hemmen, nicht jedoch durch die als Anionenkanalblocker bekannte Di-Isothiocyanatostilben-Disulfonsäure (DIDS; Cliff et al., 1992).

An der Regulation des CFTR-Kanals sind verschiedene Proteine beteiligt. Bei der Aktivierung des Kanals spielen vor allem Phosphorylierungen in der R-Domäne durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) eine Rolle (Anderson et al., 1991). Die durch die Phosphorylierungen bedingte negative Ladung der R-Domäne ist vermutlich der Auslöser für eine Konformitätsänderung der Kanalpore, welche zur Öffnung beiträgt (Rich et al., 1993). Für die Öffnung der Pore ist jedoch die Anwesenheit hydrolysierbarer Nukleotidtriphosphate wie ATP in mikromolaren Konzentrationen essentiell (Anderson et al., 1991). Der exakte Mechanismus ist allerdings noch unklar (Jentsch et al., 2002). Gehemmt wird der CFTR-Kanal unter anderem durch eine erhöhte ADP-Konzentration, Dephosphorylasen und SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*; Cormet-Boyaka et al., 2002).

Neben der Funktion als Chloridkanal ist der CFTR-Kanal auch an der Regulation anderer Membrankanäle beteiligt. Hier sind vor allem der *outwardly rectifying Cl channel* (ORCC) und der epitheliale Na^+ Kanal zu nennen (zusammengefasst von Jentsch et al., 2002).

2.1.4 Volume Regulated Anion Channel (VRAC)

Der VRAC-Kanal zeigt ein breites Expressions- und Funktionsspektrum. Er ist in nahezu allen Zellen zu finden und ist beispielsweise am Zellwachstum, an der Zellteilung und Apoptose und an der Anpassung an Osmolaritätsänderungen im Extrazellularraum beteiligt. Er weist eine Ionenselektivität von $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ auf (zusammengefasst von Jentsch et al., 2002). Der Regulationsmechanismus des Kanals ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise spielen Änderungen der Ionenkonzentration und eine Tyrosin-Phosphorylierung (Lepplé-Wienhues et al., 1998; Voets et al., 1998), das an der Zytoskelettorganisation beteiligte Protein RhoA (Nilius et al., 2000) und das Major-Protein Caveolin-1 (Trouet et al., 1999) eine Rolle. Zudem scheint für die Zellvolumen-induzierte VRAC-Aktivierung ATP notwendig zu sein (Jackson et al., 1994). Die Molekularstruktur des VRAC-Proteins ist bis heute unbekannt (Shibata et al., 2005). Als mögliche, morphologische Kandidaten wurden bisher das *multi-drug resistance protein* (Mdr) oder P-Glykoprotein (Valverde et al., 1992), das pI_{Cl^-} -Protein (Krapivinsky et al., 1994) und die CLC-Vertreter 2 und 3 (Duan et al., 1997; Furukawa et al., 1998) diskutiert.

2.1.5 Intrazelluläre Chloridkanäle (CLIC)

Mit dem Ziel neue Chloridkanäle zu identifizieren, isolierten Landry und Mitarbeiter (1989) mehrere Proteine aus Membranfraktionen der Rinderniere, welche an den Chloridkanalblocker Indanyloxyact Säure banden. Eines dieser Proteine, das p64-Protein, vermittelt eine endogene Chloridionenleitfähigkeit (Redhead et al., 1992). Nach der Klonierung und Transfektion des offenen Leserahmens (ORF) von p64 in Oozyten von *Xenopus laevis* konnte das Protein in mikrosomalen Membranen lokalisiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass p64 einer neuen Genfamilie putativer, intrazellulärer Chloridkanäle (CLIC) angehört (Landry et al., 1993). Nach der Klonierung des p64 wurden zahlreiche weitere, eng verwandte Homologe in verschiedenen Säugetieren identifiziert. Das Expressionsmuster ist sehr vielfältig und reicht von Herz und Niere bis zur Lunge und dem Skelettmuskel (zusammengefasst von Jentsch et al., 2002). Das CLIC-Protein wurde in verschiedenen Zellkompartimenten einschließlich des Zellkerns identifiziert (Qian et al., 1999). Gemeinsames Merkmal aller CLIC-Mitglieder ist eine hochkonservierte, karboxyterminale Region von ca. 250 Aminosäuren. Interessanterweise besitzen die CLIC-Proteine nur eine Transmembrandomäne, was sehr ungewöhnlich für die Formung einer Kanalpore ist (Jentsch et al., 2002).

2.1.6 Outwardly Rectifying Chloride Channel (ORCC)

Wie der Name besagt, vermittelt der ORCC einen auswärts gerichteten Ionenstrom. Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass der ORCC in verschiedenen Zellen vorkommt, u.a. in humanen und bovinen Zellen der Atemwege, in den Epithelzellen des Kolons und der Ausführungsgänge des Pankreas, in Schweißdrüsenzellen und in Lymphozyten (Frizell et al., 1986; Gray et al., 1989b; Halm et al., 1988; Hwang et al., 1989; Jovov et al., 1995). Bei einer Ionenselektivität von $I^- > Cl^-$ werden recht hohe Leitwerte von 30 bis 70 pS erreicht (Gabriel et al., 1993). Der ORCC ist durch DIDS hemmbar und wird durch extrazelluläres ATP reguliert (Schwiebert et al., 1995). Der CFTR-Kanal scheint eine regulatorische, hemmende Wirkung auf diese ATP-abhängige Aktivierung auszuüben (Schwiebert et al., 1995). Die Funktion des ORCC besteht vermutlich in der Zellvolumenregulation (Guggino, 1994). Des Weiteren wird eine mögliche Beteiligung als modulierender Faktor bei Zystischer Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) postuliert (Anderson et al., 1991; Gray et al., 1989b; Wagner et al., 1991; Willumsen und Boucher, 1989). Die molekulare Identität des ORCC ist bis heute nicht bekannt.

2.1.7 Kalzium-aktivierte Chloridkanäle

Kalzium-aktivierte Chloridkanäle (engl. *calcium-activated chloride channels*, CaCC) sind elektrophysiologisch in vielen verschiedenen Zelltypen und Spezies identifiziert worden und weisen folgende, gemeinsame Merkmale auf: 1. eine Aktivierung durch zytosolisches Ca^{2+} in Konzentrationen von etwa 0,2 - 50 μM , 2. eine Anionenselektivität von $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$, 3. eine Generierung auswärts gerichteter Chloridströme und 4. eine experimentelle Hemmung durch 5-Nitro-2,3-Phenylpropylaminobenzoesäure (NPPB) und Niflumizin (engl. *niflumic acid*, NFA; Hartzell et al., 2005) nicht aber durch Dithiotreitol (DTT; Eggermont, 2004). Sie sind an vielen unterschiedlichen physiologischen Funktionen wie beispielsweise an der Regulierung der kardialen und neuronalen Erregbarkeit, der Funktion glatter Muskelfasern und der Flüssigkeitssekretion in exokrinen Drüsen sowie im Atmungs- und Intestinaltrakt beteiligt (Hartzell et al., 2005). In *Xenopus laevis*-Oozyten beispielsweise generieren sie zur Verhinderung einer Polyspermie ein so genanntes Fertilisationspotential (Machaca und Haun, 2002). Des Weiteren wurden sie in olfaktorischen Rezeptorneuronen von Fröschen (Kleene und Gesteland, 1991), Wassermolchen (Kurahashi und Yau, 1994), Ratten (Lowe und Gold, 1993), Salamandern (Firestein und Shepherd, 1995), *mud puppies* (Furchenmolch; Delay et al., 1997) und Fischen (Sato und Suzuki, 2000) nachgewiesen. Auch in der Retina (Barnes, 1994; Barnes und Hille, 1989; Maricq und Korenbrot, 1988) und in Geschmacksrezeptoren (Herness und Sun, 1999; McBride und Roper, 1991) von Säugetieren und Amphibien konnten CaCC nachgewiesen werden. Die molekularen Identitäten der bislang nur elektrophysiologisch beschriebenen CaCC sind noch nicht identifiziert. Sowohl Bestrophine als auch die CLCA-Genfamilie könnten möglicherweise die molekulare Grundlage zumindest für einen Teil der gemessenen Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Ströme darstellen.

Bei den Bestrophinen handelt es sich um eine relativ neu entdeckte Kanalfamilie, die zu den RFP-Domänenproteinen gehört (Stohr et al., 2002). Als Produkt des Vitelliformen Maculadystrophie-Gens (VMD-Gen; Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998) sind sie an der Pathogenese der auch als Morbus Best bezeichneten VMD des Menschen beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des retinalen Pigmentepithels, welche mit Verlust der Cl^- -Leitfähigkeit in der Retina und zunehmendem Sehverlust einhergeht. Bestrophine sind in unterschiedlichen Spezies, bei Säugetieren und Invertebraten, hochkonserviert (zusammengefasst von Strauss und Rosenthal, 2005) und sind integrale Proteine der Zellmembran (Marmorstein et al., 2002; Qu et al., 2003; Tsunenari et al., 2003). Derzeit existieren zwei Modelle für die Transmembrantopologie. Eines geht von vier Transmembrandomänen aus (Tsunenari et al., 2003), ein anderes von sechs (Qu et al., 2003). In transfizierten *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen konnte für Bestrophine des Menschen, der Fruchtfliege und des Fadenwurms ein Ca^{2+} -aktivierbarer Cl^- -Strom durch

eine Kalziumionenkonzentration von 210 nM mit einer $I^- > Br^- > Cl^-$ Selektivität erzeugt werden (Qu et al., 2003). Bestrophine sind die ersten Anionenkanäle, für die eine Aktivierung bei physiologischen Kalziumkonzentrationen gezeigt werden konnte. Die Leitfähigkeit der in HEK 293-exprimierten Bestrophine ließ sich durch DIDS, 2-Aminoethylmethanthiosulfonat (MTSEA) und 2-Trimethylammonio-Ethylmethanthiosulfonat (MTSET) hemmen (Sun et al., 2002). Für den Menschen wurden vier verschiedene Mitglieder beschrieben. Während Bestrophin 1 mittels RT-PCR ausschließlich im retinalen Pigmentepithel nachgewiesen wurde, kommt Bestrophin 2 zusätzlich im Kolon vor. Für Bestrophin 3 konnte ein starkes Signal im Kolon und schwächere im fetalen Gehirn, Rückenmark, in der Retina, Lunge, Trachea, in den Hoden und in der Plazenta erzeugt werden. Bestrophin 4 war am stärksten im Skelettmuskel vertreten, schwächere Signale ergaben sich im Gehirn, Rückenmark, Knochenmark, in der Retina, im Thymus und in den Hoden (Stohr et al., 2002). Daten zu den exprimierenden Zelltypen liegen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor.

2.2 Die CLCA-Genfamilie

Die CLCA-Genfamilie (engl. *chloride channel, calcium activated*) ist eine relativ neu entdeckte Genfamilie, deren Mitglieder eine Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Leitfähigkeit zu vermitteln scheinen. Die ersten beiden Vertreter wurden in den frühen 1990er Jahren unabhängig von einander durch zwei verschiedene Arbeitsgruppen entdeckt. Die Arbeitsgruppe um Ran und Benos (1991; 1992) isolierte aus der Trachea eines Rindes ein 38 kDa großes Protein, den *bovine tracheal calcium-activated chloride channel*, bCaCC alias bCLCA1. Dieses Protein zeigte nach Integration in Liposomen eine DIDS-sensitive, Ca^{2+} -aktivierbare Cl^- -Leitfähigkeit. Cunningham und Mitarbeiter (1995) ermittelten die dazugehörige cDNA-Sequenz. Ein von der Arbeitsgruppe um Zhu (1991) in der Wand großer Lungengefäße eines Rindes nachgewiesenes Adhäsionsmolekül (engl. *lung endothelial cell adhesion molecule*, Lu-ECAM-1) wurde erst sechs Jahre später, nach der Veröffentlichung der cDNA-Sequenz, in Verbindung zu bCaCC gebracht. Die hohe Sequenzhomologie der beiden Proteine von 92% auf cDNA- und 88% auf Aminosäureebene deutete auf die Existenz einer neuen, unbekanntenen Genfamilie hin (Elble et al., 1997). Bis heute wurden 16 CLCA-Vertreter in fünf verschiedenen Säugetierspezies identifiziert und teilweise charakterisiert.

An der Erforschung der CLCA-Genfamilie waren verschiedene Arbeitsgruppen mit gänzlich unterschiedlichen Forschungsschwerpunkten beteiligt. So wurden die ersten CLCA-Vertreter mit sehr unterschiedlichen Funktionen in Verbindung gebracht. Dies hatte eine uneinheitliche Nomenklatur zur Folge, wie am Beispiel der bereits erwähnten CLCA-Vertreter bCaCC und Lu-ECAM-1 deutlich wird. Um die Namensgebung zu vereinheitlichen, wurde eine systemati-

sierte Nomenklatur vorgeschlagen (Gruber et al., 2000), nach der die jeweilige Spezies mit kleinen Buchstaben abgekürzt vorangestellt wird: h für human (Mensch), m für murin (Maus), b für bovin (Rind), p für porzin (Schwein) und r für rattus (Ratte). Abweichend von der Nomenklatur sind die zwei von einer japanischen Arbeitsgruppe identifizierten CLCA-Vertreter aus dem Gehirn der Ratte mit rb für englisch *rat brain* bezeichnet (Jeong et al., 2005). Als Familienname einigte man sich auf „CLCA“. Entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung sollten die verschiedenen Homologen einer Spezies durchnummeriert werden. In Tabelle 1 werden die bis dato bekannten CLCA-Familienmitglieder mit ihrer originalen und angepassten Nomenklatur vorgestellt.

Tabelle 1: Bislang bekannte, klonierte CLCA-Familienmitglieder und ihre vereinheitlichte Nomenklatur (modifiziert nach Gruber et al., 2000)

Originale Nomenklatur	Angepasste Nomenklatur	Erstveröffentlichung	Genbank Nr.
bCaCC	bCLCA1	(Cunningham et al., 1995)	U36455
Lu-ECAM-1	bCLCA2	(Elble et al., 1997)	AF001261
mCaCC	mCLCA1	(Gandhi et al., 1998) (Romio et al., 1999)	AF047838 AF052746
mCaCC2	mCLCA2	(Lee et al., 1999)	AF10501
Gob-5	mCLCA3	(Komiya et al., 1999)	AB016592
mCLCA4	mCLCA4	(Elble et al., 2002)	AY00827
mCLCA5	mCLCA5	(Evans et al., 2004)	NM178697
mCLCA6	mCLCA6	(Evans et al., 2004)	NM207208
hCaCC-1	hCLCA1	(Gruber et al., 1998a) (Agnel et al., 1999)	AF039400 AF039401 AF127035
hCaCC-3	hCLCA2	(Gruber et al., 1999c) (Agnel et al., 1999)	AF043977 AF127980
hCLCA3	hCLCA3	(Gruber und Pauli, 1999a)	AF043976
hCaCC-2	hCLCA4	(Agnel et al., 1999)	AF12706
pCLCA1	pCLCA1	(Gaspar et al., 2000)	AF095584
rCLCA	rCLCA1	(Thevenod et al., 2003) (Yamazaki et al., 2005)	AF077303 AB119249
rbCLCA	rbCLCA1	(Jeong et al., 2005)	AB212889
rbCLCA2	rbCLCA2	(Yoon et al., 2006)	NM001077356.1

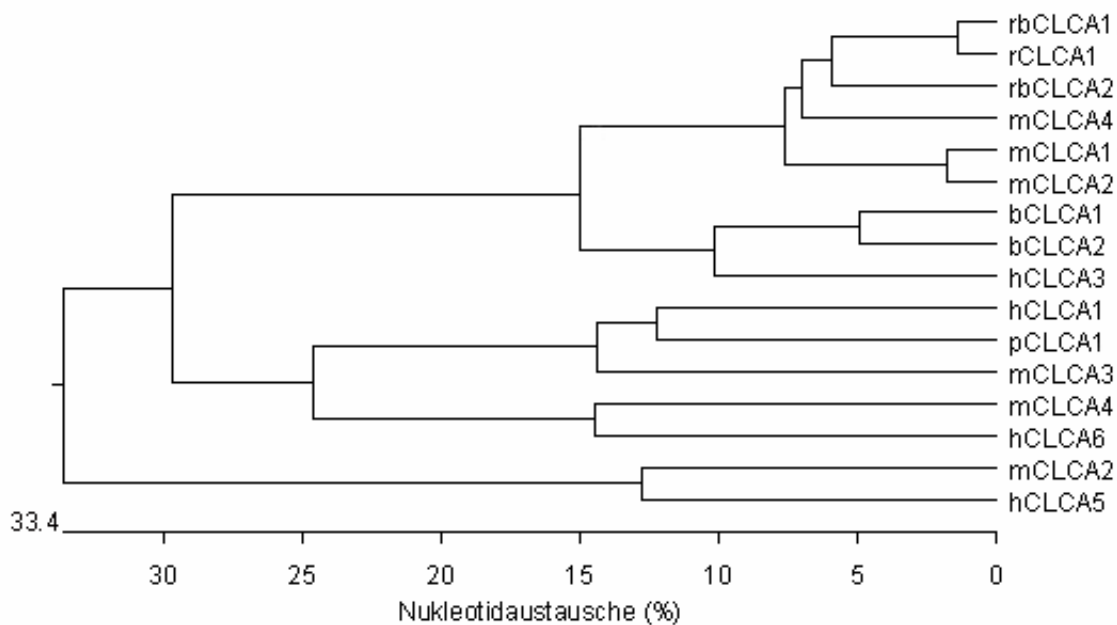


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum aller derzeit bekannten Mitglieder der CLCA-Genfamilie (cDNA-Sequenzen; Clustal V Methode; DNASTAR Lasergene 7 Software; GATC Biotech, Konstanz). Die vorangestellten Minuskeln bezeichnen die Spezies (h für human, Mensch; m für murin, Maus; b für bovin, Rind; p für porzin, Schwein; r für rattus, Ratte und abweichend von der vereinheitlichten Nomenklatur rb für *rat brain*, Ratte, Gehirn) und die Zahl die Reihenfolge der Entdeckung.

2.2.1 Struktur der CLCA-Proteine

Die CLCA-Proteine weisen eine Vielzahl gemeinsamer Merkmale auf. Während in älteren Studien noch für die meisten CLCA-Vertreter vier und für hCLCA2 fünf Transmembrandomänen angenommen wurden (zusammengefasst von Gruber et al., 2000), kamen neue Arbeiten zu folgendem Ergebnis. Basierend auf den Erkenntnissen von Elble und Mitarbeitern (2006) und Gibson und Mitarbeitern (2005) existieren offenbar zwei strukturell unterschiedliche Gruppen von CLCA-Proteinen. Die eine Gruppe, zu der beispielsweise hCLCA2 gehört (Elble et al., 2006), weist eine Transmembrandomäne am Ende des C-Terminus auf. Bei den CLCA-Vertretern der anderen Gruppe, wie beispielsweise mCLCA3 und hCLCA1, handelt es sich um sezernierte Proteine (Gibson et al., 2005; Mundhenk et al., 2006), für die sich keine Transmembrandomäne nachweisen ließ.

Um Aminosäure 200 herum, im extrazellulär gelegenen Aminoterminus, liegt eine konservierte Multicystein-Erkennungssequenz, welche an eine Zinkfingerstruktur erinnert: C-x₁₂-C-x₄-C-x₄-C-x₁₂-C (C steht für Cystein und x für eine beliebige Aminosäure; Elble et al., 1997).

Der humane Vertreter hCLCA2 weicht geringgradig von diesem Muster ab: C-x₉-C-x₄-C-x₄-C-x₉-C. Die funktionelle Signifikanz dieser Erkennungssequenz ist nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird, dass die sich bildenden Disulfidbindungen für die Struktur und die Stabilität des Proteins von Bedeutung sind (Surprenant et al., 1995). Vor dieser Multicysteinensequenz befindet sich eine weitere, konservierte Sequenz. Sie besteht aus den aufeinander folgenden Aminosäuren Histidin, Glutaminsäure, zwei beliebigen Aminosäuren und wieder Histidin und ist vermutlich an der Interaktion mit Metallionen, vor allem Zink, beteiligt. Es wird eine Funktion als Zink-Metalloproteinase postuliert (Pawlowski et al., 2006).

Eine weitere, wichtige Gemeinsamkeit der CLCA-Proteine ist eine Spaltung des 120 bis 130 kDa großen, glykosylierten Translationsproduktes in zwei, ebenfalls glykosylierte Spaltprodukte von etwa 80 bis 90 bzw. 30 bis 40 kDa (Elble et al., 1997; Gandhi et al., 1998; Gruber et al., 1998a; Gruber et al., 1999c).

Eine Bindungsstelle für β_4 -Integrin befindet sich bei den in Endothelien exprimierten Mitgliedern in der zweiten, extrazellulär gelegenen Domäne. Durch diese Bindungsstelle wird eine Zell-zu-Zell-Adhäsion vermittelt, welche an der Lungenmetastasierung maligner Mammatumoren beteiligt zu sein scheint (Abdel-Ghany et al., 2003). Zhu und Mitarbeiter konnten bereits 1992 zeigen, dass durch anti-CLCA-Antikörper die Tumorzellbindung an Endothelzellen deutlich inhibiert und somit die experimentelle Metastasierung signifikant reduziert wird (Zhu et al., 1992).

2.2.2 Regulation der CLCA-assoziierten Chloridleitfähigkeit

Elektrophysiologische Untersuchungen konnten für viele CLCA-Vertreter einen Ca^{2+} -abhängigen, auswärtsgerichteten Chloridionenstrom zeigen (zusammengefasst von Fuller und Benos, 2000). Die Regulation der CLCA-vermittelten Kanalaktivität ist bis heute unklar. Mögliche, mit der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der CLCA in Verbindung stehende Phosphorylierungsstellen befinden sich auf der zweiten, intrazellulären Schleife des Proteins. Konservierte Erkennungssequenzen für die Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), und möglicherweise auch für die Proteinkinase C (PKC) liegen bei den Aminosäuren 594 (Serin) und 596 (Threonin). Während die bovinen und murinen Vertreter bCLCA1, bCLCA2, mCLCA1, mCLCA2 und mCLCA4 beide Phosphorylierungsstellen aufweisen (Cunningham et al., 1995; Elble et al., 1997; Gandhi et al., 1998), findet sich bei mCLCA3 und pCLCA1 nur die serinassoziierte (Gaspar et al., 2000; Komiya et al., 1999). Den humanen Vertretern hCLCA1, hCLCA2 und hCLCA4 hingegen fehlen beide (Agnel et al., 1999; Gruber et al., 1998a). Fuller und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, dass der bCLCA1, inkorporiert in eine Doppellipidmembran, sich durch Kalzium alleine erst ab unphysiologisch hohen Konzentrationen von über 3 μM aktivieren ließ. Durch die Zugabe von CaMKII konnte bei Kalziumionen-

konzentrationen von 0,5 - 1,0 μM die Kanalaktivität deutlich gesteigert werden. Eine weitere Steigerung der Konzentration hingegen führte zu einer Blockierung des Kanals. Im Gegensatz zum CFTR- und ORCC-Kanal ließen sich weder der bCLCA1 (Fuller et al., 1994) noch der pCLCA1 (Loewen et al., 2002) durch PKA und ATP alleine aktivieren. Inhibieren ließen sich die experimentell erzeugten Chloridionenströme durch 300 μM DIDS, 10 μM Tamoxifen, 100 μM Niflumizin und im Gegensatz zu den CaCC-Vertretern außerdem durch 2 mM DTT (zusammengefasst von Gruber et al., 2000). Ein Inaktivierungsmechanismus, der auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte, wird durch Inositol-3,4,5,6-Tetrakisphosphat (IP_4) vermittelt. Dieses Polyphosphatidylinositol fällt nach cholinergem Stimulation vermehrt in der Zelle an. Ismailov und Mitarbeiter (1996) konnten zeigen, dass sich Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme in bCLCA1-haltigen Doppellipidmembranen bei Kalziumionenkonzentrationen von 1 μM durch IP_4 hemmen lassen. Bei niedrigen Kalziumionenkonzentrationen von etwa 30 nM hingegen führte IP_4 zu einer Aktivierung. Der Regulation der CLCA-Homologe scheint ein recht komplexer Mechanismus zugrunde zu liegen, an welchem zusätzlich zu der Kalziumkonzentration weitere Komponenten wie Spannung und Phosphorylierung beteiligt sein könnten (Angermann et al., 2006).

2.2.3 Die CLCA-Familienmitglieder

2.2.3.1 CLCA-Vertreter des Menschen

Die Arbeitsgruppe um Gruber (Gruber et al., 1998a; Gruber und Pauli, 1999a; Gruber und Pauli, 1999b) identifizierte mittels eines Homologiescreenings aus menschlichen cDNA- und genomischen Bibliotheken die ersten drei der vier CLCA-Vertreter des Menschen. Hierbei diente bCLCA2 als cDNA-Sonde. Agnel und Mitarbeiter (1999) nutzten bCLCA1 als Sonde und fanden so den hCLCA4.

Mittels Northern Blot Hybridisierung konnte das ca. 3,3 kb große mRNA-Signal von hCLCA1 ausschließlich in Dünn- und Dickdarm gefunden werden. Eine *in situ*-Hybridisierung zeigte starke Signale für hCLCA1 im Zytosol des Darmepithels, besonders in basalen Kryptepithel- und Becherzellen (Gruber et al., 1998a). Signifikant niedrigere Expressionsraten konnten im Magen, Uterus, Hoden und fetalem Milzgewebe durch eine *RNA dot blot*-Hybridisierung detektiert werden (Agnel et al., 1999). Informationen über den exprimierenden Zelltyp konnten hierbei nicht gewonnen werden. Hoshino und Mitarbeiter (2002) lokalisierten hCLCA1 mittels *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie in muzinproduzierenden Becherzellen des Bronchialepithels. Eine Transfektion von NCI H292 Zellen einer humanen, mukoepidermoiden Zelllinie mit hCLCA1, wie auch mit dem murinen Orthologen mCLCA3, führte zu einer vermehrten Schleimproduktion und einer Becherzellendifferenzierung. Diese

Ergebnisse deuten auf eine Rolle von hCLCA1 in der Mukusproduktion und Becherzellendifferenzierung hin. Die mRNA-Expression von hCLCA2 in der Lunge, Milchdrüse, Trachea (Gruber et al., 1999c) und in der Kornea (Itoh et al., 2000) konnte durch eine immunhistologische Untersuchung auf Proteinebene bestätigt werden (Connon et al., 2004). Darüber hinaus wurde hCLCA2 zusätzlich in der Haut, im Larynx, in der Vagina und im Ösophagus nachgewiesen. Connon und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass die Expression auf die Basalmembran von Basalzellen beschränkt war, was auf eine Funktion als Vermittler von Zell-Basalmembran-Adhäsionen hindeuten könnte. Die mittels Doppel-Immunhistochemie nachgewiesene enge Kolo-kalisation von hCLCA2 und β_4 -Integrin einerseits sowie hCLCA2 und Kollagen VII andererseits unterstützt diese These (Connon et al., 2005). Als eine weitere, mit der β_4 -Integrin-Bindungsstelle assoziierte Funktion wird für hCLCA2 eine Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen diskutiert (Abdel-Ghany et al., 2003). Andere Arbeiten deuten auf eine Funktion als Tumorsuppressorgen hin (Gruber und Pauli, 1999b).

Als eine Besonderheit innerhalb der CLCA-Proteine kodiert die hCLCA3-cDNA zwei kurze offene Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF), welche zusammen dem ersten Drittel der Polypeptidsequenz der übrigen Familienmitglieder entsprechen. Mittels RT-PCR konnte hCLCA3 in Milz, Lunge, Trachea, Milchdrüse und Thymus nachgewiesen werden. Von den beiden ORF wurde nur der erste in HEK 293 und CHO (engl. *chinese hamster ovary*) Zelllinien translatiert. Sowohl der durchgeführte Protease-Protektionsassay als auch der Nachweis des Proteins im Zellkulturüberstand deuten darauf hin, dass das Trunkat sezerniert wurde (Gruber und Pauli, 1999a). Die biologische Signifikanz von hCLCA3 ist noch unklar. Sowohl eine Funktion als Ligand oder Signalmolekül als auch als kompetitiver Inhibitor anderer Homologe ist denkbar. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Pseudogen handelt (Gruber et al., 2000).

Das mittels RNA *dot blot*-Hybridisierung ermittelte Expressionsspektrum von hCLCA4 ist sehr weit und umfasst den Digestions- und Urogenitaltrakt, die Trachea, Speichel- und Milchdrüsen sowie das zentrale Nervensystem. Angaben über das zelluläre Verteilungsmuster von hCLCA4 liegen nicht vor (Agnel et al., 1999).

2.2.3.2 CLCA-Vertreter der Maus

Bis heute wurden sechs CLCA-Familienmitglieder der Maus identifiziert. Der erste murine Vertreter, mCLCA1, wurde durch die Arbeitsgruppe um Gandhi (1998) mit Hilfe eines Homologiescreenings einer murinen Lungen-cDNA-Bibliothek identifiziert und anschließend kloniert. Die cDNA von bCLCA2 diente hierbei als Sonde. Erste Expressionsstudien mittels RT-PCR, Northern Blot und *in situ*-Hybridisierung deuteten auf ein sehr breites Expressions-

spektrum hin. mCLCA1 wurde in der Milchdrüse, in respiratorischen und intestinalen Epithelien, in submukosalen Drüsen der Trachea und der Bronchien, in Epithelzellen der Eileiter, des Endometriums, der Nebenhoden, der Nierentubuli, der Gallenbase und der Pankreasazini, in Keratinozyten der Haut und der Kornea, in der Milz und in Lymphknoten sowie in Spermatozyten zweiter Ordnung detektiert (Gruber et al., 1998b). Die Identifizierung der Sequenz von mCLCA2 zeigte eine Sequenzhomologie zu mCLCA1 von 97% auf cDNA- und 92% auf Proteinebene (Lee et al., 1999). Aufgrund der starken Ähnlichkeit der beiden Vertreter musste das für mCLCA1 beschriebene Expressionsmuster als Summensignal beider mRNA-Spezies angesehen werden. Eine quantitative PCR mit mCLCA1- und mCLCA2-diskriminierenden *taqMan*-Sonden ergab folgendes Expressionsmuster: Während in Leber, Aorta, Milz, Lymphknoten und Knochenmark, Nebennieren, Skelettmuskel, zahlreichen fetalen Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Stammhirn nahezu ausschließlich mCLCA1 exprimiert zu sein schien, konnten in mehreren Darmlokalisationen, Thymus, Samenblasendrüse, Nebenhoden, Milchdrüse und fetalem Gewebe an Tag 8,5 nach Konzeption überwiegend mCLCA2-Signale detektiert werden. In Jejunum, Magen, Speicheldrüse und Nieren hingegen waren die beiden Familienmitglieder etwa gleich stark vertreten, und in Geweben wie z.B. der Prostata konnte für keinen der beiden CLCA-Homologe ein Signal detektiert werden (Leverkoehne et al., 2002). Neben der bekannten Vermittlung von Chloridionenströmen wird für mCLCA2 angenommen, dass er Einfluss auf die Apoptoseregulation nimmt, und mCLCA1 und mCLCA2 werden als mögliche Tumorsuppressoren diskutiert (Elble und Pauli, 2001).

mCLCA3, alias gob-5, wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert. Erste Untersuchungen mittels *in situ*-Hybridisierungen zeigten eine Expression in Becherzellen von Dün- und Dickdarm und mittels Northern Blot Hybridisierungen in Magen, Uterus und Trachea (Komiya et al., 1999). Leverkoehne und Gruber (2002) konnten mittels Immunhistochemie und Immunelektronenmikroskopie das Verteilungsmuster von mCLCA3 auf Proteinebene bestätigen und genauer spezifizieren. Demnach befindet sich das mCLCA3-Protein in allen Becherzellen des Uterus, des Respirations- und des Intestinaltraktes mit der Besonderheit, dass die Becherzellen der Krypten des Darms im Gegensatz zu denen der Zotten nur im oberen Drittel ein positives Signal ergaben. Des Weiteren fand sich das mCLCA3-Protein in den Bronchial- und Trachealdrüsen, den muzinösen Zellen der Uterindrüsen sowie den Nebenzellen des Magens. Darüber hinaus konnte das mCLCA3-Protein mittels Immunelektronenmikroskopie in den Membranen der Muzingranula von Becherzellen lokalisiert werden. Die Expression in nahezu allen schleimproduzierenden Zellen deutet darauf hin, dass mCLCA3, wie auch sein humaner Homolog hCLCA1, bei der Synthese, Kondensation oder Sekretion von Muzinen beteiligt ist (Leverkoehne und Gruber, 2002). Darüber hinaus konnten Arbeiten von Nakanishi und Mitarbeitern (2001) und Zhou und Mitarbeitern (2001)

eine direkte Beeinflussung der Becherzellendifferenzierung und Schleimsynthese durch eine mCLCA3 Expression *in vitro* und *in vivo* zeigen, so dass eine Beteiligung bei der Pathogenese von Asthma bronchiale postuliert wird.

Elble und Mitarbeiter (2002) identifizierten mit Hilfe von degenerierten Primern in muriner Dickdarm-RNA den vierten CLCA-Vertreter der Maus. mCLCA4 wird im Intestinaltrakt, in Uterus, Lunge, Herz, Harnblase, Skelettmuskel und Aorta exprimiert. Eine anschließende *in situ*-Hybridisierung zeigte eine Expression in glatten Muskelzellen und in bestimmten epi- und endothelialen Geweben. Als Funktion des mCLCA4 wird die Vermittlung Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Ströme bei der Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen vermutet (Elble et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe um Evans (2004) identifizierte den fünften und sechsten murinen CLCA-Homologen. Während mCLCA5 bei einem relativ weiten Expressionsspektrum vor allem im Auge und in der Milz zu finden war, war mCLCA6 neben Auge, Leber und Milz vor allem in Darm und Magen exprimiert. Zudem konnte eine Splicevariante von mCLCA6, der das gesamte Exon 8 und Teile von Exon 10 fehlen, im Magen und im Darm identifiziert werden. Für alle drei Proteine konnte eine durch Nifluminsäure inhibierbare Ca²⁺-aktivierte Cl⁻-Leitfähigkeit gezeigt werden. Starke Sequenzhomologien deuten darauf hin, dass es sich bei mCLCA5 um den murinen Homologen zu hCLCA2 und bei mCLCA6 zu hCLCA4 handeln könnte (Ritzka et al., 2003). Eine Expression im ZNS konnte für mCLCA6 jedoch nicht nachgewiesen werden, was eine Besonderheit des hCLCA4 darstellt. mCLCA5 weist wie sein humaner Ortholog hCLCA2 eine vorhergesagte Bindungsstelle für β_4 -Integrin auf, was auf eine Funktion bei Tumormetastasierungen hinweisen könnte (Abdel-Ghany et al., 2003).

2.2.3.3 CLCA-Vertreter des Rindes

Beim Rind sind bis heute nur die beiden bereits erwähnten Vertreter bCLCA1 (alias bCaCC) und bCLCA2 (alias Lu-ECAM-1) bekannt. Eine RT-PCR Analyse für bCLCA1 zeigte eine ausschließliche Expression in der Trachea, während Lunge, Leber, Gehirn und Nierenpapille negativ waren (Cunningham et al., 1995). Elble und Mitarbeiter (1997) hingegen konnten mittels RT-PCR eine Expression in der Trachea und Lunge zeigen. Das bCLCA2-Protein konnte im Endothel der Aorta und Lungenvenen sowie in der Milz nachgewiesen werden (Elble et al., 1997). Wie auch mCLCA1, mCLCA5 und hCLCA2 weist bCLCA2 eine Bindungsstelle für β_4 -Integrin auf. Zhu und Mitarbeiter (1992) konnten zeigen, dass die Blockierung dieses Adhäsionsmoleküls die Metastasierung einer Mammakarzinomzelllinie in die Lunge von Mäusen nahezu vollständig verhinderte.

2.2.3.4 CLCA-Vertreter des Schweines

Gaspar und Mitarbeiter (2000) klonierten den bislang einzig bekannten CLCA-Vertreter des Schweines. Mit Hilfe der von Racette und Mitarbeitern (1996) zur Hemmung der Cl⁻-Leitfähigkeit in porzinen Dünndarmenterozyten generierten, monoklonalen Antikörper konnte pCLCA1 in einer porzinen cDNA-Bibliothek identifiziert werden. Eine Vergleichstudie mit den bekannten CLCA-Homologen ergab eine 78%ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit dem humanen hCLCA1, was auf eine ähnliche Funktion hindeuten könnte. RT-PCR Analysen und *in situ*-Hybridisierungen zeigten eine Expression von pCLCA1 im Trachealepithel und in den Trachealdrüsen, in der Ohrspeicheldrüse, in sublingualen und submandibulären Speicheldrüsen sowie im Dünndarm, wobei das Signalmuster im Mikrovillisaum mit einer Lokalisation in Becherzellen übereinstimmen könnte (Gaspar et al., 2000). Negativ für pCLCA1 hingegen waren Magen, Lunge, Pankreas, Herzmuskel sowie der becherzellreiche Dickdarm (Gaspar et al., 2000), was eher gegen eine funktionelle Übereinstimmung mit hCLCA1 spricht. Elektrophysiologische Untersuchungen in pCLCA1-transfizierten 3T3 Mausfibroblastenzellen (Loewen et al., 2002) deuten auf eine Funktion als Ca²⁺-aktivierbarer Chloridkanal hin. Weiterführende Untersuchungen in Kolonkarzinomzellen (Loewen et al., 2004) hingegen weisen eher auf eine Aktivierung endogener cAMP-aktivierter Chloridkanäle durch pCLCA1 hin als auf eine eigenständige Kanalfunktion. Interessanterweise ist pCLCA1 als einziger CLCA-Vertreter gegenüber DIDS und DTT nicht sensibel.

2.2.3.5 CLCA-Vertreter der Ratte

Bei einer Studie zur Funktion von Ionenkanälen in sekretorischen Vesikeln des Pankreas identifizierten Thevenod und Mitarbeiter (2003) mittels Primern, die an die Sequenz des mCLCA1 angelehnt waren, den ersten CLCA-Vertreter der Ratte. Sein Verhalten in elektrophysiologischen Untersuchungen glich dem der anderen CLCA-Vertreter. Des Weiteren deuteten die Ergebnisse einer immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit anti-bCLCA1 Antikörpern auf ein ähnliches Verteilungsmuster in den Azini des Pankreas wie das von mCLCA1 hin. Vollständig sequenziert wurde rCLCA1 von Yamazaki und Mitarbeitern (2005).

Die Arbeitsgruppe um Jeong (2005) konnte einen Vertreter der Ratte im Kleinhirn lokalisieren und bezeichnete diesen (entgegen der eingangs vorgestellten einheitlichen Nomenklatur) als rbCLCA1. Eine RT-PCR zeigte eine Expression in Groß- und Kleinhirn, Niere, Dünndarm und Magen, jedoch nicht in Herz, Dickdarm, Leber, Lunge und Milz. *Whole-cell-patch-clamp* Untersuchungen zeigten eine Niflumizin-sensitive, spannungsabhängige Chloridionenleitfähigkeit. Erst kürzlich gelang es Yoon und Mitarbeitern (2006), einen weiteren Vertreter (rbCLCA2) im Großhirn der Ratte mittels RT-PCR zu identifizieren und zu klonieren. Für das

905 Aminosäuren lange Polypeptid werden zwei Transmembrandomänen postuliert. rbCLCA2 zeigt eine 85%ige Sequenzhomologie zu rbCLCA1, auch die Expressionsmuster der beiden Homologen ähneln sich sehr.

2.3 Medizinische Bedeutung von CLCA-Proteinen

Für die CLCA-Vertreter wird eine Beteiligung bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen mit sekretorischer Dysfunktion diskutiert. Hierzu zählen unter anderem die Zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) des Menschen und das humane Asthma bronchiale sowie dessen murines Modell (Gruber et al., 2002).

2.3.1 Chloridkanäle und zystische Fibrose

Bei der zystischen Fibrose, synonym als Mukoviszidose (lat. *mucus* „Schleim“ und *viscidus* „zäh, klebrig“) bezeichnet, handelt es sich um die häufigste, letale, genetisch bedingte, autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung des Menschen (Riordan et al., 1989). Eine Mutation des *cfr*-Gens bei Erkrankten führt zu einer Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals in bestimmten, exokrinen Epithelien. Dies führt zu einer gestörten Chloridionenleitfähigkeit mit der Folge einer veränderten Zusammensetzung der Sekrete exokriner Drüsen und Funktionsstörungen unterschiedlicher Art in den betroffenen Organen. So kommt es in der Lunge zu einer Obstruktion von Bronchiolen durch zähen, klebrigen Schleim, was sekundär zu Infektionen und Entzündungen führt. Wiederkehrende Zyklen von Obstruktion und Entzündung führen zu einer chronischen Bronchitis und Bronchiolitis, welche mit Fortschreiten des Krankheitsgeschehens mit weit reichenden Bronchiektasien und Fibrosen einhergehen. Neben der Lunge sind auch Pankreas, Dünndarm, Gallengangsepithelien, Geschlechtsorgane und Schweißdrüsen betroffen, so dass CF-Patienten an chronischen Pankreatitiden, pankreatogenem Diabetes mellitus, sekundärer biliärer Zirrhose, Gallensteinen, Obstipationen und bei männlichen Patienten an Infertilität leiden können. Bei 5-10% der Neugeborenen tritt ein Mekoniumileus mit häufig letalem Ausgang auf (Maitra und Kumar, 2005; Rowntree und Harris, 2003).

Um die komplexen Ionentransportstörungen bei der zystischen Fibrose zu untersuchen, wurden zahlreiche Mausmodelle hergestellt, bei denen das *cfr*-Gen verändert oder ganz entfernt wurde. Bei den meisten dieser Mausmodelle starben die Tiere noch vor dem Absetzen an schweren Ileumobstipationen. Im Gegensatz zum Menschen zeigen die meisten CF-Mausmodelle keine signifikante Lungenproblematik (zusammengefasst von Grubb und Boucher, 1999). Ein möglicher modulierender Faktor des CF-Phänotyps könnten andere Zelltyp-spezifische Anionenkanäle begleitend zum CFTR darstellen, welche die

defekte Chloridionenleitfähigkeit teilweise kompensieren (Clarke et al., 1992; Rozmahel et al., 1996). Hinweise hierauf ergaben sich aus einem milderem CF-Phänotyp und einer längeren Lebensdauer bei den Tieren der Mausmodelle, die eine höhere Ca^{2+} -aktivierbare Cl^- -Leitfähigkeit aufwiesen (Clarke et al., 1994; Grubb und Boucher, 1999; Rozmahel et al., 1996). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass diese so genannte alternative Chloridionenleitfähigkeit, insbesondere wegen ihrer Aktivierbarkeit durch Kalzium, unter anderem durch Mitglieder der CLCA-Familie vermittelt werden könnte (Gruber et al., 1998a; Gruber et al., 1998b; Leverkoehne und Gruber, 2002; Leverkoehne et al., 2006). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der CLCA-Genfamilie signifikant den Ausprägungsgrad einer Kalzium-aktivierbaren Chloridionenleitfähigkeit im Darm von CF-Patienten modulieren, wobei jedoch nicht geklärt ist, ob die CLCA-Mitglieder hierbei als eigenständiger Ionenkanal oder als Modulator eines noch unbekanntes Kanals fungieren (Ritzka et al. 2004).

Hauber und Mitarbeiter (2004) konnten eine deutliche Überexpression von hCLCA1 in Lungen von CF-Patienten zeigen. Der Lungenphänotyp scheint in einigen CF-Mausmodellen zudem mit der Expressionshöhe des mCLCA3 korreliert zu sein (Chung et al., 2001). Des Weiteren weist eine erhöhte Expression von mCLCA2 und mCLCA3 in einigen CFTR-*knock-out*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypstämmen ebenfalls auf eine den intestinalen Phänotyp modulierende Rolle dieser CLCA-Vertreter hin (Leverkoehne et al., 2006). CLCA-Vertreter scheinen also mögliche Kandidaten für eine alternative Chloridionenleitfähigkeit bei CF zu sein, der genaue Funktionsmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt.

2.3.2 CLCA-Homologe und Asthma bronchiale

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine reversible Atemwegsobstruktion charakterisiert ist. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer weit reichenden Umgestaltung der Atemwege inklusive der glatten Bronchialmuskulatur (Boushey und Fahy, 1995). Histologisch sind vor allem Epithelschäden, Verdickung der Basalmembranen, eosinophile und lymphozytäre Infiltrationen, eine Hypertrophie der glatten Muskulatur sowie eine Hyper- und Metaplasie von Becherzellen mit einer daraus resultierenden Überproduktion an Schleim zu finden.

In einem murinen, immunologisch induzierten Modell für Asthma bronchiale konnte gezeigt werden, dass mCLCA3 eine Schlüsselfunktion bei der Becherzellendifferenzierung und der Synthese und Sekretion von Muzinen durch Becherzellen übernimmt (Nakanishi et al., 2001). Eine intratracheale, Adenovirus-vermittelte *antisense*-Unterdrückung der mCLCA3-Expression führte zu einer deutlichen Verbesserung des Asthma-Phänotyps mit einer signifi-

kant verminderten Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion, wie an mittels Perjodsäure-Schiff-Reaktion (engl. *periodic acid schiff*, PAS) gefärbten, histologischen Präparaten der Lunge anschließend demonstriert wurde. Im Gegensatz dazu führte eine experimentell induzierte Überexpression von mCLCA3 zu einem deutlich verstärkten Krankheitsbild mit gesteigerter Mukussekretion. Die Transfektion von mCLCA3 oder hCLCA1 in die mukoepidermoide Zelllinie NCI H292 führte jeweils zu einer Becherzellmetaplasie mit Mukusproduktion. Hierdurch konnten die *in vivo* erlangten Daten in einem *in vitro*-System bestätigt werden (Hoshino et al., 2002; Nakanishi et al., 2001). Ferner konnten Nakanishi und Mitarbeiter (2001) mittels quantitativer *real-time* PCR eine deutliche Überexpression von hCLCA1 im Bronchialepithel von Asthmapatienten im Vergleich zu gesunden Menschen zeigen. Kamada und Mitarbeiter (2004) identifizierten acht Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) innerhalb der Sequenz von hCLCA1 und konnten eine Korrelation zwischen bestimmten hCLCA1 Haplotypen und dem Risiko an Asthma zu erkranken herausstellen. In einem zweiten, durch Interleukin (IL)-9-Überexpression induzierten, murinen Asthmodell wurde mittels subtraktiver Hybridisierung festgestellt, dass mCLCA3 im Bronchialepithel der erkrankten Tiere stark vermehrt exprimiert wird. Eine zusätzliche Stimulation der mCLCA3-Expression erfolgte nach Antigenexposition der IL-9-überexprimierenden Mäuse, wodurch sich gleichzeitig der Krankheitsverlauf wesentlich verschlechterte (Zhou et al., 2001). Ferner wurde gezeigt, dass die mCLCA3 Expression durch weitere Entzündungsmediatoren wie IL-4 und IL-13 angeregt werden kann. Eine Th2-Zytokin-Behandlung einer primären, humanen Lungenepithelzelllinie führte darüber hinaus zu einer Aufregulation von hCLCA1 (Zhou et al., 2001). In einer weiterreichenden Studie dieses Labors wurde die Wirkung von Niflumizin zum einen in hCLCA1-transfizierten NCI H292 Zellen und zum anderen bei IL-9-überexprimierenden Mäusen untersucht. Niflumizin führte zu einer deutlichen Reduktion der Mukusproduktion *in vitro* und zu einer signifikanten Reduktion der entzündlichen Reaktionen der Luftwege, der Becherzellhyper- und metaplasie und der Mukusproduktion *in vivo* (Zhou et al., 2002). Alle diese Studien weisen auf eine maßgebliche Rolle der CLCA-Vertreter bei der Pathogenese von Asthma bronchiale beim Menschen und im Mausmodell hin, was diese Moleküle zu einem interessanten Ziel möglicher neuer, therapeutischer Ansätze macht.

2.4 Chronisch-obstruktive Bronchiolitis der Pferde

2.4.1 Begriffsbestimmung

Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen sind ein altes Problem in der Pferdeheilkunde, welches einen großen Teil der in Europa und Nordamerika vorwiegend unter Stallbedingungen gehaltenen Pferde betrifft (Leguillette, 2003). Für das Krankheitsbild gibt es zahlreiche Termini, welche teils in den klinisch wahrnehmbaren Krankheitssymptomen, teils in den pathologisch-anatomischen Veränderungen begründet sind. Rein symptomatische Bezeichnungen sind z.B. Lungendampf oder -dämpfigkeit, welche in etwa *broken wind* und *heaves* im Englischen entsprechen (Geisel und von Sandersleben, 1987; Kaup et al., 1990; Littlejohn, 1979; Thurlbeck und Lowell, 1964). Eine im deutschen Sprachraum etablierte und daher auch in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung ist COB. Diese Abkürzung kann sowohl für den englischen Begriff *chronic obstructive bronchitis* als auch im Deutschen für chronisch-obstruktive Bronchitis bzw. Bronchiolitis verwendet werden (Derksen, 1993; Dixon et al., 1995; Geisel und von Sandersleben, 1987; Robinson und Wilson, 1989). Anfang der 1970er Jahre wurde vermehrt der aus der Humanmedizin übernommene Begriff der *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) verwendet (Derksen, 1993; Dixon et al., 1995; Geisel und von Sandersleben, 1987; Littlejohn, 1979). Auf einem Arbeitstreffen international anerkannter Pferdepneumologen wurde im Jahr 2000 beschlossen, den Terminus COPD in RAO für *recurrent airway obstruction* zu ändern, um den Begriff COPD der Humanmedizin vorzubehalten, da dieser ein Krankheitsbild bezeichnet, welches wesentliche Unterschiede zu der equinen Lungenerkrankung aufweist (Robinson, 2001). Die Definition der RAO als eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung der Pferde, deren Symptome nach Umstellung der Haltungsbedingungen reversibel sind, zeigt somit deutlich den Unterschied zu dem Krankheitsbild der humanen COPC, die mit einer progressiven und großteils irreversiblen Verschlechterung der Lungenfunktion einhergeht (Robinson, 2001). Zudem grenzt sie die RAO gegenüber anderen, equine Lungenerkrankungen einschließlich der *inflammatory airway disease* (IAD) und Primärinfektionen durch Viren und Bakterien ab.

2.4.2 Prävalenz

COB ist eine relativ weit verbreitete Atemwegserkrankung des unteren Respirationstraktes, welche überwiegend in der Pferdepopulation der nördlichen Hemisphäre auftritt. Je nach den angewandten Definitionskriterien wird eine Prävalenz von 2% bis 80% angegeben (Leguillette, 2003). Auch wenn COB grundsätzlich bei Pferden jeder Rasse und jeden Geschlechts und Alters vorkommt, sind vor allem adulte Tiere ab einem Alter von fünf Jahren betroffen, wobei das Vorkommen mit dem Alter deutlich zunimmt (Leguillette, 2003; Littlejohn, 1979). Darüber hinaus scheint es eine erbliche Prädisposition in einigen Zuchtlinien zu geben (Marti et al., 1991; McPherson et al., 1978).

2.4.3 Klinik

Typische Symptome sind Leistungsschwäche, Husten und Nasenausfluss (Derksen, 1991; McPherson et al., 1978). Zunächst zeigen sich diese nur unter Belastung, verstärken sich jedoch im Laufe der Zeit erheblich, wenn die Haltungsbedingungen des Pferdes nicht drastisch umgestellt werden (Leguillette, 2003). Die Pferde zeigen dann einen fortschreitenden Leistungsabfall mit Tachypnoe und immer häufiger auftretendem Husten. Auffällig ist das Atemmuster mit schneller Inspiration und forcierter Expiration, was bei länger andauerndem Krankheitsgeschehen zu einer Hypertrophie des *Musculus obliquus externus abdominis* und zur Ausbildung der so genannten Dampf Rinne führen kann (Leguillette, 2003). Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich die Dyspnoe bereits in der Ruhe (Bracher et al., 1991; Littlejohn, 1979; McPherson et al., 1978) mit einer deutlichen Zunahme der auskultatorisch wahrnehmbaren Atemgeräusche. Es treten Rasselgeräusche bis hin zu Giemen über der Trachea und dem Lungenfeld sowie knisternde Geräusche in der Peripherie der Lunge auf. Das Lungenfeld stellt sich bei der Perkussion vergrößert dar und weist häufig Zonen mit überlautem Schall auf (Robinson et al., 1996). Ein wichtiges Charakteristikum der COB ist die Reversibilität der Symptome nach dem Verbringen der Pferde in eine staubfreie Umgebung, z.B. in die Weidehaltung (Leguillette, 2003).

2.4.4 Ätiologie

Bei der COB handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, für das mehrere Ursachen postuliert werden (Derksen, 1993). Klinische und epidemiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass COB auf eine Hypersensitivitätsreaktion, ausgelöst durch verschiedene, im Staub von Stall und Futter vorkommende Allergene, wie zum Beispiel Sporen von *Micropo-lyspora faeni* und *Aspergillus fumigatus*, zurückzuführen ist (Clarke, 1987; Derksen et al., 1988; Pearson und Riebold, 1989; Webster et al., 1987). Darüber hinaus wird auch eine

Beteiligung von inhalierten Endotoxinen, Ammoniakdämpfen und Umweltgiften diskutiert (Mair, 1995; McGorum et al., 1998; Pirie et al., 2001).

Wie bereits eingangs erwähnt wird zudem eine genetische Prädisposition postuliert. Marti und Mitarbeiter (1991) untersuchten das Auftreten von COB in zwei Gestüten. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Nachkommen zweier COB-Patienten eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit (67%) an COB zu erkranken aufwiesen als Nachkommen gesunder Tiere (17%) oder nur eines betroffenen Elternteils (48%).

Es gibt epidemiologische Hinweise darauf, dass COB in Folge einer viralen Infektion des oberen Respirationstraktes auftreten kann. Auch konnte im Mukus von Pferden mit COB eine deutliche Hämagglutinations-Hemmungs-Aktivität gegen das equine Influenza Virus A 1 festgestellt werden, was auf einen möglichen Zusammenhang hindeuten könnte (Thorsen et al., 1983). Interessanter Weise ist Ähnliches für das Asthma bronchiale des Menschen beschrieben (Leguillette, 2003). Bis heute liegen allerdings noch keine stichhaltigen mikrobiologischen Beweise vor, welche einen Zusammenhang zwischen einer viralen Infektion und COB belegen (Radostits et al., 1994).

2.4.5 Pathogenese

Nach der Exposition durch die oben beschriebenen Allergene entwickeln COB-krankte Pferde sehr schnell entzündliche Veränderungen des unteren Respirationstraktes, eine gesteigerte Mukussekretion und eine Bronchokonstriktion in Folge einer unspezifischen Hyperreagibilität, was zusammen zu einer Obstruktion der Luftwege führt. Auch wenn diese drei Komponenten der COB intensiv untersucht wurden, ist die Kaskade der Ereignisse bis heute nicht geklärt (Leguillette, 2003).

Bereits schon drei bis fünf Stunden nach der Staubexposition konnte in der Lunge COB-krankter Pferde eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten festgestellt werden (Fairbairn et al., 1993), und nach etwa fünf Stunden erschienen diese in der bronchoalveolären Lavage (BAL)-Flüssigkeit (McGorum et al., 1993). Neben den neutrophilen Granulozyten spielen auch die Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COB. Sie koordinieren die Immunantwort und kontrollieren durch die Sekretion von Zytokinen andere Entzündungszellen (Leguillette, 2003). Lavoie und Mitarbeiter (2001) konnten mit Hilfe einer *in situ*-Hybridisierung in Zellen der Bronchoalveolarflüssigkeit von COB-kranken Pferden eine deutlich erhöhte Expression von IL-4 und IL-5 und eine Abnahme der Expressionsrate von Interferon Gamma (IFN- γ) feststellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine T-Helferzellen (Th)-2 vermittelte Immunreaktion an der Pathogenese der COB beteiligt ist, wie es auch für das Asthma bronchiale des Menschen beschrieben ist (Leguillette, 2003). Darüber hinaus

findet sich auch eine erhöhte IL-8-Expression (Giguere et al., 2002), welches als Chemokin und Aktivator von neutrophilen Granulozyten möglicherweise an der Akkumulation dieser Zellpopulation in den Luftwegen beteiligt ist (Leguillette, 2003).

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu schwerwiegenden, histologischen Veränderungen des Bronchialepithels. Hier sind vor allem eine Becherzellmetaplasie und -hyperplasie, eine Hyperplasie des Epithels und der Verlust von Ziliarzellen zu nennen, welche schließlich zu einer Hyper- und Dyskrie führen (Kaup et al., 1990). Es kommt zu einer vermehrten Produktion von Bronchialsekreten mit einer deutlich erhöhten Viskosität, welche in den Atemwegen akkumulieren und somit maßgeblich zur Obstruktion der Atemwege beitragen.

Die bei COB zu beobachtende Bronchokonstriktion ist in erster Linie auf eine Hyperreagibilität der Atemwege zurückzuführen (Deegen et al., 1987; Sasse, 1995). Der Mechanismus, der der Hyperreagibilität bei COB zugrunde liegt, ist unklar (Robinson et al., 1996). Es konnten weder eine übersteigerte cholinerge Reaktion (Broadstone et al., 1988) oder eine verminderte β -Adrenorezeptor-Funktion (Scott et al., 1988) nachgewiesen werden, noch lässt sich die Hyperreagibilität durch eine Blockade der Cyclooxygenase beeinflussen (Gray et al., 1989a). Möglicherweise steht sie in direktem Zusammenhang mit den beschriebenen entzündlichen Vorgängen, zumal geringe Mengen von Antigenen oder Entzündungsmediatoren während der akuten, entzündlichen Phase von COB zu einer erheblichen Verengung der Atemwege führen, wohingegen bei gesunden Tieren oder auch bei an COB erkrankten Pferden in Remission kein Effekt nachweisbar ist (Robinson et al., 1996).

2.4.6 Pathologisches Bild

Die makroskopischen und mikroskopischen Befunde bei COB können sehr variabel sein und weisen ein heterogenes Verteilungsmuster auf (Beech, 1991). Das makroskopische Bild ist häufig unauffällig. In hochgradigen Fällen weisen die Lungen einen schlechten Retraktionszustand auf. Hierbei handelt es sich meist eher um Lufteinschlüsse hinter obstruierten Atemwegen als um manifeste Emphyseme (Robinson et al., 1996).

Für die COB charakteristische, mikroskopische Befunde stellen die entzündlichen Veränderungen der kleinen Atemwege dar. Eine meist lympho-plasmazelluläre, chronische Bronchiolitis ist vergesellschaftet mit einer Ansammlung von Sekret und neutrophilen Granulozyten in den Lumina. Darüber hinaus findet sich häufig eine peribronchioläre Fibrose und Infiltration durch Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen (Kaup et al., 1990; Robinson et al., 1996; Thurlbeck und Lowell, 1964). Auch eosinophile Granulozyten können beteiligt sein (Beech, 1991; Leguillette, 2003; Robinson et al., 1996). Wie auch beim Asthma bronchiale des Menschen beschrieben, finden sich bei der COB der Pferde massive Umbauvorgänge der Luftwege (Leguillette, 2003). Neben einer Hypertrophie der Bronchialmuskulatur und des

Epithels besteht eine deutliche Hyper- und Metaplasie von Becherzellen (Kaup et al., 1990; Leguillette, 2003). Es kommt zu einem Verlust von Zilien und Zilienzellen, auch die Anzahl an Clara-Zellen nimmt ab. Die Alveolarsepten in der Nachbarschaft von Bronchiolen können eine Nekrose von Typ I Pneumozyten aufweisen, welche dann von Typ II Zellen ersetzt werden (Kaup et al., 1990).

3. Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung

Wie in Kapitel 2.3.2 dargestellt, wird eine maßgebliche Beteiligung humaner und muriner CLCA Homologe bei der Pathogenese des Asthma bronchiale des Menschen und beim murinen Asthmodell vermutet. Die COB der Pferde weist zahlreiche funktionelle und histomorphologische Parallelen zum Asthma bronchiale auf. Hieraus ergibt sich die Frage nach einem equinen Orthologen zu mCLCA3 bzw. hCLCA1 mit einer ähnlich bedeutenden Rolle bei der Pathogenese der COB. Diese Erkenntnisse könnten, wie in der Einleitung bereits erwähnt, zu einem weiter reichenden Verständnis des Pathomechanismus der Dyskrie bei COB beitragen. Dieser equine CLCA-Homologe könnte, wie für mCLCA3 im Mausmodell gezeigt, ein interessantes Ziel für neue therapeutische Ansätze bei der Modulation der Dyskrie bei COB darstellen, aber auch ein diagnostischer Nutzen ist denkbar.

Um die zentrale Arbeitshypothese zu prüfen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein entsprechender Vertreter der CLCA-Genfamilie beim Pferd identifiziert werden. Da die Orthologen mCLCA3 und hCLCA1 bei Maus und Mensch ausschließlich in Becherzellen zu finden sind, sollte zunächst aus der becherzellreichen Schleimhaut des Rektums eines Pferdes mRNA gewonnen werden und mit einer mCLCA3-DNA Sonde auf den Gehalt einer homologen, equinen mRNA-Spezies untersucht und anschließend die equine mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Mittels Primern, die an Hand konservierter DNA-Abschnitte von hCLCA1 und mCLCA3 generiert werden, war die Amplifikation eines Teilstücks der gesuchten Pferde c-DNA vorgesehen. Nach der Sequenzierung dieses Abschnittes sollten nach seiner Vorlage wiederum Primer generiert werden, die nun pferdespezifisch für den gesuchten Homologen sind. Mit diesen Primern sollte mittels *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) der gesamte offene Leserahmen des gesuchten equinen Homologen ermittelt werden und als erster CLCA Vertreter beim Pferd, als eCLCA1 bezeichnet werden. Anschließend war die Klonierung von eCLCA1 in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 geplant. Um das Expressionsmuster von eCLCA1 zu ermitteln, war die Untersuchung eines Organspektrums von gesunden Pferden mittels Immunhistochemie vorgesehen. Die hierfür benötigten Antikörper sollten aus Kaninchen gewonnen werden, die mit synthetischen Oligopeptiden des eCLCA1 Proteins immunisiert werden. Um das Expressionsmuster auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, sollte eine quantitative *real-time* PCR etabliert und damit die Organe der Pferde untersucht werden. Die gleichen Techniken sollten zur Charakterisierung der Expression von eCLCA1 bei Pferden mit COB eingesetzt werden. Da die Expression von eCLCA1 nur in einer Zellpopulation, den Becherzellen, erwartet wurde,

sollte sie in einzelnen Becherzellen gesunder und kranker Pferde präzise quantifiziert werden. Hierbei war der Einsatz der *laser capture microdissection* (LCM) geplant, um einzelne Becherzellen aus den Luftwegen gesunder und erkrankter Pferde gewinnen zu können und anschließend mittels quantitativer RT-PCR den Gehalt der gesuchten Sequenz zu ermitteln.

Ziel dieses Projektes war es demnach, den ersten, equinen CLCA-Homologen zu identifizieren und charakterisieren und erste Hinweise auf seine mögliche Rolle bei der COB zu erhalten.

4. Material und Methoden

4.1 Untersuchungsmaterial und Probengewinnung

Es wurden von insgesamt 102 Pferden (93 Warmblüter, 8 Ponys, ein Frieser; davon 11 Hengste, 45 Wallache, 46 Stuten) im Alter von 7 Tagen bis 30 Jahren (Durchschnitt 9,4 Jahre) Gewebeproben für die Untersuchungen entnommen. 87 Pferde stammten aus der Routinediagnostik des Institutes für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Die Tiere wurden aufgrund von verschiedenen Erkrankungen euthanasiert oder waren spontan verendet. Bei den restlichen 15 Tieren handelt es sich um Schlachtpferde vom Schlachthof Peter Ströh in Celle. Diese Tiere waren klinisch gesund.

Eine Tabelle mit Informationen zu allen Pferden ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 22). Von allen Pferden wurden Proben aus drei definierten Trachearegionen (Größe etwa 1,0 x 1,0 x 0,5 cm) und aus 11 definierten Lungenlokalisationen (Größe etwa 2,0 x 2,0 x 2,0 cm) entnommen. Von drei Pferden wurde zusätzlich ein breites Organspektrum genommen.

Die drei Lokalisationen aus der Trachealschleimhaut befanden sich ca. 10 cm kaudal des Kehlkopfes, auf halber Länge der Trachea und ca. 10 cm kranial der Bifurkation. Das Entnahmeschema für die Lungenproben ist in Abbildung 2 aufgeführt. Von allen Tieren, die maximal 4 h post mortem zur Sektion gelangten, wurde ein zusätzlicher Probensatz gefrierfixiert.

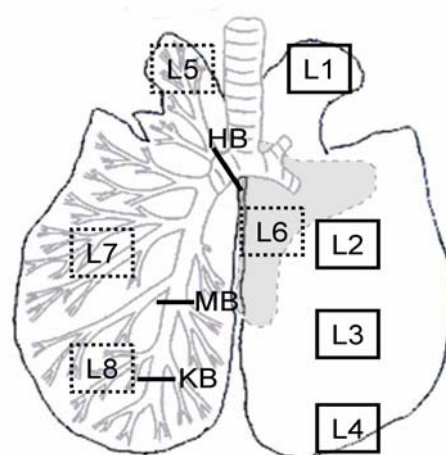


Abbildung 2: Entnahmeschema der Lungenproben mit Bezeichnung der Lungenlokalisationen

Die Lungenproben L1 bis L4 wurden oberflächennah von dorsal aus dem rechten *Lobus cranialis* bzw. *Lobus caudalis* gewonnen. Die Lungenproben L5, L7 und L8 wurden in der Tiefe des Lungengewebes von ventral aus dem linken *Lobus caudalis* bzw. *Lobus cranialis* entnommen. Die Lungenprobe L6 stammt mittig aus dem *Lobus accessorius*.

Der Bronchialbaum wurde im HB = Hauptbronchus, MB = mittleren Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel) und KB = kleinen Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel) beprobt.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben in 10%igem, neutral gepuffertem Formalin nach Lillie (Böck, 1989) für ca. 24 h fixiert. Die Proben des zusätzlichen, zweiten Probensatzes wurden in Aluminiumfolie eingeschlagen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Diese Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

4.2 Formalinfixierung, Paraffineinbettung und Herstellung von Gewebeschnitten

Die Entwässerung der formalinfixierten Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Paraffineinbettung erfolgten automatisiert. Die Paraffinblöcke wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Von diesen Blöcken wurden ca. 4 µm dicke Schnitte mit einem Rotationsmikrotom hergestellt, in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt und entweder auf Star Frost- oder auf SuperFrost® Objektträger der Firma R. Langenbrinck (Teningen) aufgezogen. Anschließend wurden sie bei 65°C in einem Wärmeschrank für 30 min belassen und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

4.3 Probenvorbereitung für die molekularbiologischen Untersuchungen

4.3.1 Allgemeine Handhabung

Um eine Kontamination mit Fremd-DNA oder RNasen zu vermeiden, wurden alle molekularbiologischen Arbeiten soweit wie möglich steril durchgeführt. Lösungen wurden soweit möglich autoklaviert oder steril filtriert und in kleine Mengen aliquotiert. Der Arbeitsplatz wurde vor jedem Arbeitsbeginn mit 10%iger Natriumhypochlorid-Lösung gereinigt. Die RNA-Präparationen, das Ansetzen der PCR-Reagenzien sowie die Gelelektrophorese wurden jeweils in einem anderen Raum durchgeführt. Bei den Arbeiten in den verschiedenen Räumen wurden separate Arbeitskittel getragen. Ebenso wurden bei allen Arbeiten Latex-Handschuhe getragen, die nach jedem Arbeitsschritt gewechselt wurden. Es wurden nur RNase und DNase freie, gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Alle Substanzen für die molekularbiologischen Arbeiten wurden während der Präparation stets

auf Eis gehalten. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert und zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff transportiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Zum Ansetzen von Lösungen für RNA-Präparationen und zum Lösen und Verdünnen der RNA wurde ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser (Ehrenberg et al., 1974) oder Wasser für die Molekularbiologie der Firma Roth (Karlsruhe) eingesetzt. Bei allen PCR-Läufen wurde mindestens eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen aufzudecken.

4.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden ca. 100 mg tiefgefrorenes Gewebe in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert. Anschließend wurden 2,5 ml TRIZOLTM-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) auf das Gewebepulver gegeben und eingearbeitet. Unter ständigem Mörsern taute das Gemisch auf und wurde anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zehnmal mit einer 20 ml-Spritze mit 18'-Einmalkanüle kräftig aufgezogen und in den Mörser zurückgegeben. Die Flüssigkeit wurde auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße zu je 1,2 ml aufgeteilt und durch kurzes Vortexen mit je 250 μl Chloroform vermischt. Dieser Ansatz wurde 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Die obere, wässrige und RNA-haltige Phase (ca. 600 μl) wurde abgenommen und in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 600 μl Isopropanol durch kurzes Vortexen vermischt. Nach der Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz erneut bei 4°C und $12.000 \times g$ 15 min lang zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen. Das verbleibende RNA-Pellet wurde mehrfach mit 75%igem Ethanol gewaschen. Die Pellets aus den beiden 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden in einem Reaktionsgefäß mit 75%igem Ethanol zusammengeführt. Das Ethanol wurde soweit möglich abpipettiert und der noch verbliebene Rest mit einer 100 μl Pipettenspitze aufgenommen. Die Pellets wurden nun 15 min getrocknet und anschließend in 100 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

4.3.3 Aufreinigung der Gesamt-RNA

Die gelöste Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy MinikitTM (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dazu wurden 100 μl der Probe mit 350 μl RLT-Puffer, 3,5 μl β -Mercaptoethanol (β -ME; Sigma, Steinheim) und 350 μl 70%igem Ethanol vermischt, auf die im Kit enthaltene Säule gegeben und 15 sec bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 700 μl RW1-Puffer beschickt und 15 sec mit $14.000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden zweimal 500 μl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und einmal 15 sec und einmal 2 min mit $14.000 \times g$

zentrifugiert. Die RNA wurde dann durch einminütiges Zentrifugieren bei 14.000 x *g* mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst. Aus jeder so gewonnenen RNA-Lösung wurde 1 µl entnommen und der RNA-Gehalt und die Reinheit der Probe im NanoDrop™-Gerät (PeqLab, Erlangen) photometrisch bestimmt. Die verbleibenden 29 µl wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Mit Ausnahme des β-ME und des Ethanols waren alle verwendeten Lösungen im RNeasy Minikit™ enthalten.

4.3.4 Gewinnung der poly-A⁺-RNA

Die poly-A⁺-RNA-Gewinnung erfolgte mit dem Nucleotrap® mRNA Mini Kit von Macherey-Nagel (Düren). Hierzu wurden 100 µg der Gesamt-RNA in einem Volumen von 200 µl DEPC-behandeltem Wasser mit 200 µl 2 x RM1-Puffer vermischt. Zu diesem Gemisch wurden 20 µl Bead-Suspension gegeben, gut gemischt und für 5 min bei 68°C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur. Die Suspension wurde nun zunächst für 15 sec bei 5.000 x *g* und dann erneut 15 sec bei 1.300 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet in 600 µl RM2-Puffer resuspendiert. Das Gemisch wurde auf die im Kit enthaltene Säule gegeben und für 2 min bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl RM3-Puffer auf die Säule gegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert, ohne die Membran zu berühren. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 13.000 x *g* wurde der Überstand verworfen und die Säule erneut für eine Minute bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die an den *Beads* gebundene poly-A⁺-RNA wurde mit 40 µl DEPC-behandeltem Wasser durch 5-10minütige Inkubation bei 68°C gelöst und durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 x *g* im sterilen Reaktionsgefäß gesammelt. Die so gewonnene poly-A⁺-RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

4.3.5 Reverse Transkription

Es wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA bzw. 500 ng poly-A⁺-RNA mit Hilfe der Omniscript Reverse Transkriptase™ (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde die RNA zunächst mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 24 µl aufgefüllt. Dazu wurden 4 µl 10x Puffer RT, 4 µl dNTP Mix (5 mM je dNTP; Invitrogen), 4 µl *Random Hexamers* (100 µM; Promega, Madison, WI, USA) 2 µl RNase Inhibitor (RNase OUT™, 10 U/µl; Invitrogen) und 2 µl Omniscript Reverse Transkriptase™ (4 U/µl; Qiagen) gegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die so gewonnenen 40 µl cDNA wurden bei -20°C gelagert.

4.4 Identifizierung einer CLCA-cDNA-Sequenz beim Pferd

4.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Identifizierung der gesuchten cDNA-Spezies sollte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) erfolgen. Hierzu wurden zunächst an Hand konservierter Sequenzabschnitte aller bislang bekannten CLCA-Vertreter, welche mit Hilfe der DNASTAR Lasergene 7 Software (GATC Biotech) identifiziert wurden, insgesamt 13 Primer festgelegt, wobei im besonderen Maße die drei Homologen hCLCA1, mCLCA3 und pCLCA1 berücksichtigt wurden. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Alle im Folgenden angegebenen Schmelztemperaturen (T_m) in den Tabellen beziehen sich auf eine Pufferlösung mit 50 mM NaCl. Forward-Primer sind mit + und Reverse-Primer mit - gekennzeichnet.

Tabelle 2: DNA-Sequenzen und Schmelztemperaturen der eCLCA1 Primer

Name	Sequenz 5'-3'	T_m in 50 mM NaCl
eCLCA-1+	CACATAAAGGACATGGTGAC	45°C
eCLCA-2+	CTGTTTGAAGCTACAGG	39°C
eCLCA-3+	CTGTTTGAAGCTACAGGAAA	43°C
eCLCA-4+	CAAAAATGTTGCCATTTTGATTC	43°C
eCLCA-5+	GAAGTTCTACTTATCCAAAGGAA	45°C
eCLCA-6-	CCATTCACAGATTCAATC	38°C
eCLCA-7-	CTGTTTTTCCATTCACAGATTCAATC	48°C
eCLCA-8-	CTCCTCCCAGAGCCC	45°C
eCLCA-9-	GTGACTCCTCCCAGAGCCC	52°C
eCLCA-10-	CCACGTCAGATTCACCAG	45°C
eCLCA-11+	GATTGAATCTGTGAATGGAAAAACAG	48°C
eCLCA-12+	GGGCTCTGGGAGGAG	45°C
eCLCA-13-	TTCCTTTGGATAAGTAGAACTTC	45°C

Es wurden insgesamt 10 Forward/Reverse-Primerkombinationen getestet. (1+/8-; 1+/9-; 1+/10-; 1+/13-; 2+/6-; 3+/10-; 4+/9-; 5+/6-; 11+/9-; 12+/10-). Zunächst wurden für jedes Primerpaar eine neunfache Menge des PCR-Mixes (siehe Tabelle 4) in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und auf 9 dünnwandige 0,5 µl-Reaktionsgefäße zu je 47 µl verteilt. Hierzu wurden achtmal je 1 µl cDNA (gewonnen aus der Rektumschleimhautprobe von Pferd Pfd I) als *template* und einmal 1 µl Aqua dest. als Negativkontrolle im Hinblick auf mögliche unspezifische Amplifikationen hinzugegeben.

Anschließend wurde auf jeden PCR-Ansatz ein Tropfen Paraffinöl gegeben, um Kondensationsverluste zu vermeiden.

Ein Gradientencycler der Firma Biometra (Göttingen) wurde mit dem in Tabelle 3 angegebenen Zeit-Temperatur Programm programmiert. Die mit T_A bezeichnete *Annealing*-Temperatur entspricht dem Mittelwert der Schmelztemperaturen des entsprechenden Primerpaares. Der angelegte Temperaturgradient von 10°C (8 Temperaturintervalle) reichte von 5°C unterhalb der T_A bis 5°C oberhalb der T_A . Nachdem der erste Programmschritt durchlaufen war, wurde das Programm innerhalb des 80°C Schrittes kurz unterbrochen, um $3\ \mu\text{l}$ des in Tabelle 5 beschriebenen Polymerase-Mixes unter das Öl zu pipettieren („*hot start*“). Als Enzym wurde die thermophile *Thermus aquaticus* (*taq*)- Polymerase (Promega) verwendet. Für die Negativkontrolle wurde jeweils die mittlere *Annealing*-Temperatur gewählt.

Tabelle 3: Zeit-Temperatur-Programm für die PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer		
Initiale Denaturierung	95°C	2 min		
Zugabe des Polymerase-Mixes	80°C	3 min		
Denaturierung	$94,5^\circ\text{C}$	40 sec	34 x	
Anlagerung der Primer	$T_A^\circ\text{C}$	40 sec		Gradient 10°C
Elongation	72°C	2 min		<i>time increment 3 sec</i>
Finale Verlängerung	72°C	10 min		
Kühlung bis zur Entnahme	4°C	∞		

Tabelle 4: PCR-Mix

Reagenzien	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer (Promega)	$5,0\ \mu\text{l}$	1x
MgCl_2 (25 mM; Promega)	$3,4\ \mu\text{l}$	1,6 mM
dNTP-Lösung (10mM je dNTP; Invitrogen)	$8,0\ \mu\text{l}$	1,6 mM je dNTP
Primer (20 μM)	$2,5\ \mu\text{l}$ je Primer	1,0 μM
Aqua bidest.	ad 50 μl	

Tabelle 5: Polymerase-Mix

Reagenzien	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration im Polymerase-Mix	Endkonzentration in der PCR-Reaktion
10 x PCR-Puffer (Promega)	3,0 µl	1x	1x
Taq-Polymerase (5 U/µl; Promega)	1,5 µl	0,25 U/µl	0,015 U/µl
Aqua bidest.	ad 30,0 µl		

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid (1 ng/50 ml Agarosegel) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht bei 245 nm Wellenlänge durchleuchtet und mit dem BioDocanAnalyse-Video[®] (Biometra) fotografiert und digitalisiert.

Mit dem effektivsten Primerpaar (eCLCA-1+ / eCLCA-9-) wurde eine PCR mit einem Gesamtreaktionsansatz von 1 ml, verteilt auf 50 µl-Einzelreaktionen durchgeführt. Die optimale T_A lag bei 55,5°C, auf einen Temperaturgradienten wurde verzichtet.

4.4.2 cDNA-Präzipitation

Für die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion des PCR-Produktes wurde zunächst das Volumen von 1 ml auf 50 µl reduziert. Dies erfolgte durch eine DNA-Präzipitation. Hierzu wurden die 50 µl-Einzelreaktionen in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und mit 100 µl 3 M Natriumazetat-Lösung vermischt. Anschließend wurden 2,75 ml auf -20°C vorgekühltes 100%iges Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch inkubierte über Nacht bei -20°C. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 13.000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde soweit möglich abpipettiert und der noch verbliebene Rest mit einer 100 µl-Pipettenspitze aufgenommen. Das Pellet wurde für 15 min getrocknet und in 50 µl Wasser für die Molekularbiologie (Roth) resuspendiert.

4.4.3 Gelextraktion und Aufreinigung des PCR-Produktes

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der präzipitierten PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid wurde die in den PCR-Probeläufen aufgetretene Bande von ca. 1,9 kb unter UV-Licht mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und die cDNA mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits™ (Qiagen) extrahiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelfragment gewogen und die dreifache Menge an GQ-Puffer zugegeben. Das Gel wurde in dem Puffer unter Vortexen und Wärmezufuhr von maximal 50°C aufgelöst. Die Mischung wurde auf die zum Kit gehörige Säule gegeben und 1 min bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Danach wurden 500 µl Puffer QG auf die Säule aufgebracht und erneut 1 min bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde einmal mit 750 µl PE-Puffer auf der Säule und dann trocken wiederholt. Um die DNA von der Säule zu lösen, wurden 50 µl Elutionspuffer aufgebracht und die Säule 1 min bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch mit den NanoDrop® (PeqLab) bestimmt. Alle Lösungen für die Gelextraktion waren im Lieferumfang des Kits enthalten. Die Sequenz des DNA-Fragmentes wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen) ermittelt.

4.4.4 RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Die Amplifikation der noch unbekanntenen 5'- und 3'-Enden der gesuchten eCLCA1-cDNA-Sequenz erfolgte mittels Gene Racer® Kit der Firma Invitrogen. Hierzu wurden die beiden Enden um ein bekanntes Fragment, ein im Kit enthaltenes Oligonukleotid, verlängert, welches dann zur Anlagerung von spezifischen Primern genutzt werden konnte. Auf diese Weise konnte der gesamte offene Leseramen (engl. *open reading frame*, ORF) amplifiziert werden.

Vor der Ligation der poly-A⁺-RNA mit dem Oligonukleotid mussten zunächst poly-A⁺-RNA-Bruchstücke und nicht poly-A⁺-RNA-Fragmente eliminiert werden. Dies geschah durch eine Dephosphorylierung mit Hilfe der intestinalen Phosphatase von Kälbern (engl. *calf intestinal phosphatase*, CIP), welche lediglich von den unerwünschten Fragmenten das 5'-Phosphat entfernt und auf intakte poly-A⁺-RNA keinen Einfluss hat. Da somit nur noch die zu ligierende, intakte poly-A⁺-RNA einen 5'-Phosphatrest besitzt, unterbleibt eine Ligation unerwünschter RNA-Fragmente. Um an das 3'-Ende ein Fragment mit bekannter Sequenz anzufügen, wurde bei der Transkription der im Kit enthaltene GeneRacer-Oligo-dT-Primer verwendet, welcher sich an das Poly-A-Ende der poly-A⁺-RNA anlagert, wodurch die entstandene cDNA um das gewünschte Fragment verlängert wurde.

Dephosphorylierung der poly-A⁺-RNA

Für die Dephosphorylierung wurden 160 ng poly-A⁺-RNA (gewonnen aus der Rektumschleimhautprobe von Pferd Pfd I) in einem Volumen von 5 µl mit 1 µl CIP (10 U/µl), 1 µl 10 x CIP-Puffer und 1 µl RNase Out-Lösung (40 U/µl) vermischt und für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe sofort auf Eis gestellt.

RNA-Präzipitation

Zu den 10 µl dephosphorylierter poly-A⁺-RNA wurden 90 µl DEPC-behandeltes Wasser gegeben, mit 100 µl Phenol Chloroform 30 sec gevortext und anschließend für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 2 µl Muschelglykogen-Lösung (10 mg/ml) und 10 µl 3 M Natriumazetat-Lösung pH 5,2 gut vermischt. Anschließend wurden dem Gemisch 220 µl 95%iges Ethanol zugegeben und die Probe kurz gevortext. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Trockeneis erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1.300 x g für 20 min. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 2 min bei 4°C und 1.300 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde soweit möglich abpipettiert und der noch verbliebene Rest mit einer 100 µl-Pipettenspitze aufgenommen. Das Pellet wurde für 2 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 7 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

Entfernung der poly-A⁺-RNA Cap-Struktur

Als nächstes erfolgte die Entfernung der poly-A⁺-RNA Cap-Struktur mittels *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP). Hierzu wurden 7 µl der dephosphorylierten poly-A⁺-RNA mit 1 µl 10 x TAP-Puffer, 1 µl RNase Out-Lösung und 1 µl TAP (0,5 U/µl) vermischt, eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Es folgte eine erneute Präzipitation der RNA nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Ligation der poly-A⁺-RNA mit den GeneRacer[®] RNA Oligonukleotiden

Nun erfolgte die Ligation der im Kit enthaltenen GeneRacer[®] RNA Oligonukleotide an die entsprechend vorbereitete poly-A⁺-RNA. Hierzu wurden 7 µl der dephosphorylierten und von der Cap-Struktur befreiten poly-A⁺-RNA mit 0,25 µg lyophilisierten GeneRacer[®] RNA-Oligonukleotiden vermischt und nach 5minütiger Inkubation bei 65°C auf Eis verbracht. Anschließend wurden 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM Adenosintriphosphat (ATP), 1 µl RNase Out[®]-Lösung (40 U/µl) und 1 µl T4 RNA-Ligase (5 U/µl) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und auf Eis verbracht.

Reverse Transkription der poly-A⁺-RNA in cDNA

Nach erneuter RNA-Präzipitation nach dem obigen Protokoll erfolgte nun die reverse Transkription der poly-A⁺-RNA in cDNA. Hierzu wurden zu den 7 µl der präzipitierten RNA 1 µl der im Kit enthaltenen GeneRacer-Oligo-dt-Primer (50 µM) und 1 µl eines dNTP Mixes (10 mM je dNTP) gegeben und zunächst 5 min bei 65°C und dann 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x First Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase Out[®]-Lösung (40 U/µl) und 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und 50 min bei 42°C inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde durch 15minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Nach Abkühlung des Gemisches für 2 min auf Eis wurde 1 µl RNase H (2 U/µl) dazugegeben und die Probe 20 min bei 37°C inkubiert. Die auf diese Weise mit bekanntem 5'- und 3'-Ende hergestellte cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

PCR-Amplifikation der gesuchten eCLCA1-cDNA

Abschließend erfolgte nun die Amplifikation der vollständigen, gesuchten eCLCA1-cDNA. Hierfür wurden Primer an Hand des zuvor sequenzierten, 1894 kb langen eCLCA1-cDNA-Fragmentes festgelegt. Für die Amplifikation des unbekanntes 3'-Endes wurde ein *Forward*-Primer festgelegt (bezeichnet als eCLCA 3'R 5+; GATTCACCAAGGAGGCTTACCAATTCTCAGG), für die Amplifikation des unbekanntes 5'-Endes ein *Reverse*-Primer (bezeichnet als eCLCA 5'R 9-; CCATCGTAGATGAGCCCATTTCGTGG). Da die 5'-RACE kein zufrieden stellendes Ergebnis erzielte, wurde das mit dem ersten Primer hergestellte PCR-Produkt als *template* für eine zweite, so genannte *nested*-PCR mit einem weiter *downstream* liegenden Primer verwendet. Dieses Verfahren wurde für den 5'RACE angewandt (Primerbezeichnung eCLCA 5'R 10-; CTTCCCTTGTGGTCCATATTCATCCAACC). Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische und das Zeit-Temperatur-Programm sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die RACE-PCR

Reagenzien	Eingesetztes Volumen in der 5'-RACE	Eingesetztes Volumen in der <i>nested</i> -5'-RACE	Eingesetztes Volumen in der 3'-RACE
Gene Racer™ 5'Primer (10 µM)	3,0 µl	-	-
eCLCA 5'R 9- (10 µM)	1,0 µl	-	-
eCLCA 5'R 10- (10 µM)	-	1,0 µl	-
Gene Racer™ 5'- <i>nested</i> Primer (10 µM)	-	1,0 µl	-
Gene Racer™ 3'-Primer (10 µM)	-	-	3,0 µl
eCLCA 3'R 5+ (10 µM)	-	-	1,0 µl
<i>template</i>	1,0 µl	1,0 µl*	1,0 µl
10 x High Fidelity PCR-Puffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity (5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
MgSO ₄ (50 mM)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Aqua dest.	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl

*Als *template* wurde das PCR-Produkt aus der 5'-RACE eingesetzt.

Tabelle 7: Zeit-Temperatur- Programm für die RACE-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen	
94°C	2 min	1 x	
94°C	30 sec	5 x	
72°C	20 sec		
94°C	30 sec	5 x	
70°C	20 sec		
94°C	30 sec	25 x	
65°C	30 sec		
T _A °C*	2 min		
68°C	10 min	1 x	
4°C	∞		

* Als Anlagerungstemperatur T_A wurden für die 3'RACE 70°C und für die 5'- und 5'*nested*-RACE 68°C eingesetzt.

Die Sequenzierung der Amplifikate wurde von der Firma SeqLab durchgeführt. Mit Hilfe der DNASTAR Lasergene 7 Software (GATC Biotech) wurden die einzelnen Sequenzen zu einer zusammenhängenden, vollständigen eCLCA1-Sequenz im Computer zusammengestellt.

4.5 Klonierung der eCLCA1-cDNA

Pwo-PCR

Für die Klonierung von eCLCA1 wurde zunächst der offene Leserahmen (ORF) mit Hilfe einer *Pwo*-Polymerase (Peqlab) amplifiziert. Die hierfür benötigten Primer wurden mit einem *Not* I-Linker (GCGGCCGC) versehen und flankierten jeweils *downstream* (5'TAGCGGC-CGCCTCAGCCCAAGGCTACTGAC-3') und *upstream* (5'-TAGCGGCCGCGATGGGGTCAT-TTAGAGTTCTGT-3') den ORF. Um mögliche Variationen der cDNA-Sequenz von eCLCA1 zu identifizieren, wurden als *template* cDNA von 15 verschiedenen Pferden in 15 separaten Reaktionen eingesetzt und die Amplifikate anschließend von der Firma SeqLab sequenziert. Für die Klonierung des ORF in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 wurde je ein Vertreter der auf diese Weise identifizierten zwei Genotypen (siehe Kapitel 5.2) eingesetzt. Die Reagenzien für die Reaktionsansätze I und II wurden gemäß Tabelle 8 auf Eis in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und jeder Reaktionsansatz für sich sorgfältig gemischt.

Tabelle 8: Reaktionsansätze für die *Pwo*-PCR

Reaktionsmix I

Reagenzien	Eingesetztes Volumen
dNTP-Mix (10 mM je dNTP; Invitrogen)	1,0 µl
<i>Forward</i> -Primer (20 mM)	2,0 µl
<i>Reverse</i> -Primer (20 mM)	2,0 µl
<i>template</i> *	0,25 µl
Aqua dest.	ad 25,0 µl

Reaktionsmix II

Reagenzien	Eingesetztes Volumen
10 x <i>Pwo</i> -Puffer	5,0 µl
<i>Pwo</i> -Polymerase (1U/µl)	1,0 µl
Aqua dest.	ad 25,0 µl

* Als *template* wurde in zwei getrennten PCR-Reaktionen cDNA von den Tieren Pfd I und 2506/03 eingesetzt.

Tabelle 9: Zeit-Temperatur-Programm für die *Pwo*-PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Zugabe des Polymerase-Mixes	80°C	3 min	
Denaturierung	95°C	40 sec	34 x
Anlagerung der Primer	65°C	40 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Verlängerung	72°C	10 min	
Kühlung bis zur Entnahme	4°C	∞	

Die 25 µl Reaktionsmix I wurden in ein dünnwandiges 0,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und das Programm gestartet. Im zweiten Programmschritt erfolgte die Zugabe der 25 µl Reaktionsmix II bei 80°C. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte eine Gelextraktion nach dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 4.4.3) und eine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels NanoDrop (PeqLab).

Not I-Verdau

Anschließend erfolgte ein Verdau der PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *Not I*. Hierzu wurden zunächst 2,4 µg des PCR-Produktes (mit den *Not I*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende des ORF) mit 2 µl *Not I* (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) und 10 µl Puffer 0 (Fermentas) auf Eis zusammenpipettiert und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Eine anschließende Inkubation von 10 min bei 65°C stoppte die enzymatische Reaktion und das Gemisch wurde 2 min auf Eis abgekühlt.

Es folgte eine Aufreinigung mit dem Qiagen Purification Kit (Qiagen). Zu den 100 µl *Not I*-behandelter DNA wurden 500 µl PB-Puffer pipettiert und auf die im Kit enthaltene Säule gegeben. Nach einer 1minütigen Zentrifugation bei 13.000 x *g* wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Nach einem weiteren, trockenen Zentrifugationsschritt wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Die auf der Membran gebundene DNA wurde anschließend in 30 µl EB-Puffer durch 1minütige Inkubation gelöst und durch 1minütige Zentrifugation bei 13.000 x *g* in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Integrität der geschnittenen eCLCA1-cDNA wurde durch Gelelektrophorese eines Reaktionsaliquots im Vergleich zu ungeschnittener eCLCA1-cDNA überprüft.

Ligation in einen Vektor

Es folgte nun die Ligation der geschnittenen eCLCA1-cDNA mit dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen). Hierzu wurden die Reagenzien entsprechend der Tabelle 10 zusammenpipettiert. Bei der cDNA handelte es sich um den nach dem oben beschriebenen Protokoll generierten, geschnittenen, mit *Not* I-Linkern versehenen ORF von Pferd Pfd I bzw. 2506/03.

Tabelle 10: Reaktionsmix für die Ligation

Reagenzien	VIL*	VL*	V*
Vektor pcDNA 3.1 (50 ng/µl)	1,0 µl	0,5 µl	0,5 µl
DNA (28 ng/µl)	13,0 µl	-	-
T4 Ligase (1U / µl; Invitrogen)	1,5 µl	0,5 µl	-
5 x T4-Ligasepuffer (Invitrogen)	4,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Aqua dest.	ad 20,0 µl	ad 10,0 µl	ad 10,0 µl

* VIL steht für das komplette Reaktionsgemisch mit Vektor, Insert und Ligase.

VL steht für die Vektor-Religationskontrolle mit Vektor und Ligase.

V steht für die Negativkontrolle mit Vektor allein.

Das Gemisch wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationserfolg wurde durch Gelelektrophorese eines Reaktionsaliquots im Vergleich zu unligierter eCLCA1-c-DNA und Vektor-DNA mit anschließender Dokumentation im BioDocanAnalyse-Video® (Biometra) unter UV-Licht kontrolliert.

Transformation in XL2-blue-Zellen

Zur Transformation des in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 ligierten eCLCA1-ORF in die ultrakompetenten *Escherichia coli* XL2-blue-Bakterien (Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurden diese zunächst auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden zu je 100 µl Zellen 2 µl β-ME (Sigma) hinzugegeben und 10 min auf Eis stehen gelassen. Alle 2 min wurden die Zellen während dieser Zeit vorsichtig geschneippt. Anschließend wurden zu 100 µl Zellen 5 µl Vektor-Insert-Ligase (VIL)-Gemisch gegeben und zu je 50 µl Zellen 2,5 µl Vektor-Ligase (VL)-Gemisch oder Vektor (V)-Gemisch. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der so genannte *heat shock*. Hierbei wurden die Bakterien zum Schluss der Zellmembranen und irreversiblen Einschluss des aufgenommenen Plasmides exakt 30 sec auf 42°C erhitzt. Nach dem *heat shock* ruhten die Zellen 2 min auf Eis. Anschließend wurden 900 µl (VIL) oder 450 µl (VL und V) auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben (Protokoll für LB-Medium siehe Anhang). Nach Inkubation der Zellen für 60 min bei 150 *rounds per minute* (rpm) und 37°C auf dem Schüttelblock wurden die drei Zellsuspensionen in unterschiedlichen Volumenanteilen vollständig ausplattiert.

Ausplattieren der Bakterien

Hierzu mussten zunächst die Nährböden präpariert werden. 5 g Trypton (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), 2,5 g Hefeextrakt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 5 g Natriumchlorid wurden in 400 ml Aqua dest. gelöst und der pH Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 500 ml aufgefüllt, und 5 g Agar (Aldrich, Steinheim) wurden hinzugegeben. Diese Nährbodenlösung wurde bei 121°C autoklaviert. Nachdem die Flüssigkeit auf 55°C abgekühlt war, wurden 25 mg Ampicillin (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Auf jede 10 cm-Petrischale wurden ca. 10 ml warme Nährbodenlösung gegeben. Nach vollständigem Erkalten wurden die nun fest gewordenen Agar-Platten bis zum Ausplattieren kopfüber bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Ausplattieren wurden unterschiedliche Mengen (von 20 µl bis 200 µl) der wie oben beschrieben vorbereiteten Zellsuspensionen steril auf die Platten gegeben und mit einem sterilen Spatel gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Platten für ca. 16 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Identifizierung und Subkultivierung von Einzelklonen

Während die Ansätze VL und V als Kontrollen dienten und nach Dokumentation des Bakterienwachstums verworfen wurden, wurden von den VIL-Platten mehrere Einzelkolonien mit sterilen 200 µl-Pipettenspitzen vorsichtig von der Platte gestrichen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 100 µl Aqua dest. überführt. Nach kurzem Vortexen wurden je 1 µl der Zellsuspension mittels einer PCR auf das Vorhandensein des gesuchten Plasmides untersucht.

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und das Zeit-Temperatur-Programm sind den Tabellen 3, 4 und 5 zu entnehmen. Als *forward*-Primer wurde T7 (Invitrogen) eingesetzt (Position nahe der Ligationsstelle auf dem pcDNA 3.1-Plasmid) und als *reverse*-Primer der unter eingangs bereits beschriebene *upstream*-Primer (5'-TAGCGGCCGCGATGGGGTCATTTAGAGTTCTGT-3'). Die T_A °C betrug 45°C und die Elongationszeit 2 min und 10 sec. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte und Durchleuchtung des Gels mit dem BioDocanAnalyze-Video® (Biometra) konnten die Klone mit korrekter Inkorporation des gewünschten Inserts anhand einer einzelnen, ca. 2,7 kb großen Bande identifiziert werden.

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA der positiven eCLCA1-Klone zu erhalten, wurde der entsprechende Bakterienklon in einem großem Ansatz vermehrt. Hierzu wurde zunächst zu der in Aqua dest. aufgenommenen Bakterienkolonie 1 ml LB-Medium hinzugegeben und eine Stunde auf dem Schüttelblock bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in einen mit durchlöcherter Aluminiumfolie abgedeckten, sterilen Erlenmeyerkolben mit 35 ml Ampicillin-versetztem LB-Medium überführt und für mindestens 10 h bei 37°C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Aus der nunmehr trüben Bakteriensuspension wurde das Plasmid mit dem Plasmid Purification Kit® (Qiagen) isoliert und aufgereinigt.

Isolierung und Aufreinigung der klonierten eCLCA1-cDNA

Die ca. 36 ml Zellsuspension wurden bei 4°C und 2.000 x g für 20 min in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach Autoklavieren entsorgt. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml P1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml P2-Puffer und sechsmaligem Invertieren wurde die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 ml 4°C kalter P3-Puffer hinzugegeben und nach fünfmaligem Invertieren die Suspension in die Spritze des QIA-Filters überführt. Es folgte eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nachdem die Qiagen-Tip-Säule mit 4 ml QBT-Puffer equilibriert war, wurde die Zellsuspension durch den QIA-Filter der Spritze auf die Säule gedrückt. Nachdem die gesamte Zellsuspension durch die Säule gelaufen war, wurde diese zweimalig mit je 10 ml QG-Puffer gewaschen. Die auf der Membran der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA aus diesem Eluat wurde nachfolgend präzipitiert. Hierzu wurden zu den 5 ml Eluat 3,5 ml Isopropanol gegeben. Die 8,5 ml wurden auf zehn 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 30 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt und 10 min wie zuvor zentrifugiert. Das Rest-Ethanol wurde mit einer 100 µl-Pipettenspitze aufgenommen und die Pellets daraufhin für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 100 µl 10 mM Tris-EDTA pH 8,0 resuspendiert und der DNA-Gehalt mittels Spektralphotometrie (NanoDrop, Peqlab) bestimmt. Die auf diese Weise erhaltene, klonierte eCLCA1-cDNA wurde von der Firma SeqLab sequenziert.

4.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) im *real-time*-Modus

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ermöglicht eine spezifische und sensitive Quantifizierung von Nukleinsäuren. Der Vorteil gegenüber der bereits vorgestellten, konventionellen PCR liegt in der Möglichkeit, nicht nur am Ende aller Amplifikationszyklen ein „Endprodukt“ darstellen zu können, sondern bereits nach jedem Zyklus die Zunahme des spezifischen Amplifikationsproduktes messen und somit die Ausgangskopienzahl in der Probe ermitteln zu können. Bei der qPCR wird ein *Thermocycler* mit integriertem Fluoreszenzdetektor eingesetzt. Für die Bindung der neu amplifizierten DNA-Kopien pro Zyklus an einen Fluoreszenzfarbstoff wurden hier zwei unterschiedliche Verfahren, *taqMan*-Sonden und das Fluorophor SYBRGreen, verwendet. Bei den Sonden handelte es sich um Oligonukleotide, welche am 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende TAMRA trugen. Nach Anregung emittiert der FAM-Farbstoff Licht einer bestimmten, detektierbaren Wellenlänge, welches durch das sich in räumlicher Nähe auf dem Oligonukleotid befindliche

TAMRA-Molekül in eine für das Gerät nicht detektierbare Wellenlänge umgewandelt wird. Nachdem die Sonde an eine passende, einzelsträngige *template*-Sequenz gebunden hat und durch die Endonukleaseaktivität der eingesetzten Polymerase gespalten wird, fällt diese Absorption weg, und das FAM-Signal kann von dem Fluoreszenzdetektor aufgenommen werden. Auf diese Weise wird jedes neu amplifizierte Molekül erfasst. SYBRGreen hingegen bindet ausschließlich, jedoch sequenzunabhängig an jede doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung nur im gebundenen Zustand Licht einer Wellenlänge von 520 nm. In beiden Verfahren kann durch Messung der Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus die jeweilige Menge an PCR-Produkten bestimmt werden.

Am Ende aller Amplifikationszyklen wurden die gesammelten Fluoreszenzwerte durch die MX Pro Software (Stratagene) zu einer Amplifikationskurve zusammengestellt. Zur Relativierung der Hintergrundfluoreszenz (zum Beispiel durch Transparenz- und Reflexionseigenschaften der verwendeten Mikroreaktionsgefäße) wurde ROX als passiver Referenzfarbstoff eingesetzt. Aus dem Quotienten der Fluoreszenzemission des Fluorophors (SYBRGreen bzw. FAM) und des passiven Referenzfarbstoffes (ROX) wurde ein normalisiertes Reportersignal (R_n -Wert) berechnet. Der ΔR_n -Wert wurde durch die Subtraktion des $R_n(-)$ -Wertes (Hintergrundfluoreszenz) vom $R_n(+)$ -Wert (relatives Reportersignal; FAM oder SYBRGreen) ermittelt. Durch Auftragen des logarithmierten ΔR_n -Wertes (Abszisse) gegen den jeweiligen PCR-Zyklus (Ordinate) in ein Koordinatensystem wurde die Amplifikationskurve erstellt. Da in den ersten Zyklen nur ein geringer Gehalt an PCR-Produkten vorhanden ist, beträgt die Steigung der Amplifikationskurve in den ersten Zyklen Null (Basislinie oder engl. *baseline*). Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich findet im Idealfall eine Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus statt, was sich in einem exponentiellen Anstieg ausdrückt. Im späteren Verlauf der Reaktion kommt es zu steigendem Substratverbrauch, und die Kurve flacht zunehmend ab. Für eine Verrechnung der ermittelten Amplifikationskurven wird deren Verlauf auf einen Zahlenwert, den Ct-Wert (engl. *cycle threshold value*), reduziert. Dieser Wert entspricht der Zykluszahl (engl. *cycle value*), bei welcher die Amplifikationskurve beim Übergang in den exponentiellen Bereich einen Schwellenwert (engl. *threshold*) überschreitet. Zur letztendlichen Berechnung der Kopienzahlen wird auf jeder 96-Well-Platte parallel zu den cDNA-Proben stets eine cDNA-Standardverdünnungsreihe (in der vorliegenden Arbeit in Zehnerpotenzen von 10^2 bis 10^8 Kopien) mit gemessen, so dass jeder Verdünnungsstufe dieser Standardreihe ein bestimmter Ct-Wert zugeordnet werden kann. Durch Interpolation der Ct-Werte der unbekannt Probe mit diesen so erhaltenen Standard-Ct-Werten kann schließlich die Anfangskopienzahl in der Probe ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden in jeder 96-well-Platte die Standardreihe grundsätzlich als Duplikate und die cDNA-Proben als Triplikate angesetzt. Diese Mehrfachmessung diente zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten.

4.6.1 Referenzfaktor (*Housekeeping-Gen*) EF-1a

Um etwaige Unterschiede zwischen den einzelnen Proben wie etwa eine differierende DNA-Qualität, DNA-Ausgangsmenge oder eine unterschiedliche Effektivität während der reversen Transkription auszugleichen, wurden alle Daten aus den qPCR-Experimenten gegen die mRNA-Kopienzahl eines Referenzfaktors (*Housekeeping-Gen*) normalisiert. Als Referenzfaktoren werden Kopien solcher mRNA-Sequenzen verwendet, die in allen Geweben zu jedem Zeitpunkt möglichst gleich stark exprimiert werden und durch äußere Einwirkungen möglichst wenig beeinflusst werden. Da in zahlreichen, vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die mRNA von EF-1a diesen Anforderungen genügt (Gruber und Levine, 1997; Schmidbauer et al., 2004) wurde EF-1a in dieser Studie als *Housekeeping-Gen* eingesetzt.

4.6.2 Herstellung der Mengenstandards

Für die Herstellung des Mengenstandards für EF-1a wurden Primer verwendet, welche das qPCR-Amplifikat flankieren (EF-1a SD *forward* AGCTGAGCGTGAACGTGGTA und EF-1a SD *reverse* CACCGCAACTGTCTGTCTCAT; Genbanknummer AY237113). Entsprechend der in Tabelle 3, 4 und 5 (Kapitel 4.4.1) beschriebenen Protokolle wurde ein 1114 bp großes PCR-Produkt hergestellt. Die Anlagerungstemperatur betrug 59°C. Als *template* wurde cDNA von Pferd Pfd I eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.5). Für den Mengenstandard für eCLCA1 wurden die zur Herstellung des eCLCA1-ORF generierten Primer und dort beschriebenen Protokolle verwendet (Kapitel 4.4.1). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (Protokoll siehe Kapitel 4.4.3). Die Konzentration der auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte wurde photometrisch im NanoDrop (Peqlab) bestimmt. Nach Berechnung der Kopienzahl pro μl wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von 10^2 bis 10^8 Kopien in DEPC-behandeltem Wasser („Wasser für die Molekularbiologie“; Roth) hergestellt, aliquotiert und bis zum Einsatz in der qPCR bei -20°C gelagert.

4.6.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) I: *taqMan*-Sonden

Im Folgenden werden die Untersuchungen zum Expressionsmuster von eCLCA1 in gesunden Pferden beschrieben, die mit Hilfe von *taqMan*-Sonden und dem MX 4000 qPCR-Cycler (Stratagene) im Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt wurden.

Auf einer 96-well-PCR-Reaktionsplatte wurden neben mehreren cDNA-Proben (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.5) aus verschiedenen Organen von 3 Pferden die Verdünnungsreihen der EF-

1a- und eCLCA1-Mengenstandards (Kapitel 4.6.2) von 10^2 bis 10^8 Kopien pro 25 μ l PCR-Reaktion sowie Negativkontrollen eingesetzt. Die Negativkontrollen enthielten statt *template* DEPC-behandeltes Wasser („Wasser für die Molekularbiologie“; Roth). Die Gewebe-cDNA-Proben wurden als Triplikate, die beiden Verdünnungsreihen und die Negativkontrollen als Duplikate untersucht. Zur Optimierung der qPCR wurden zunächst verschiedene Anlagerungstemperaturen (T_A von 56 bis 66°C) und Sondenkonzentrationen (100, 150 und 200 mmol/ μ l) getestet. Die Auswahl der Primer und Sonden (Tabelle 11) erfolgte mit Hilfe der Software *Beacon designer* der Firma PREMIER Biosoft International (Palo Alto, CA, USA). Sequenzvergleiche mit den Orthologen mCLCA3 und hCLCA1 gaben Hinweise auf mögliche Exon-Intron-Grenzen, welche bei der Auswahl der Primer zum Ausschluss der Amplifikation genomischer DNA berücksichtigt wurden. Die Synthese erfolgte durch die Firma Biomers.net (Ulm).

Tabelle 11: Primer und Sonden für die RT-qPCR mit *taqMan*-Sonden

Name	Sequenz 5'-3' (Nukleotidposition)	Tm*
	eCLCA1 Genbanknummer: AY524856	
e1 qPCR for	AAACACTCATTCAACAAATAAAGGA (177-201)	55,0°C
e1 qPCR rev	TTGGTCTCTCATACTCAGGTTT (299-320)	55,0°C
eCLCA1-Sonde	FAM-CCCAGGCATCTCCATATCTCTTTGAAGC-TAMRA (210-237)	65,0°C
	EF-1a Genbanknummer: AY237113	
EF-1a qPCR for	CAAAAACGACCCACCAATGG (759-778)	60,0°C
EF-1a qPCR rev	GGCCTGGATGGTTCAGGATA (808-826)	62,0°C
EF-1a-Sonde	FAM-AGCAGCTGGCTTCACTGCTCAGGTG-TAMRA (780-804)	68,5°C

*Tm bezeichnet die mittels *Beacon designer* Software ermittelte Schmelztemperatur (bei 100 mM NaCl).

Die Größe des eCLCA1-Amplikons betrug 144 bp, die des EF-1a-Amplikons 68 bp. Die Komponenten für den Reaktionsansatz (Tabelle 12) stammten bis auf das Wasser (Roth) aus dem Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit (Stratagene). Die eingesetzten Volumina beziehen sich auf einen einzelnen 25 μ l-Ansatz.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die RT-qPCR mit *taqMan*-Sonden

Reagenzien	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration
<i>taqMan</i> 10 x Puffer A	2,50 µl	1 x
dNTP-Mix (5 mM je dNTP)	1,00 µl	200 µM
MgCl ₂ (50 mM)	2,50 µl	5 mM
<i>forward</i> -Primer (20 µM)	0,38 µl	300 nM
<i>reverse</i> -Primer (20 µM)	0,38 µl	300 nM
<i>taqMan</i> -Sonde (50 µM)	0,10 µl	200 nM
200 x ROX-Lösung*	0,38 µl	1 x
SureStart <i>Taq-Polymerase</i> (5 U/µl)	0,13 µl	0,025 U/µl
cDNA- <i>template</i>	1,00 µl	
Wasser	ad 25,00 µl	

*Die 200 x ROX-Lösung wurde aus 1 µl ROX Farbstoff (1 mM), 179 µl Wasser (Roth) und 20 µl *taqMan* 10 x Puffer A hergestellt.

Der Einzelansatz wurde entsprechend der Gesamtzahl der Reaktionen um ein Vielfaches angesetzt. Die Reaktionskomponenten wurden auf Eis zusammengefügt und gründlich gemischt. Nach Aliquotierung wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl cDNA-*template* bzw. für die Negativkontrollen 1 µl Wasser (Roth) pipettiert. Die Reaktionsansätze mit den cDNA-Proben wurden als Triplikate in die Reaktionsgefäße überführt, die Standard- und Kontroll-Reaktionsansätze als Duplikate. Die vollständig beschickte 96-well-Platte wurde vor dem Einsetzen in das Gerät kurz zentrifugiert, um die Fluoreszenzmessung, die durch den Deckel des Reaktionsgefäßes erfolgte, nicht durch anhaftende Mikrotröpfchen zu beeinträchtigen. Am Gerät wurde FAM als Sondenfarbstoff und ROX als Referenzfarbstoff eingestellt, was zum automatischen Einsatz entsprechender Filter führte. Bei der Erstellung des Temperatur-Zeit-Profiles wurde nach vorhergehenden Optimierungsarbeiten eine Zwei-Schritt-PCR-Variante gewählt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zeit-Temperatur-Programm für die RT-qPCR mit *taqMan*-Sonden

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Anlagerung	55°C	1 min

← 39 x

4.6.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) II: SYBRGreen

Nach dem Wechsel der Arbeitsgruppe vom Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover an das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin wurden alle weiteren qPCR-Experimente an dem MX 3000™ (Stratagene) durchgeführt. Dies erforderte eine Neuetablierung der qPCR-Protokolle, in deren Verlauf auch der Brilliant®SYBR®Green qPCR MasterMix (Stratagene) getestet wurde. Die Vorversuche konnten keinen Unterschied zwischen den mittels *taqMan*-Sonden und den mittels SYBRGreen generierten Daten aufzeigen. Im Hinblick auf die erheblich geringeren Kosten kam deshalb bei den weiteren qPCR-Analysen ausschließlich SYBRGreen zum Einsatz. Das Design der Primer mit Hilfe der *Beacon designer* Software und ihre kommerzielle Synthese erfolgten analog zu dem Verfahren in der *taqMan*-qPCR (Kapitel 4.6.3).

Tabelle 14: Primer für die RT-qPCR mit SYBRGreen

Name	Sequenz 5'-3' (Nukleotidposition)	Tm*
	eCLCA1 Genbanknummer: AY524856	
e1 SYBR FOR	GAGGAGTGAACGCAGCCAGAC (2072-2092)	56,0°C
e1 SYBR REV	TCGGTGATTTGACAAGGTGGGAAG (2287-2310)	61,0°C
	EF-1a Genbanknummer: AY237113	
EF-1a SYBR FOR	CAATGTCAAGAACGTGTCC (701-720)	45,0°C
EF-1a SYBR REV	ACGACGATCAATCTTCTCCTTCAG (894-917)	56,0°C

* Tm gibt den von der Firma Biomers.net berechneten Schmelzpunkt an (bei 50 mmol/l K⁺).

Die Größe des Amplikons betrug für eCLCA1 238 bp und für EF-1a 213 bp. Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte während der Etablierung zum einen gelelektrophoretisch aufgetrennt und zum anderen sequenziert. Sowohl bei eCLCA1 als auch bei EF-1a trat jeweils nur eine Bande in der erwarteten Höhe auf. Die Sequenzierung ergab die erwartete Sequenz.

Wie eingangs erwähnt, wurde für die Untersuchungen des Expressionslevels von eCLCA1 in COB-kranken Pferden in Gesamtlungengewebsproben und in einzelnen Becherzellen, nach *laser capture microdissection* (Kapitel 4.8.4), der SYBRGreen Mastermix der Firma Stratagene verwendet. Abgesehen von dem Reaktionsansatz und Zeit-Temperatur-Programm gilt das bereits geschilderte Prozedere.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die RT-qPCR mit SYBRGreen

Reagenzien	Eingesetztes Volumen		Endkonzentration	
	eCLCA1	EF-1a	eCLCA1	EF-1a
2x Brilliant SYBRGreen [®] qPCR MasterMix	12,00 µl	12,00 µl	1 x	1 x
<i>forward</i> -Primer (20 µM)	0,38 µl	0,13 µl	300 nM	100 nM
<i>reverse</i> -Primer (20 µM)	0,38 µl	0,13 µl	300 nM	100 nM
200 x ROX-Lösung*	0,38 µl	0,38 µl	1 x	1 x
cDNA- <i>template</i>	1,00 µl	1,00 µl		
Wasser	ad 25,00 µl	ad 25,00 µl		

* Die 200 x ROX-Lösung wurde aus 1 µl ROX-Farbstoff (1 mM) und 199 µl Wasser (Roth) erstellt.

Tabelle 16: Zeit-Temperatur-Programm für die RT-qPCR mit SYBRGreen

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung	56°C	1 min
Elongation	72°C	10 min
Schmelzkurve	55°C - 95°C	30 min

← 39 x

Da das Fluorophor SYBRGreen sequenzunabhängig an jede doppelsträngige DNA bindet, kann in der Fluoreszenzmessung zwischen dem spezifischen, gesuchten PCR-Produkt, Artefakten und Primerdimeren nicht unterschieden werden. Aus diesem Grund wird im Anschluss an die durchlaufenen PCR-Zyklen eine so genannte Schmelzanalyse angeschlossen. Hierbei wird unter ständiger Kontrolle der Fluoreszenz die Temperatur schrittweise von 55°C auf 95°C erhöht. Sobald der spezifische Schmelzpunkt des PCR-Produktes erreicht ist, zerfällt dieses in einzelsträngige DNA, der gebundene Farbstoff wird freigesetzt und emittiert kein Licht mehr. Es kommt zu einem steilen Fluoreszenzabfall. Durch doppelt reziproke Darstellung des Verlaufs von Temperatur und Fluoreszenz kann der Schmelzpunkt als *peak* einer Kurve bestimmt werden. Bei der Auswertung der Schmelzkurvenanalyse wurden die Ergebnisse jeder Probe mit den durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüften Ergebnissen aus der Etablierung verglichen. Bei einer Abweichung des gemessenen Schmelzpunktes der RT-qPCR-Produkte von mehr als $\pm 1^\circ\text{C}$ vom in den Etablierungsversuchen ermittelten Schmelzpunkt wurde die entsprechende Messung von der Auswertung ausgeschlossen und die RT-qPCR-Analyse für die entsprechende Probe wiederholt.

4.6.5 Quantifizierung der Genexpression

Die Auswertung sämtlicher erhobener RT-qPCR-Daten und weiterführende Berechnung der Kopienzahlen erfolgten mittels der Analysis-Software MX Pro (Stratagene). Zur Quantifizierung der gesuchten cDNA-Kopienzahl in der jeweiligen Gewebeprobe wurde zunächst der Ct-Wert einer jeden Probe, basierend auf der normalisierten und gegen die Basislinie korrigierten Fluoreszenz (dRn), berechnet. Für jede Probe wurde der arithmetisch gemittelte Ct-Wert (\bar{x} ; aus den Triplikaten oder Duplikaten) zusammen mit der korrespondierenden Standardabweichung (SD) angegeben. Die mittlere cDNA-Kopienzahl der jeweiligen Probe und die SD wurden auf der Basis der Ergebnisse der Standardkurven des zugehörigen Laufes berechnet. Um Schwankungen zwischen den einzelnen Proben hinsichtlich cDNA-Qualität und -Menge auszugleichen, wurden die Kopienzahlen für eCLCA1 gegen die Kopienzahlen für EF-1a derselben Probe normalisiert. Diese normalisierten Kopienzahlwerte wurden demnach als relative Werte zu dem *Housekeeping*-Gen angegeben, dessen Ct-Werte und Kopienzahlen in den einzelnen Proben ebenfalls mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe und in doppelten Messdurchgängen ermittelt wurden.

4.7 Morphometrische Untersuchungen

Für neun Pferde wurde jeweils in den drei Lokalisationen der Trachea und den drei des Bronchialbaums (siehe Kapitel 4.1) das prozentuale Verhältnis von PAS-positiven Zellen oder immunhistochemisch eCLCA1-positiven Zellen zu der Gesamtzahl an Epithelzellen bestimmt. Der Durchmesser der Bronchien und Bronchiolen, die eine Becherzellmetaplasie aufwiesen, wurde mittels der Analysis Software (Soft Imaging System GmbH, Münster) ermittelt.

4.8 Ermittlung der eCLCA1-Expression pro Becherzelle

Um die eCLCA1-mRNA-Zahl pro Becherzelle zu ermitteln, wurde die Lasermikrodissektion (engl. *laser capture microdissection*, LCM) in Kombination mit der vorgestellten RT-qPCR eingesetzt. Bei der LCM wird ein durch einen NdYAG-Laser (Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat-Kristall) erzeugter Laserstrahl durch ein inverses Mikroskop geführt und auf wenige tausendstel Millimeter gebündelt. Durch reine Lichtenergie kann so organisches Material geschnitten und durch einen Laserimpuls mehrere Zentimeter in die Höhe katapultiert werden. Da auf diese Weise wenige 1.000 Zellen untersucht werden, sind die isolierbaren RNA-Mengen folglich sehr gering. Lange Inkubationszeiten in Wasser und wässrigen Lösungen lassen die RNA zusätzlich degradieren, so dass für die Gewebeschnitte, die für die mRNA-Isolation mittels LCM verwendet werden, modifizierte, extrem kurze Färbeprotokolle einge-

setzt werden. Für diesen Versuchsansatz war eine exakte Zählung der Becherzellen Voraussetzung, und da dieses im Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-gefärbten Kryostatschnitt nicht gewährleistet war (Vorversuche), mussten geeignete Spezialfärbungen verwendet werden. Da sich die für die Anfärbung von muzinhaltigen Zellen üblichen Färbungen wie die PAS-Reaktion oder die Alzian-Blau-Färbung nicht derart kürzen ließen (Vorversuche, hier nicht dargestellt), wurde eine Methode zur indirekten Bestimmung der Becherzellzahlen in den dissezierten Gewebeproben gewählt. Hierzu wurden zunächst ca. 6 µm dicke Kryostatschnitte von den bei -80°C gefrierkonservierten Gewebeproben angefertigt. Von je drei Serienschnitten wurde der zweite auf SuperFrost Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogen und mit der PAS-Reaktion gefärbt. Der erste und der dritte Schnitt wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit einer 1,35 µm dicken Polyethylen-Naphthalat-Membran beschichtet waren (PALM Microlaser Technologies, Bernried) und anschließend H.E. gefärbt (siehe 4.8.1).

4.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung für die Lasermikrodissektion

Die auf membranbeschichtete Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden zunächst 2 min in 95%igem Ethanol bei -25°C fixiert. Nach einer etwa 5minütigen Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden sie mit Hämalan nach Mayer (Protokoll siehe Anhang 10.2), welches mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt wurde, exakt 2 min gefärbt. Anschließend wurden sie 2 min lang in DEPC-behandeltem Wasser gespült und für 30 sec mit Eosin-Lösung (Protokoll siehe Anhang 10.2), welche ebenfalls mit DEPC-behandeltes Wasser hergestellt wurde, gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte durch kurzes Dippen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 75%, 100%) dehydriert und etwa 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

4.8.2 Färbung der Kryostatschnitte mittels PAS-Reaktion

Die Färbung der auf SuperFrost Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogenen Kryostatschnitte mittels PAS-Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll. Nach 10minütiger Fixation der Schnitte in Azeton folgte eine Inkubation für weitere 10 min in 1%iger Perjodsäure. Im Anschluss an ein 10minütiges Bad in fließendem Leitungswasser und zweimaliges Spülen (je 2 min) in Aqua dest. wurden die Schnitte für mindestens 20 min (höchstens jedoch 30 min) in Schiffsches Reagenz (Waldeck, Münster) verbracht. Anschließend wurden sie für 5 min in 40-50°C warmem Leitungswasser und dann wieder kurz in A. dest gespült. Nach 5minütigem Bad in Hämalan nach Mayer folgte das Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 bis 15 min. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und mit CV Mount (Leica, Bensheim) eingedeckt.

4.8.3 Bestimmung der Becherzellzahl

Die beiden H.E.-gefärbten ersten und dritten Serienschnitte dienten nun zur Exzision der Becherzellen in der LCM, während auf dem mit der PAS-Reaktion gefärbten zweiten Schnitt die exakte Anzahl aller Epithelzellen und Becherzellen des Bronchialepithels ermittelt wurde. Da es sich um unmittelbar aufeinander folgende Schnitte handelte, konnte die Anzahl der gezählten Zellen direkt von den PAS-Schnitten auf die H.E.-Schnitte übertragen werden. Dieses wurde zuvor exemplarisch durch reine PAS-Behandlung der Serienschnitte von 10 Gewebeproben und separate Auszählung der Zellzahlen auf jedem Schnitt überprüft. Auf diese Weise gelang es, indirekt in einem definierten Bereich des Bronchialepithels auf den lediglich H.E.-gefärbten Schnitten die exakte Anzahl an Becherzellen zu bestimmen.

4.8.4 Lasermikrodissektion und RNA-Isolation

Mittels LCM wurden nun diese definierten Bereiche des Bronchialepithels herausgeschnitten und durch einen Laserimpuls in einen zuvor mit 60 µl 1% β-ME haltiger RLT-Lösung (RLT-Lösung Bestandteil des RNeasy Mini Kit, Qiagen) präparierten und in den Cup-Halter invers eingespannten Deckel eines 0,5 ml-Reaktionsgefäßes katapultiert. Die Gesamtfläche der herausgetrennten Gewebestückchen lag bei 2,5 Mio µm². Nach beendeter LCM wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig aus der Haltevorrichtung gelöst und der Deckel vorsichtig geschlossen. Es folgte eine kurze Zentrifugation bei 13.000 x g, um die Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Das Volumen wurde mit 1% β-ME haltiger RLT-Lösung auf 350 µl aufgefüllt und die Flüssigkeit für ca. 60 sec gevortext. Die weitere Isolation und Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte nach den unter 4.3.2 und 4.3.3 beschriebenen Protokollen, resultierend in 30 µl Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser pro Probe. Die erhaltenen RNA-Mengen lagen unterhalb der Nachweisgrenze des NanoDrop® (< 2 ng/µl) (Peglab). Somit musste auf eine Mengen- und Reinheitsbestimmung der RNA verzichtet werden.

4.8.5 Reverse Transkription mit Superskript III

Für die Transkription dieser sehr geringen RNA-Mengen wurde die Superscript® III reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet, welche bereits ab 1 pg RNA eingesetzt werden kann. Alle Reagenzien wurden auf Eis zusammenpipettiert. Von den 30 µl der isolierten Gesamt-RNA (Kapitel 4.8.4) wurden 8 µl in einem 200 µl-Reaktionsgefäß mit 1 µl *random hexamers* (50 ng/µl) als Primer und 1 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP) gemischt. Während der Inkubation dieses Ansatzes für 5 min bei 65°C wurde der cDNA-Synthese-Mix nach dem in Tabelle 17 aufgeführten Protokoll als ein Vielfaches entsprechend der Reaktionsanzahl angesetzt.

Tabelle 17: cDNA-Synthese-Mix für Superscript® III reverse Transkriptase

Reagenzien	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration nach Zugabe zu den 10 µl RNA-Ansatz
10 x RT-Puffer	2 µl	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	5 mM
DTT (100 mM)	2 µl	10 mM
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl	2 U/µl
Superscript® III reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	10 U/µl

Pro Reaktion wurden 10 µl des cDNA-Synthese-Mixes zu dem 10 µl RNA-Ansatz gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst 10 min bei 25°C und anschließend weitere 50 min bei 50°C inkubiert. Durch ein 5minütiges Erhitzen auf 85°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Nach Abkühlung des Gemisches für 2 min auf Eis wurden 1 µl RNase H (2 U/µl) dazugegeben und erneut 20 min bei 37°C inkubiert. Die erstellte cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.8.6 Quantifizierung der eCLCA1 Expression pro Becherzelle

Entsprechend des bereits beschriebenen RT-qPCR-Protokolls (siehe Kapitel 4.6.4) wurden zunächst die eCLCA1- und EF-1a-Kopienzahlen in den LCM-Proben bestimmt. Aus den immunhistochemischen und morphometrischen Untersuchungen (Kapitel 5.5.1 und 5.6.5) war bekannt, dass eCLCA1 im Bronchialepithel ausschließlich in Becherzellen exprimiert wird. Da die exakte Anzahl an Becherzellen in der LCM-Probe zuvor ausgezählt wurde (siehe Kapitel 4.8.3), konnten somit die eCLCA1-Kopienzahlen pro Becherzelle berechnet werden. EF-1a hingegen wird in konstanterem Niveau gleichermaßen von allen Epithelzellen einschließlich der Becherzellen exprimiert (Gruber und Levine, 1997; Schmidbauer et al., 2004), folglich wurde der Berechnung der EF-1a-Kopienzahlen pro Zelle die Gesamtzahl aller gezählten Zellen (Becherzellen und andere Epithelzellen) zugrunde gelegt. Anschließend erfolgte wieder die Normierung der eCLCA1-Kopienzahlen pro Becherzelle gegen die EF-1a-Kopienzahlen pro Becherzelle, um abweichende RNA- und cDNA-Qualitäten und -Quantitäten auszugleichen.

4.9 Nachweis der eCLCA 1-mRNA mittels Northern Blot Analyse

RNA-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden zu 9 µl RNA-Probenpuffer (Protokoll siehe Anhang 10.4.2) 3 µl der entsprechenden RNA-Probe (max. 40 µg) gegeben und 10 min im 75°C warmen Wasserbad inkubiert. Zu Gesamt-RNA-Proben wurden je 3 µl Glycerin-Farbstoffpuffer mit Ethidiumbromid (Protokoll siehe Anhang 10.4.2) gegeben, zu poly-A⁺-RNA-Proben die gleiche Menge Puffer ohne Ethidiumbromid (Protokoll siehe Anhang 10.4.2). Die Geltaschen wurden luftblasenfrei mit dem Gemisch beladen. Die RNA-Proben wurden anschließend für ca. 3 Stunden bei 100 Volt (Elektrodenabstand 12 cm) im 1%igen Agarosegel mit Formaldehyd (Protokoll siehe Anhang 10.4.2) elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht durchleuchtet und mit dem BioDocanAnalyse-Video[®] (Biometra) digital fotografiert.

Northern Blot Analyse

Durch den Northern Blot wurde die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennte, negativ geladene RNA an eine positiv geladene Nylonmembran gebunden. Hierzu wurde das Gel zweimal 30 min lang in 2 x SSC (Protokoll siehe Anhang 10.4.2) gewaschen. Ein auf die Größe des Gels zurechtgeschnittenes Stück Nylonmembran (Nytran N; Schleicher und Schüll, BioScience, Dassel) wurde währenddessen erst in destilliertem Wasser und dann in 2 x SSC equilibriert. Für das Blotting durch Kapillarkräfte wurde ein genügend großer, verschließbarer Kunststoffbehälter wie folgt beschickt. Mittig auf den Boden wurde ein ca. 2-3 cm hoher Filterpapierstapel mit geringfügig größerer Grundfläche als das Gel verbracht. Die letzten 3 Filterpapiere wurden so zugeschnitten, dass sie an zwei Seiten über den Stapel hinaus auf den Boden ragten. Der Behälter wurde anschließend mit ca. 1 l 20 x SSC gefüllt. Auf den Filterpapiersockel wurde luftblasenfrei das vorbereitete Gel gelegt und auf dieses wiederum luftblasenfrei die Membran. Die Ränder der Membran wurden mit einer wasserundurchlässigen Klarsichtfolie abgedeckt, um einen *side flow* der Salzlösung an Gel und Membran vorbei zu vermeiden. Es folgten drei in 20 x SSC getränkte Filterpapiere in der Größe der Membran. Der Raum zwischen diesem Aufbau und dem Deckel der Box wurde abschließend mit einer Lage trockenen Filterpapiers ausgefüllt, der Deckel mit leichtem Druck geschlossen und mit einem 500 g schweren Gewicht mittig über der Blottinganordnung beschwert. Das Blotting erfolgte für mindestens 12 h. Um die RNA kovalent auf der Membran zu binden, wurde diese nach dem Blotting bei 80°C für 2 h erhitzt.

Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Die Sonden für die Hybridisierung der geblohteten RNA-Membranen wurden mit dem RadPrime DNA Labeling System (Invitrogen) radioaktiv markiert. Dazu wurden 25 ng DNA-*template* gelöst in 20 µl Aqua dest. 5 min lang im Heizblock auf 95°C erhitzt. Je 1 µl dATP-, dGTP- und dTTP-Lösung und 20 µl 2,5 x RadPrime-Puffer wurden hinzugegeben und untergemischt. Alle weiteren Arbeiten erfolgten aufgrund des Einsatzes radioaktiver Substanzen nach den Regeln für den Umgang mit diesen Stoffen und in einem gesonderten Strahlenschutzlabor. So erfolgte die Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP-Lösung (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) hinter einer Plexiglasplatte. Nach der Zugabe von 1 µl Klenow Fragment (Fragment der DNA-Polymerase I; 40 U/µl; Invitrogen) wurde das Gemisch für 10 min bei 37°C hinter Plexiglas inkubiert und nach der Zugabe von 5 µl Stop-Puffer bis zur Hybridisierung der Membran auf Eis gestellt.

Hybridisierung der Membran

Um die auf der Membran gebundene RNA spezifisch nachzuweisen, wurde die Membran mit der entsprechend vorbereiteten DNA-Sonde hybridisiert. Es erfolgte zunächst ein Prähybridisierungsschritt, um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Hierzu wurde die Membran mit 15 ml einer 60°C warmen ExpressHyp[®] Hybridisation Solution (BD BioScience, Palo Alto, Kalifornien, USA) in einer Plastikfolie eingeschweißt und 30 min bei 60°C und 30 rpm im Wasserbad geschwenkt. Für die Hybridisierung wurden 10 µl der vorbereiteten DNA-Sonde mit 30 µl Aqua dest. für 5 min im Heizblock auf 95°C erhitzt und anschließend kurz auf Eis gestellt. Nach Zugabe der 40 µl Sonden-Lösung zu 15 ml 60°C warmer, neuer ExpressHyp[®]-Lösung wurde die Membran mit dieser Lösung erneut eingeschweißt und eine Stunde bei 65°C und 30 rpm im Wasserbad schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min in 2 x SSC mit 0,1% Natriumlaurylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfat*, SDS; Roth), einmal 10 min in 1 x SSC mit 0,1% SDS und drei mal 10 min mit 0,3 x SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 30 rpm im Wasserbad schwenkend gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde die Membran feucht und luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und bis zur weiteren Verwendung unter Abschirmung bei 4°C gelagert.

Exposition und Entwicklung der Röntgenfilme

Die Visualisierung der an die RNA auf der Membran gebundenen DNA-Sonde erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms. Eine Filmkassette (HypercassetteTM, Amersham Life Science) wurde hierzu zunächst mit einem Filterpapier ausgelegt, welches eventuell austretende Flüssigkeit von der feuchten Membran her aufsaugen und vom Röntgenfilm fernhalten sollte. Auf das Filterpapier wurde die in die Folie eingeschlagene Membran mit der RNA-Seite nach oben gelegt und mit Tesafilm fixiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten in absoluter Dunkelheit im Fotolabor, um den extrem lichtempfindlichen Film vor einer ungewollten Belichtung zu schützen. Ein BioMax[®] MS Film (20,3 cm x 25,4 cm; Kodak, New York, NY, USA) wurde im Dunkeln auf die Membran in die Kassette gelegt, mit einer Verstärkerfolie (BioMax[®] TranScreen-HE Intensifying Screen, Kodak) abgedeckt, nach dem Schließen in eine licht- und feuchtigkeitsundurchlässige Plastikfolie eingeschlagen und je nach Strahlungsintensität der Membran bis zur ausreichenden Exposition des Röntgenfilms für unterschiedliche Zeitdauer (2 h bis 24 h) bei -80°C inkubiert. Nach allmählichem Erwärmen der Kassette bei Raumtemperatur erfolgte die Filmentwicklung wiederum in absoluter Dunkelheit. Für die Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilms wurden konventionelle Bäder verwendet. Der Film wurde zunächst für 3 min ins Entwicklerbad gehalten, dann für 3 min in Leitungswasser und schließlich für 4 min in das Fixierbad. Anschließend wurde der Film für 15 min im Wasserbad gespült und zum tropfenfreien Abfließen des Restflüssigkeit während des Trocknens einige Male durch ein leichtes Seifenwasser gezogen. Der Film trocknete 20 min bei 55°C im Trockenschrank. Zur Digitalisierung und Datensicherung wurde er abschließend im Durchlichtverfahren eingescannt.

4.10 Nachweis des eCLCA1-Proteins mittels Western Blot Analyse

4.10.1 Herstellung eines Proteinlysates aus Gesamtgewebeproben

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Gesamtgewebeproben (Lunge und Kolon) wurden zunächst 100 mg tiefgefrorenes Gewebe abgewogen und in einem Mörser zerkleinert und mit 1,1 ml Lysis-Puffer (Protokoll siehe Anlage 10.4.3) 2 min gevortext. Nachdem das Lysat 30 min bei 4°C inkubiert hatte, wurde es bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert, und es wurden ca. 1 ml Überstand für die weiteren Untersuchungen abgenommen.

Abschließend wurde die Proteinmenge nach der Biuret-Methode mit Hilfe des BCA Kits (Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, USA) in einem Eppendorf Photometer bestimmt.

4.10.2 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli 1970) und dem Protean™ II Elektrophorese-System (Biorad, München). Dazu wurden für die 10%igen Gele in einem Becherglas die Komponenten für ein Trenngel wie nach Tabelle 18 zusammengefügt und gut gemischt worden. Die 10%ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung wurde als letzte Komponente hinzugegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Trenngels

Reagenzien	Für das Mini-Protean™ II Elektrophorese-System	Endkonzentration
Aqua bidest.	2000 µl	
30%iges Acrylamid	1600 µl	10%
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	1300 µl	390 mM
10%iges SDS	50 µl	0,1%
TEMED	4 µl	0,08%
10%ige APS-Lösung	50 µl	0,1%
Endvolumen	5000 µl	

Das Gemisch wurde zwischen die zuvor sorgfältig gereinigten und trockenen Glasplatten des vorbereiteten Systems gegossen und mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach einer Stunde wurde das Isopropanol abgegossen und mittels dreimaligem Spülen mit Aqua bidest. abgewaschen. Anschließend wurde das Trenngel mit einem entsprechend dem in Tabelle 19 aufgeführten Protokoll hergestellten Sammelgel überschichtet.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Sammelgels

Reagenzien	Für das Mini-Protean™ II Elektrophorese-System	Endkonzentration
Aqua bidest.	1400 µl	
30%iges Acrylamid	330 µl	5,1%
1,0 M Tris-HCL, pH 6,8	250 µl	125 mM
10%iges SDS	20 µl	0,1%
TEMED	2 µl	0,1%
10%ige APS-Lösung	20 µl	0,1%
Endvolumen	2000 µl	

Zum Formen der Geltaschen wurde ein zu dem System gehörender Kamm in das noch flüssige Sammelgel blasenfrei geschoben. Nach erfolgter Auspolymerisation des Gels (mind. 1,5 h und maximal 3 h) wurden der Kamm entfernt und das Gel in die vorbereitete Laufkammer montiert, welche mit 1x Elektrophoresepuffer (Protokoll siehe Anhang) gefüllt wurde.

In jede Geltasche wurden etwa 40 µg Protein gegeben. Die Proben wurden mit 3x Lämmli-Puffer (Protokoll siehe Anhang) versetzt (Endvolumen 70 µl) und für 10 min bei 95°C erhitzt. Danach wurden sie in die Geltaschen gegeben und der Größe nach elektrophoretisch bei 200 V für 55 min aufgetrennt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Leiter (Fermentas LifeSciences, St. Leon-Rot) eingesetzt.

4.10.3 Western Blot Analyse

Zur Aufbereitung der für die Western Blot Analyse bestimmten Gele (siehe Kapitel 4.10.2) wurden die Proteine auf dem Gel mit Hilfe des Mini Trans-Blot™ Elektrophorese Transfersystem (Biorad) vom Gel auf eine Zellulose Nitrat Membran (Protran™ BA 85 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) bei 90 Volt für 2 h in einem Transferpuffer (Protokoll siehe Anhang 10.4.3) transferiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 90 min bei Raumtemperatur im Blockierungspuffer (Protokoll siehe Anhang 10.4.3). Anschließend wurde das anti-eCLCA1 spezifische Antiserum eC4r bzw. eC10r (Kapitel 4.11.1) für die Detektion des Proteins in den Blockierungspuffer in einer Konzentration von 1:500 bzw. 1:200 gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal in Tween-haltiger Tris-gepufferter Salzlösung (TTBS; Protokoll siehe Anhang 10.4.3) für je 10 min gewaschen. Anschließend wurde sie für 1 h mit dem Zweitantikörper anti-rabbit IgG (*anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG antibody*; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) in TTBS in einer Konzentration von 1:2.000 inkubiert. Die Membran wurde wieder dreimal in TTBS für je 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem *enhanced chemiluminescence* (ECL) Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und mit Hilfe des ChemiDOC XRS Geldokumentationssystems der Firma Biorad.

4.11 eCLCA1-Proteinnachweis am histologischen Präparat

4.11.1 Herstellung von Antikörpern gegen eCLCA1

Die polyklonalen Antikörper für die immunhistochemischen Arbeiten wurden von den Firmen BioGenes (Berlin) und Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Es wurden insgesamt fünf jeweils 16 Aminosäuren lange Oligopeptide für die Immunisierung von zehn Kaninchen ausgewählt, synthetisiert und an *keyhole limpet haemocyanin* (KLH) als Trägerprotein gekoppelt (siehe Tabelle 20). Zwei der Oligopeptide wurde von der Firma BioGenes zur Immunisierung eingesetzt, die anderen drei von der Firma Eurogentec (siehe Tabelle 20). Die Firma BioGenes verfolgte folgendes Immunisierungsschema: Drei Immunisierungen folgten im Abstand von jeweils sieben Tagen aufeinander, nach sieben weiteren Tagen wurden 20 ml Serum gewonnen und die Tiere erneut geboostet. Nach einer weiteren Woche wurden nochmals 30 ml Serum gewonnen. Die Tiere wurden 3 Wochen nach dieser Blutentnahme ein letztes Mal geboostet und sieben Tage später (insgesamt 63 Tage nach der Erstimmunisierung) final ausgeblutet, wobei erneut 50 ml Serum gewonnen wurden. Das Immunisierungsschema der Firma Eurogentec verlief wie folgt: Die Kaninchen wurden dreimal im Abstand von 14 Tagen immunisiert. Am 38. Tag nach Erstimmunisierung erfolgte die erste Blutung, wobei 2 ml Serum gewonnen wurden. Nach einer vierten Boosterung am 56. Tag wurden am 66. Tag 40 ml Serum und final am 80. Tag nach Erstimmunisierung 60 ml Serum gewonnen. Weiterführend wurden drei der zehn erhaltenen Antiseren (siehe Tabelle 20) gegen das jeweils benutzte Oligopeptid durch die Firmen Eurogentec und BioGenes Säulen-immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt.

Tabelle 20: Bezeichnung der Antikörper und Peptidsequenzen, gegen die diese gerichtet sind

Bezeichnung des Antikörpers / Präimmunserums	Peptidsequenz (Nummer der Aminosäuren)	Firma
eC1 / eP1	CAFVTIRKKYKTDGSE (392 – 406)	BioGenes
eC2 / eP2	“	BioGenes
eC3 / eP3	CVPENWGTKPEYERPK (81 – 95)	BioGenes
eC4 / eP4 eC4r (immunaffinitäts- chromatographisch aufgereinigt)	“ “	BioGenes
eC5 / eP5	NPPGNDQPYTEQMGKC (110 -125)	Eurogentec
eC6 / eP6	“	Eurogentec
eC7 / eP7	CDESEDFKKTTPMTAQP (278 – 292)	Eurogentec
eC8 / eP8 eC8r (immunaffinitäts- chromatographisch aufgereinigt)	“ “	Eurogentec
eC9 / eP9	TPPETPSPSLPCPDSN (870 – 885)	Eurogentec
eC10 / eP10 eC10r (immunaffinitäts- chromatographisch aufgereinigt)	“ “	Eurogentec

4.11.2 Immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex Methode (ABC-Methode)

Die auf SuperFrost® Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogenen Gewebeschnitte (siehe Kapitel 4.2) wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Reihe war wie folgt aufgebaut: zweimal je 5 min in Xylol, einmal 5 min in Isopropanol und einmal 2-3 min in 96%igem Ethanol. Anschließend folgten 3 Spülvorgänge von je 5 min in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; Protokoll siehe Anhang 10.3). Zur Demaskierung der Antigene wurde eine 20minütige Behandlung mit einer 0,05%iger-Pronase-E-Lösung (Merck, Darmstadt; Protokoll siehe Anhang 10.3) durchgeführt. Während der Etablierung wurden weitere Demaskierungstechniken, wie die Erhitzung der Schnitte in einem 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) mittels Mikrowelle (700 W) und eine Kombination aus einer Mikrowellenbehandlung nach einer Pronase-E-Digestion getestet. Nachdem erneut dreimal je 5 min in PBS gespült wurde, erfolgte die Hemmung der endogenen Phosphatase in 85%igem Ethanol mit 0,5% Wasserstoffperoxyd. Auch nach diesem Schritt wurde dreimal in PBS gespült, die Objektträger in Coverplates® (Thermo Electron GmbH, Dreieich) überführt und in die dazugehörige Kassette eingesetzt. Um

unspezifische Bindungsstellen auf dem Gewebe zu blockieren, wurden die Schnitte mit 100 µl in PBS 1:5 verdünntem Ziegennormalserum überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der in Tabelle 20 aufgeführten Antiseren in Verdünnungsstufen von 1:500, 1:750, 1:1.500, 1:5.000 und 1:10.000 auf die Schnitte gegeben oder die dazugehörigen Präimmunseren als Negativkontrolle. Als Verdünnungsmedium diente PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde dreimal je 5 min mit PBS gespült. Der Sekundärantikörper, ein biotinylierter „Ziege-anti-Kaninchen“-Antikörper (Biologo, Kronshagen) wurde in PBS 1:200 verdünnt und mit einem Volumen von 100 µl pro Schnitt eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal jeweils für 5 min mit PBS gespült. Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Gebrauchslösung (Elite® Standard PK 6100; Biologo) wurde 30 min vor Gebrauch nach Herstellerangaben angesetzt. Pro Schnitt wurden 100 µl eingesetzt. Nach 30minütiger Inkubationszeit wurde erneut dreimal für jeweils 5 min mit PBS gespült. Die Objektträger wurden aus den Coverplates® entfernt und in Glashalter überführt. Schließlich wurden die Schnitte für 3 bis 5 min in einer 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Gebrauchslösung (Protokoll siehe Anhang 10.3) inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min mit PBS und 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte für 15 sec in Hämalaun nach Mayer. Die Schnitte wurden anschließend 12 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2-3 min 70%iges und 96%iges Ethanol, 5 min Isopropanol und zweimal je 5 min Xylol) und eingedeckt.

5. Ergebnisse

5.1 Identifizierung eines equinen CLCA-Homologen

Um zu untersuchen, ob ein equiner Homologe zu mCLCA3 existiert, wurde eine Northern Blot Hybridisierung durchgeführt. In muriner und equiner mRNA, gewonnen aus dem Kolon, konnte mit einer mCLCA3-DNA-Sonde bei der Maus und beim Pferd ein spezifisches mRNA-Signal nachgewiesen werden. Dieses stellte sich beim Pferd unwesentlich kleiner als die 3,0 kb große mCLCA3-mRNA dar (Abbildung 3). Um eine Vergleichbarkeit der geladenen RNA Mengen zu gewährleisten, wurden beide Proben mit einer EF-1a-DNA-Sonde hybridisiert. Es wurde in beiden Proben etwa die gleiche Menge EF-1a-mRNA nachgewiesen.

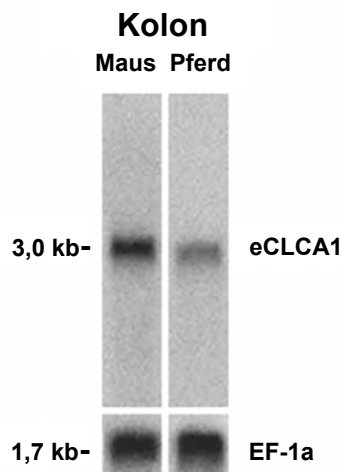


Abbildung 3: Northern Blot Hybridisierung muriner und equiner poly A⁺-RNA aus dem Kolon mit einer mCLCA3-Sonde und einer EF-1a-Sonde als Ladungskontrolle

5.2 Sequenzierung von eCLCA1

Der ORF wurde entsprechend der in Kapitel 4.4 aufgeführten Protokolle mittels RT-PCR und anschließender RACE hergestellt und von der Firma SeqLab sequenziert. Als *template* wurde zunächst cDNA, gewonnen aus der Rektumprobe von Pferd Pfd I, eingesetzt. Die Gesamtlänge des ORF von eCLCA1 betrug 2742 bp, was die mittels Northern Blot Hybridisierung generierte Bande bestätigte.

Die eCLCA1 cDNA-Sequenz wurde unter der Genbanknummer AY524856 veröffentlicht.

Der Vergleich des offenen Leserahmens von 14 verschiedenen Pferden identifizierte insgesamt drei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen an den Nukleotidpositionen 1518, 1533 und 1837 (Abbildung 4). Während die ersten beiden Variationen zu einem Aminosäureaustausch von Histidin zu Arginin bzw. Valin zu Leuzin führen, bleibt die dritte nur auf die Nukleotidsequenz beschränkt. Sieben Pferde waren heterozygot für alle drei Positionen (Genotyp B), drei homozygot für den Genotyp A und vier homozygot für Genotyp C. Ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp eines Pferdes und einer COB-Erkrankung konnte zunächst nicht sicher festgestellt werden (Tabelle 21).

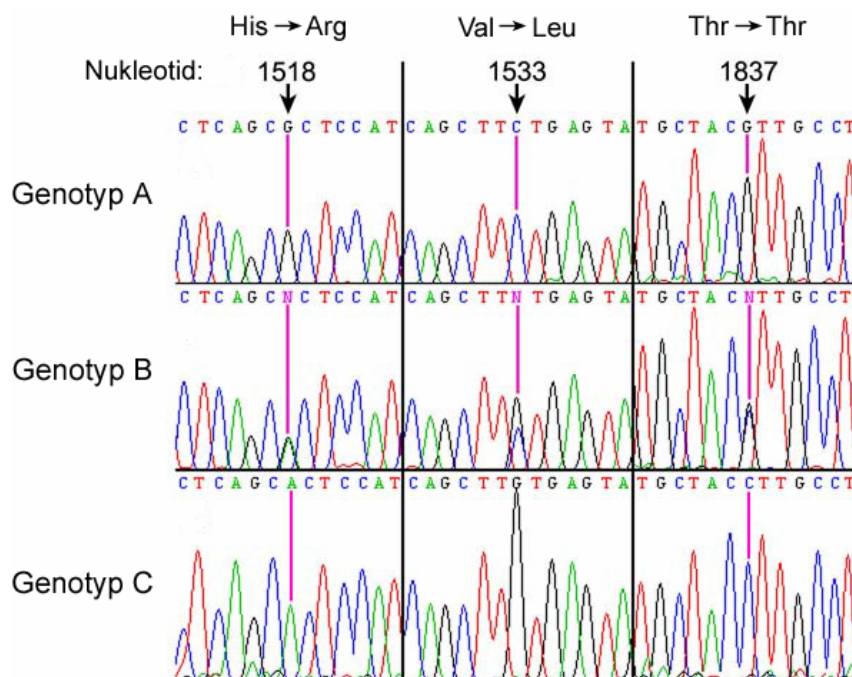


Abbildung 4: Ausschnitte der cDNA-Sequenz mit Elektropherogramm aus dem offenen Leserahmen von eCLCA1 von drei verschiedenen Pferden mit drei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen. Genotypen A und C sind homozygot und Genotyp B ist heterozygot in allen drei Positionen. Die Variationen an Nukleotidpositionen 1518 und 1533 resultieren in einem Aminosäureaustausch. Die Variation an Nukleotidposition 1837 bleibt ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Die senkrechten, schwarzen Linien separieren die einzelnen Abschnitte der cDNA-Sequenz.

Tabelle 21: Genotypen und histologische Lungenbefunde der 14 Pferde

Pferd	Genotyp	Lungenbefund
1123/04	A	histologisch ohne besonderen Befund
1863/04	A	histologisch ohne besonderen Befund
Pfd I	A	histologisch ohne besonderen Befund
0290/04	B	ggr. katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie
1809/04	B	mgr. lympho-plasmazelluläre und histiozytäre Infiltration und hgr. Aktivierung des BALT
1836/04	B	hgr. COB
3036/03	B	histologisch ohne besonderen Befund
1949/04	B	histologisch ohne besonderen Befund
2043/04	B	histologisch ohne besonderen Befund
Pfd II	B	histologisch ohne besonderen Befund
2506/03	C	hgr. COB
2563/03	C	histologisch ohne besonderen Befund
1872/04	C	histologisch ohne besonderen Befund
2224/04	C	histologisch ohne besonderen Befund

Die Analyse der vorhergesagten eCLCA1-Proteinsequenz mit Hilfe der DNASTar Software (GATC Biotech) konnte einige, bereits für andere Mitglieder der CLCA-Genfamilie bekannte Muster aufzeigen. Das 913 Aminosäuren große Polypeptid von eCLCA1 weist zwischen Aminosäuren 187 und 223 eine in der CLCA-Genfamilie hochkonservierte Multicysteinsequenz (Elble et al., 1997) auf. Darüber hinaus konnten sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen und drei mögliche Phosphorylierungsstellen für Kalzium/Calmodulin-kinase II identifiziert werden (Abbildung 5). Eine weitere, umfangreiche Sequenzanalyse sowie experimentelle Untersuchungen zur Proteinstruktur, Proteinprozessierung und zu möglichen Transmembrandomänen erfolgte in einer separaten Dissertation (Mundhenk, 2007, Freie Universität Berlin).

<u>SS</u>									
MGSPKSSVFI	LVLHLLEGAL	SNSLIHLMMN	GVEGIVIAID	PMVPEDETLI	QQIKDMVTQA	SPYLFEATEK	RFYFKNVAIL		80
VPENMKTKE	YERPKLETYK	NADVLVAEPN	PPGNDQPYTE	QMCKCCEKGE	RIYFTPDFLA	GKRLDEYGPQ	GRVFDHEWAN		160
LRWGLFMEYN	DDQKFYLSNK	EIKPVKCSAD	IAGKNVVMHC	QGGSCATKPC	RRDRVTGLYA	QECEFIPDEQ	QTEKASIMFS		240
QSIDSUVEFC	TEENHNREAP	NMQNQRCMLR	STWEVIRDSE	DFKKTTPMTA	QPPQPTFSLI	QIGQRIUCLV	LDKSGSMAIG		320
DRLKRLTQAG	KLFLLTQVEQ	GSWVGWTFD	SAAYVQSALR	QIKGGTDRDA	LTKSLPTVAS	GGTSICSGLR	SAFTVIRKKY		400
KTDGSEIVLL	TDGEDMTISS	CFNEVKQSGA	IINTVALGPS	AAAELEELSK	MTGGLQTYAS	DQAQNWGLID	AFGALSSGNG		480
^R AUSQHSIQLV	^L SRGSTLQNSQ	*WMINGTUIVDS	*TUGNDTLFLI	TWTSQPPQIL	LWDPSGKKQD	GFVVDITNTKM	AYLQVPGTAK		560
VGTWTYSLQA	SSQTLTLTVT	SRASSATLPP	VTVTSKUNKD	TGKFPSPVVV	YAKIHQGGLP	ILRATVTAI	ESVDGKTVTL		640
ELLDNGAGAD	ATKDDGIYSR	●YFTAYNTNGR	YSIKUWALGG	VNAARQMGIS	QONGAMYRAG	RMKNGEIMW	PPRPKINIDD		720
LLSKQVFSR	●TSSGGSFVAS	NVPNAPIPDL	FPPCQITDLK	AKIQGDSLIN	*LTWTAPGDDY	DHGRADRYII	●RISTNILDLR		800
*DKFNDLQVN	*TTDLIPKEAT	SEEVVDFKPE	*NIAPENGTDL	FIAIQAUDEV	DLESEISMIA	QUSLFLPPQT	PPETPSPSLP		880
*CPDSNITSAI	PGIHILKUMW	KWLGELQLSV	ALG						913

Abbildung 5: Aminosäuresequenz des primären eCLCA1-Translationsproduktes; SS bezeichnet eine ca. 20 Aminosäuren lange, hydrophobe Signalsequenz. Die Multicysteinsequenz ist durch senkrechte Pfeile markiert. Die Sterne kennzeichnen potentielle N-Glykosylierungsstellen und die ausgefüllten Kreise die möglichen Kalzium/Calmodulinkinase II Phosphorylierungsstellen. Die durch die SNPs bedingten Aminosäureaustausche sind durch die entsprechenden Buchstaben übereinander an der entsprechenden Position gekennzeichnet. Die Zahlen geben die Position jeweils der letzten Aminosäure pro Zeile an.

5.3 Phylogenetische Einordnung

Um die verwandtschaftliche Beziehung des neuen CLCA-Vertreters zu den übrigen Mitgliedern der CLCA-Genfamilie zu überprüfen und darzustellen, wurde ein phylogenetischer Baum mit dem Lasergene DNASTar (GATC Biotech) und der Clustal V Methode erstellt (Abbildung 6). eCLCA1 steht demnach in einem *Cluster* mit mCLCA3 der Maus, pCLCA1 des Schweines und hCLCA1 des Menschen. Die cDNA-Sequenzhomologie des offenen Leserahmens liegt zum Menschen bei 81,1%, zum Schwein bei 78,2% und zur Maus bei 71,4%.

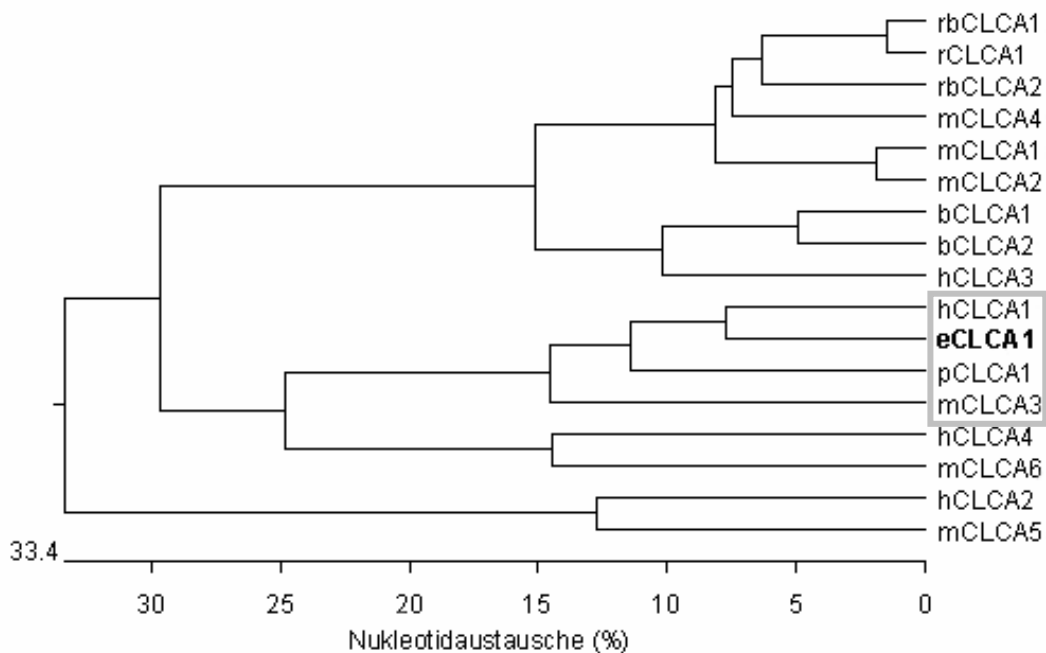


Abbildung 6: Phylogenetischer Baum aller derzeit bekannten Mitglieder der CLCA-Genfamilie (cDNA-Sequenzen; Clustal V Methode; DNASTar Lasergene 7 Software, GATC Biotech); das neue CLCA-Familienmitglied eCLCA1 steht in einem *Cluster* mit hCLCA1, pCLCA1 und mCLCA3 (verdeutlicht durch grauen Kasten). Die vorangestellten Minuskeln bezeichnen die Spezies (h für human, Mensch; m für murin, Maus; b für bovin, Rind; p für porzin, Schwein; r für rattus, Ratte; abweichend von der vereinheitlichten Nomenklatur rb für *rat brain*, Ratte, Gehirn) und die Zahl die Reihenfolge der Entdeckung.

5.4 Beurteilung der Lungengesundheit der untersuchten Pferde

Von allen Lungen- und Tracheaprobe n der 102 Pferde wurden zunächst Serienschnitte der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Organproben angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.) sowie mittels PAS-Reaktion gefärbt und histologisch untersucht.

Folgende Parameter wurden für die Beurteilung der Lungenschnitte herangezogen: Becherzellmetaplasie und -hyperplasie, Hyperplasie des Bronchialepithels, Hypertrophie der Bronchialmuskulatur, vermehrte Schleimansammlungen im Lumen (Dyskrinie), lymphoplasmazelluläre Bronchiolitis sowie Infiltration durch neutrophile und/oder eosinophile Granulozyten. Nur die Pferde, die in mindestens 25% der untersuchten Lokalisationen mindestens vier der aufgeführten Parameter aufwiesen, wurden für die folgenden Untersuchungen als COB Patienten eingestuft. Nur die Pferde, bei denen sich keinerlei pathologische Veränderungen fanden, wurden als histologisch lungengesund eingestuft und dienten in den folgenden Versuchen als Kontrollgruppe. Pferde, die nicht eindeutig als COB erkrankt oder als histologisch lungengesund identifiziert werden konnten, gingen nicht in die Studie mit ein. Von den 102 Pferden konnten 58 (56,9%) als histologisch lungengesund diagnostiziert werden, 23 (22,5%) Pferde wiesen pathologische Veränderungen im Sinne einer COB auf, von denen jedoch nur 10 (9,8%) die Kriterien der durchgeführten Studie erfüllten (836/04, 2506/04, 2555/04, 914/05, Pfd XIII, Pfd 14, Pfd 17, Pfd 19, Pfd 20, Pfd 25). 21 Pferde (20,6%) wiesen andere Lungenveränderungen wie z.B. eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie oder eine interstitielle Pneumonie auf und wurden daher nicht für die Untersuchungen in Bezug auf eCLCA1 bei COB mit herangezogen.

Von 23 Pferden standen vier zusätzliche Lungenlokalisationen aus dem linken *Lobus cranialis* und *caudalis* sowie dem *Lobus accessorius* zur Verfügung (L5-L8). Das erweiterte Probenspektrum ergab jedoch keine über die in den übrigen Lokalisationen erhobenen Befunde hinausreichende Erkenntnisse oder wich von diesen ab.

5.5 eCLCA1-Expressionsmuster bei gesunden Pferden

5.5.1 Quantitative RT-PCR: mRNA-Nachweis

Die Untersuchungen zu den Expressionen von eCLCA1 in gesunden Pferden wurden mit *taqMan*-Sonden und dem MX4000 (Stratagene) durchgeführt. Um die Sensitivität der *real-time* RT-PCR zu überprüfen, wurden von den mit Hilfe herkömmlicher PCR für die einzelnen Sequenzen hergestellten Mengenstandards Verdünnungsreihen von 10^2 bis 10^8 Kopien/ μ l hergestellt und in der *real-time* RT-PCR als *template* verwendet. Für eCLCA1 konnten Sequenzen bis zu einer Kopienzahl von 100 je μ l sicher detektiert werden. Für EF-1a lag die sichere Nachweisgrenze bei 10^4 Kopien pro μ l, was aber auf Grund seiner hohen Expressionsrate akzeptabel war. Für die Negativkontrollen wurde DEPC-behandeltes Wasser an Stelle eines cDNA-Templates eingesetzt und in keinem Fall ein Signal detektiert. Von jeder Probe wurden die Ct-Werte mit der Standardabweichung (SD) und die mRNA-Kopienzahlen mit SD für eCLCA1 und für das „*Housekeeping-Gen*“ EF-1a in Doppelläufen ermittelt (tabellarische Zusammenstellung der Zahlenwerte aller Messdurchgänge siehe Anhang 10.7). Der Variations-Koeffizient (VK) der beiden Messdurchgänge durfte dabei nicht größer als 5% sein (Bustin, 2000), andernfalls wurden die Untersuchungen wiederholt. Die Kopienzahlen von eCLCA1 wurden anhand der Kopienzahlen von EF-1a korrigiert, um geringgradig unterschiedlich eingesetzte RNA-Mengen und ggf. unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkription auszugleichen. Die korrigierten Expressionsraten für eCLCA1 inklusive der zugehörigen Standardabweichungen wurden zur besseren Übersicht in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 7). In dieser Darstellung wird deutlich, dass eCLCA1 in allen Abschnitten des Intestinaltraktes, ausgenommen des Ösophagus, unterschiedlich stark exprimiert wird. Interessanterweise konnten im Gegensatz zur immunhistochemischen Untersuchung auch im Magen und im Uterus geringe Mengen an eCLCA1-mRNA nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eCLCA1 im Atmungstrakt (einschließlich Nasenschleimhaut) unterschiedlich stark nachgewiesen. Außerdem wurde eCLCA1 in der Haut und in der Nierenpapille nachgewiesen. Sehr geringe Kopienzahlen konnten im Gehirn, in der Milz, der Nierenrinde und im Ovar gefunden werden.

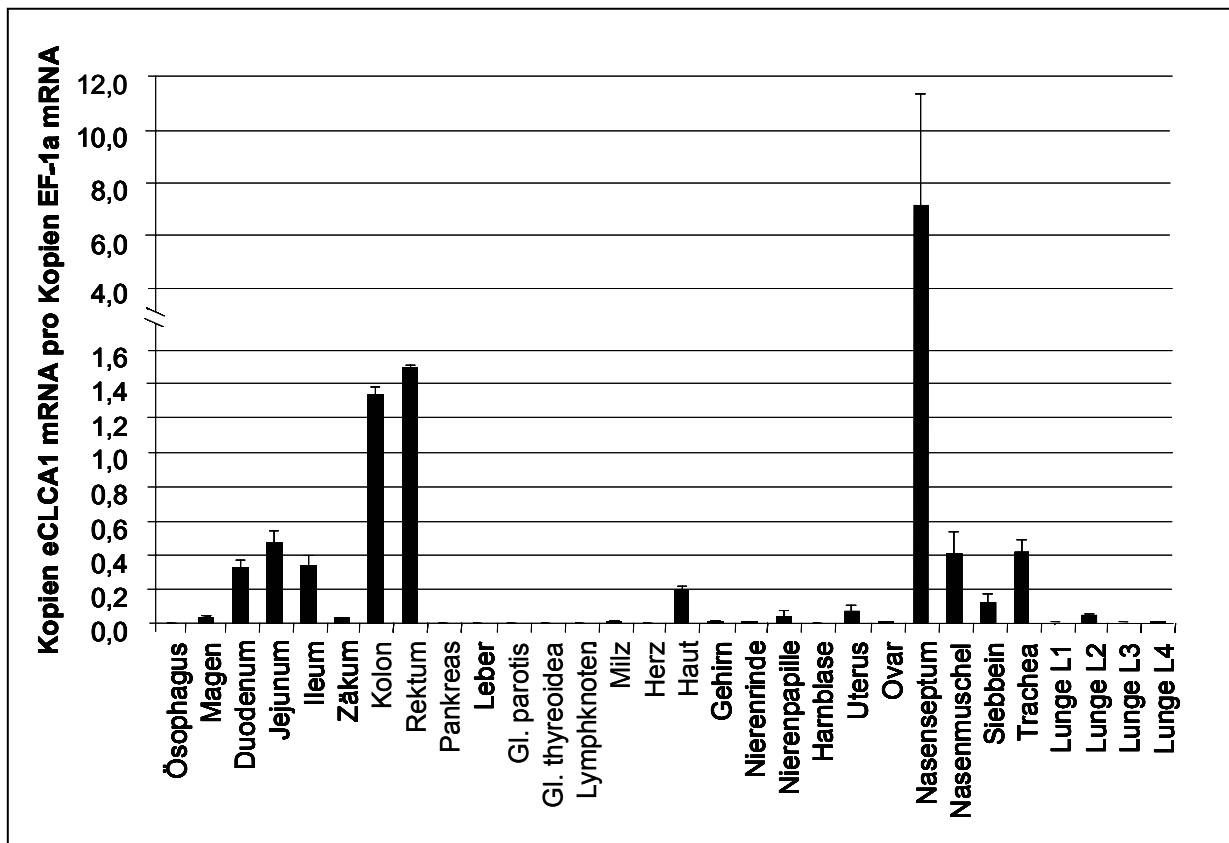


Abbildung 7: Relative Expression von eCLCA1 in verschiedenen Geweben bestimmt als mRNA-Kopienzahlen mittels RT-qPCR. Die Säulen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte der relativen mRNA-Kopienzahlen aus zwei verschiedenen RT-PCR-Läufen bezogen auf das *Housekeeping*-Gen EF-1a an. Der Fehlerindikator bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte. Die Bezeichnungen L1-L4 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. L1 stammt aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

5.5.2 Immunhistochemischer Nachweis des eCLCA1-Proteins im Gewebe

Ziel der immunhistochemischen Untersuchungen war die differenzierte Darstellung des Expressionsmusters des eCLCA1-Proteins auf zellulärer Ebene. Im Rahmen der Vorversuche wurden die 13 Antikörper (Tabelle 20) in verschiedenen Verdünnungsstufen (von 1:500 bis 1:10.000) nach unterschiedlichen Demaskierungstechniken eingesetzt. Hierbei stellten sich die Antikörper eC4r in einer Verdünnung von 1:500 und eC10 in einer Verdünnung von 1:750 in Verbindung mit einer Demaskierung mittels Pronase E als am besten geeignet heraus. Das jeweilige Präimmunserum des zur Antikörpergewinnung verwendeten Kaninchens diente als Negativkontrolle. Für die Ermittlung des Expressionsmusters in gesunden Pferden wurde von Pferd 1123/04 (Wallach, 536 kg, 9 Jahre) und 987/05 (Stute, 540 kg, 8 Jahre) ein vollständiges Organspektrum untersucht, darüber hinaus wurde ein kleineres Organspektrum von Pferd 3036/04, verschiedene Hautlokalisationen und -anhangsdrüsen (Speichel-, Tränen- und Ceruminaldrüsen) von Pferd 1762/04, verschiedene Magenlokalisationen von Pferd 1404/04, die Hoden von Pferd 2363/04 sowie die Uteri der Pferde 1518/04, 2516/0, 3036/04, 914/05 und 987/05 untersucht. Diese für bestimmte Organe erweiterten Untersuchungen an mehreren Pferden erfolgten zur Ergebnisvalidierung in Fällen unklarer Befunde.

Von allen untersuchten Geweben konnte das eCLCA1-Protein ausschließlich im Respirations- und Intestinaltrakt, in bestimmten Hautlokalisationen sowie in schleimproduzierenden Zellen der Niere nachgewiesen werden (Details siehe unten). Es konnten keine Unterschiede zwischen den Tieren festgestellt werden. Auch ergaben die beiden verwendeten Antiseren stets einheitliche Ergebnisse.

Beim Vergleich der mittels Immunhistochemie gefärbten Serienschnitte mit den mittels PAS-Reaktion gefärbten wurde eine strenge Kolokalisation des eCLCA1-Proteins mit Muzinen und muzinproduzierenden Becherzellen festgestellt (Abbildung 8).

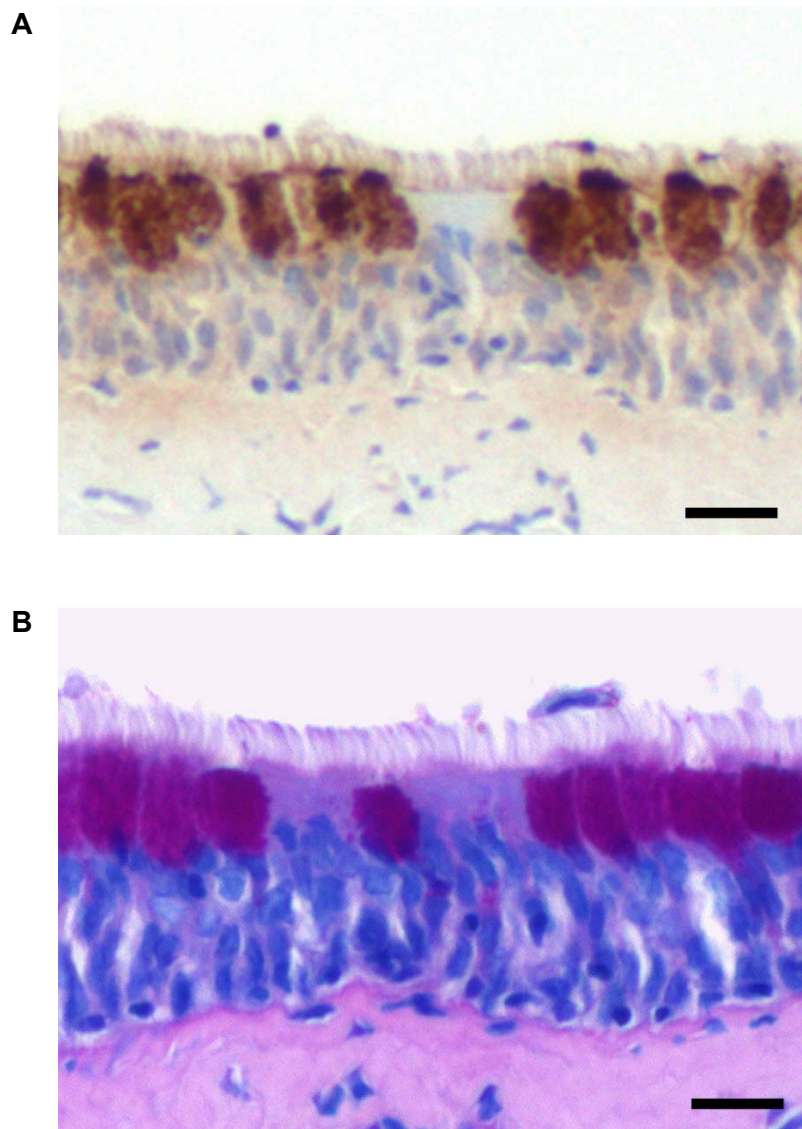


Abbildung 8: Beispiel eines immunhistochemischen Nachweises des eCLCA1-Proteins (A; braune Anfärbung) bzw. einer PAS-Reaktion (B; pinke Anfärbung) von Gewebeschnitten der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben aus der Trachea bei gleicher Vergrößerung (eC4r 1:500, Gegenfärbung mit Hämalaun). Beide Verfahren markieren eindeutig alle Becherzellen. (Größenmaßstab = 50 µm)

Im Intestinaltrakt konnte das eCLCA1-Protein in nahezu allen Becherzellen des Dün- und Dickdarms und in intraluminal anhaftendem Schleim nachgewiesen werden (Abbildung 9 A und B). Hierbei zeigte sich eine intensive Färbung der zytoplasmatischen Granula. Auch die Becherzellen der Ausführungsgänge des Pankreas inklusive des anhaftenden Schleims ergaben ein deutliches Signal (Abbildung 9 C). In allen untersuchten Regionen des Magens (Kardia-, Fundus- und Pylorusregion), in der Maulhöhle, den Lippen, im Oesophagus, im endokrinen und exokrinen Pankreas und in der Leber konnte das Protein nicht nachgewiesen werden.

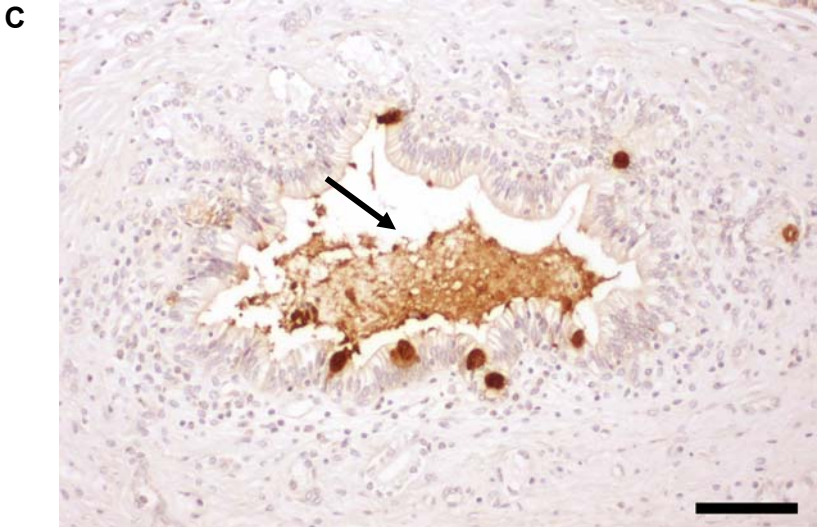
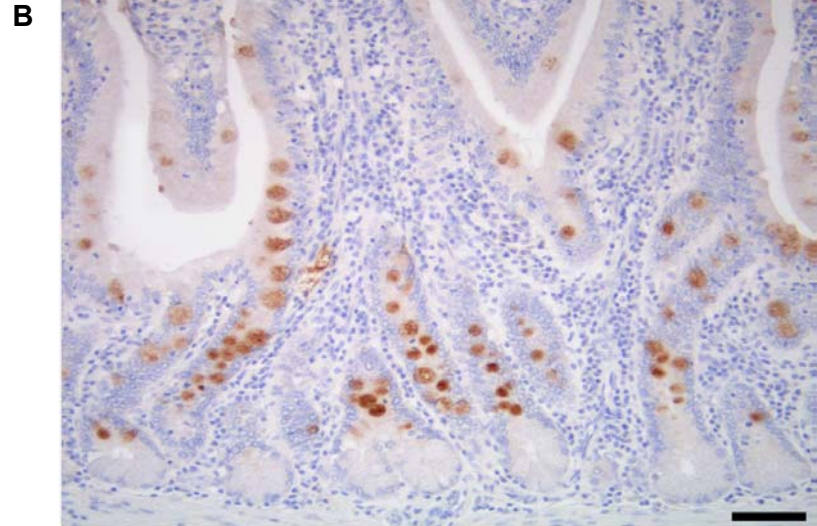
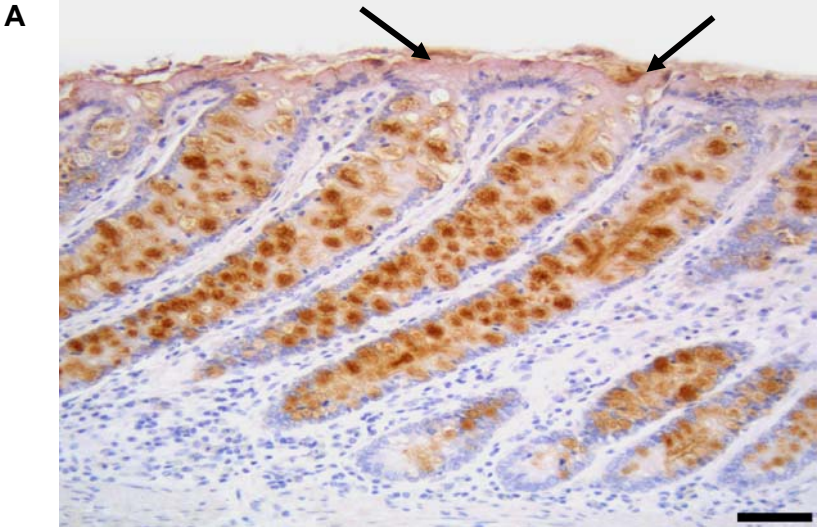


Abbildung 9: Beispiele eines immunhistochemischen Nachweises des eCLCA1-Proteins (braune Anfärbung) in Gewebeschnitten der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben aus dem Intestinaltrakt. Kolon (A), Ileum (Kryptenregion; B) und Ausführungsgang des Pankreas (C; eC4r 1:500, Gegenfärbung mit Hämalaun). Die spezifische Anfärbung von Becherzellen (A-C) sowie intraluminalen Muzinen (A, C; schwarze Pfeile) wird deutlich. (Größenmaßstab = 100 µm)

Auch im Respirationstrakt konnte das eCLCA1-Protein in nahezu allen Becherzellen nachgewiesen werden. So ergaben sich eindeutige Signale in den Becherzellen und tubuloazinösen Drüsen der Nasenschleimhaut (Abbildung 10), in Becherzellen der Trachea (Abbildung 8) und des Bronchialbaums, in Subtracheal- und Bronchialdrüsen sowie in oberflächlich anhaftendem Schleim. Alle zilierten Epithelzellen und Alveolarepithelzellen waren negativ.

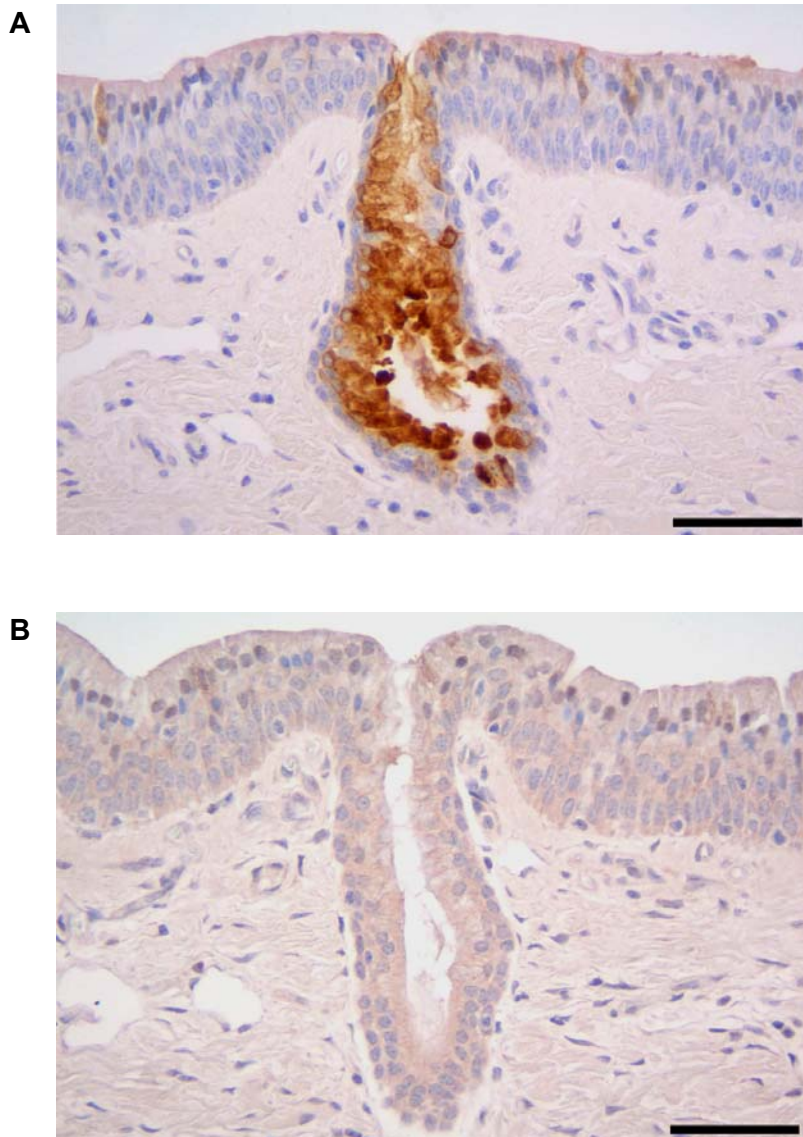


Abbildung 10: Beispiele eines immunhistochemischen Nachweises des eCLCA1-Proteins in Gewebeschnitten der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben aus dem Respirationstrakt mit dem eCLCA1 spezifischen Antikörper (A) und dem Präimmunserum (B; eC4r 1:500, Gegenfärbung mit Hämalaun). Die submukosalen Drüsen der Nasenschleimhaut zeigen eine deutliche Anfärbung, welche sich mit dem Präimmunserum nicht zeigte. (Größenmaßstab = 100 μ m)

Die apokrinen Haarfollikeldrüsen der Haut am Innenschenkel und der seitlichen Halsregion wiesen ebenfalls deutliche Signale auf (Abbildung 11). Interessanterweise konnte das eCLCA1-Protein in anderen Hautlokalisationen wie z.B. am Kopf, an den Ohren, auf der Kruppe, am Präputium oder in der Fesselbeuge nicht nachgewiesen werden.

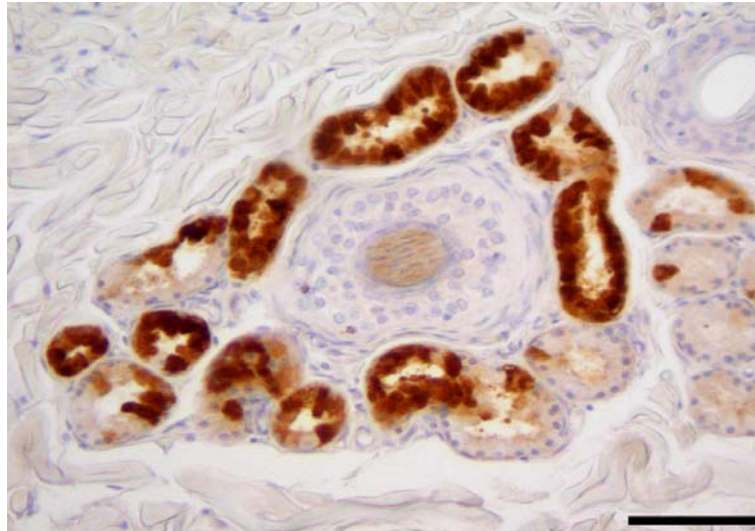


Abbildung 11: Beispiel eines immunhistochemischen Nachweises des eCLCA1-Proteins in Gewebeschnitten der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben aus der Haut der Innenschenkelregion (eC4r 1:500, Gegenfärbung mit Hämalaun). Die zirkulär um einen Haarfollikel angeordneten Schweißdrüsen weisen ein deutliches Signal auf. (Größenmaßstab = 100 µm)

Als einziges Organ des Urogenitaltraktes konnte das eCLCA1-Protein in schleimproduzierenden Zellen der Nierenpapille und des Nierenbeckens nachgewiesen werden. Die Ovarien und Eileiter, die Hoden, Nebenhoden und Samenleiter, verschiedene Lokalisationen des Uterus und der Vagina, die Mamma (nicht laktierend), die Harnblase, die Harnleiter und die Nierenrinde zeigten keinerlei Signale.

Auch in den folgenden Geweben konnte mittels Immunhistochemie kein eCLCA1-Protein nachgewiesen werden: Skelettmuskulatur (*Musculus supraspinatus*, *Musculus semimembranosus*), Fettgewebe, Gehirn (Kortex, Medulla, Stammhirn und Kleinhirn), Auge, Milz, Lymphknoten (*Ln. mandibularis*), *Glandula thyroidea*, *Glandula parotis*, *Glandula sublingualis* und *Glandula lacrimalis*, Ceruminaldrüsen des Ohrs, Nebennieren, Herz und Aorta (abdominal und thorakal).

5.6 Expression von eCLCA1 bei Pferden mit COB

5.6.1 Quantifizierung der eCLCA1-mRNA-Expressionshöhen

Die Quantifizierung der mRNA-Expressionshöhen von eCLCA1 bei COB-kranken im Vergleich zu gesunden Pferden wurde mit SYBRGreen und dem MX3000 (Stratagene) durchgeführt. Wie auch bei der RT-PCR mit *taqMan*-Sonden wurde zunächst für die RT-PCR mit SYBRGreen die Sensitivität der PCR-Reaktion anhand einer Verdünnungsreihe der zuvor hergestellten Mengenstandards getestet. Es wurden wieder von jeder Probe die Ct-Werte mit SD und hieraus die Kopienzahlen mit SD für eCLCA1 und das *Housekeeping*-Gen EF-1a ermittelt und die Kopienzahlen von eCLCA1 entsprechend gegen die Kopienzahlen von EF-1a korrigiert. Eine tabellarische Zusammenstellung der Zahlenwerte aller Messdurchgänge ist auch bei dieser Untersuchung dem Anhang zu entnehmen (Anhang 10.7).

Für die Untersuchung standen nach Ausschluss ungeeigneter Patienten und Proben Gesamtlungen- und Gesamtrachealproben von 4 COB-kranken und 4 gesunden Pferden zur Verfügung (Kapitel 5.4), welche in Doppelläufen untersucht wurden.

Der Variations-Koeffizient der Ct-Werte der beiden Messdurchgänge durfte dabei nicht größer als 5% sein, andernfalls wurden die Läufe wiederholt (Bustin, 2000). Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurde überprüft, ob bei den Proben signifikante Unterschiede in der relativen Expressionshöhe von eCLCA1 im Atmungstrakt gesunder und COB-kranker Pferde feststellbar waren.

Die Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm verdeutlicht eine starke Überexpression von eCLCA1 sowohl in der Lunge als auch in der Trachea COB-kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Tieren (Abbildung 12). In allen untersuchten Lokalisationen des Respirationstraktes, mit Ausnahme des *Lobus cranialis* (L1), konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Vermutlich auf Grund einer starken Streuung der Einzelwerte für L1 konnten in dieser Lokalisation keine Signifikanzen zwischen COB-kranken und gesunden Pferden festgestellt werden.

Der Median der relativen eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen lag bei COB-kranken Pferden in allen untersuchten Lokalisationen des Respirationstraktes stets über dem gesunder Tiere. Im oberen Respirationstrakt lagen die Werte in beiden Gruppen um mindestens Faktor zehn über denen des unteren Respirationstraktes. Während in den Lungen COB-kranker Tiere Werte von 0,0202 bis 0,0643 und bei gesunden von 0,0009 bis 0,0027 nachgewiesen wurden, reichten sie für die Tracheaprobe bei COB-kranken von 0,6479 bis 0,8003 und bei gesunden von 0,0856 bis 0,3301.

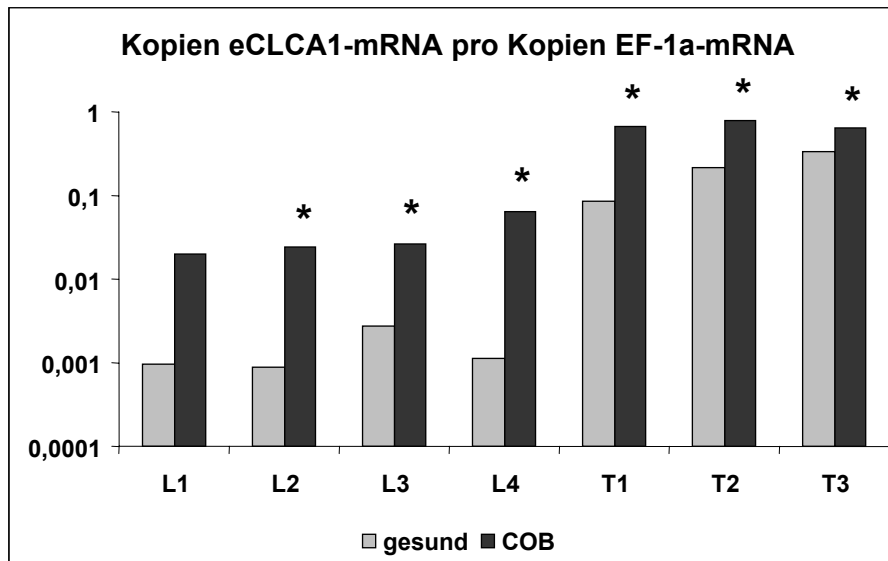


Abbildung 12: Relative Expression von eCLCA1 in der Lunge und der Trachea COB-kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Tieren. Die Abkürzungen L1-L4 und T1-T3 beziehen sich auf die in Kapitel 4.1 erläuterten Probenentnahmelokalisationen. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea, L1 aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*. Die Säulen geben den Median der relativen mRNA-Kopienzahlen von jeweils vier Tieren pro Gruppe an. * symbolisiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Vermutlich auf Grund starker Streuung der Werte für L1 konnten in dieser Lokalisation keine Signifikanzen zwischen COB-kranken und gesunden Pferden nachgewiesen werden.

5.6.2 Immunhistochemischer Nachweis des eCLCA1-Proteins bei COB

Insgesamt wurden 79 Pferde in 10 Lungenlokalisationen und 23 Pferde in 14 Lungenlokalisationen immunhistochemisch untersucht. Als Erstantikörper wurden die eCLCA1-spezifischen, polyklonalen Kaninchen-Antiseren, eC4r und eC8r, verwendet. Als Negativkontrolle wurde das jeweilige Präimmunserum der Kaninchen verwendet. Um die Expression des eCLCA1-Proteins mit schleimproduzierenden Zellen zu vergleichen, wurden Serienschnitte von allen Pferden zu den oben genannten Lokalisationen mittels PAS-Reaktion gefärbt.

Ähnlich den Ergebnissen bei gesunden Tieren konnte das eCLCA1-Protein bei COB-kranken Pferden in den zytoplasmatischen Granula praktisch aller Becherzellen des Respirationstraktes nachgewiesen werden. Darüber hinaus ergaben sich in beiden Gruppen ebenfalls Signale für das eCLCA1-Protein in den Subtracheal- und Bronchialdrüsen, wobei keine

Unterschiede in Quantität oder Verteilung aufgezeigt werden konnten. Andere Zelltypen konnten im Atmungstrakt nicht markiert werden. Zusätzlich fanden sich jedoch hochgradige Signale in intraluminalen Mukusansammlungen in kleinen Bronchiolen bis zu großen Bronchien. Auffällig war, dass das eCLCA1-Protein in Bronchiolen gesunder Tiere nicht nachweisbar war, während sich in den metaplastischen Becherzellen in Bronchiolen COB-kranker Pferde deutliche Signale ergaben.

Anhand der mittels PAS-Reaktion gefärbten Schnitte konnte stets eine Korrelation des eCLCA1-Proteins mit Muzinen bzw. schleimproduzierenden Zellen nachgewiesen werden.

Wie auch bei der histologischen Untersuchung der Lungengewebsproben (Kapitel 5.4) zeigte es sich bei den Ergebnissen unerheblich, ob 10 oder 14 Lokalisationen untersucht wurden. Die Ergebnisse waren in ihrer Summe praktisch identisch.

Demzufolge lässt sich zusammenfassen, dass sich für das eCLCA1-Protein ausnahmslos bei allen untersuchten Pferdelungen ausschließlich in schleimproduzierenden Zellen und Muzinen Signale ergaben. Darüber hinaus konnte eine deutliche Zunahme des eCLCA1-Proteins im Respirationstrakt COB-kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Tieren nachgewiesen werden konnte.

5.6.3 Vergleich der eCLCA1-mRNA Menge in COB-kranken und gesunden Pferdelungen

Um zu untersuchen, ob bei COB-kranken Pferden im Vergleich zu gesunden Tieren Variationen der eCLCA1-mRNA Länge (mögliche Splicevarianten) auftreten, wurde eine Pilotuntersuchung mittels Northern Blot Hybridisierung durchgeführt. Hierbei wurde mRNA, gewonnen aus Gesamtlungenproben von Pferd 1123/04 (gesundes Tier) und Pferd 2506/03 (COB-krank), verwendet und mit Hilfe einer eCLCA1-DNA-Sonde auf den Gehalt an eCLCA1 untersucht. Während die eCLCA1-mRNA-Menge bei dem gesunden Tier unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte bei dem COB-kranken Tier ein eindeutiges eCLCA1-Signal nachgewiesen werden (Abbildung 13, A). Dieses war, wie auch das mRNA-Signal im Kolon (Abbildung 3) etwas kleiner als 3,0 kb. Hinweise auf Splicevarianten oder ähnliches ergaben sich nicht.

Um eine Vergleichbarkeit der geladenen RNA Menge zu gewährleisten, wurden auch hier beide Proben mit einer EF-1a-DNA-Sonde hybridisiert. Es wurden in beiden Proben etwa die gleiche Menge RNA nachgewiesen.

5.6.4 Vergleich der Größe des eCLCA1-Proteins in COB-kranken und gesunden Pferdelungen

Für die Untersuchung auf mögliche Größenunterschiede des eCLCA1-Proteins im Vergleich zwischen COB-kranken und gesunden Pferden, wurde eine Western Blot Analyse als Pilotuntersuchung durchgeführt. Verwendet wurden hierfür Proteinlysate aus Gesamtlungengewebsproben von Pferd 1123/04 (gesund) und 2506/03 (COB-krank) und der eCLCA1-spezifische Antikörper ec4r (Kapitel 4.11.1). Ähnlich den Ergebnissen der Northern Blot Hybridisierung lagen die eCLCA1-Mengen in der Lunge gesunder Pferde auch auf Proteinebene unterhalb der Nachweisgrenze, während bei COB-kranken Pferden ein deutliches, etwa 80 kDa großes Signal erzeugt werden konnte (Abbildung 13, B). Zum Vergleich wurde eine Western Blot Analyse von Proteinlysaten des Kolons von vier gesunden Pferden durchgeführt, welche ebenfalls eine einzelne Bande bei etwa 80 kDa ergab (ohne Abbildung).

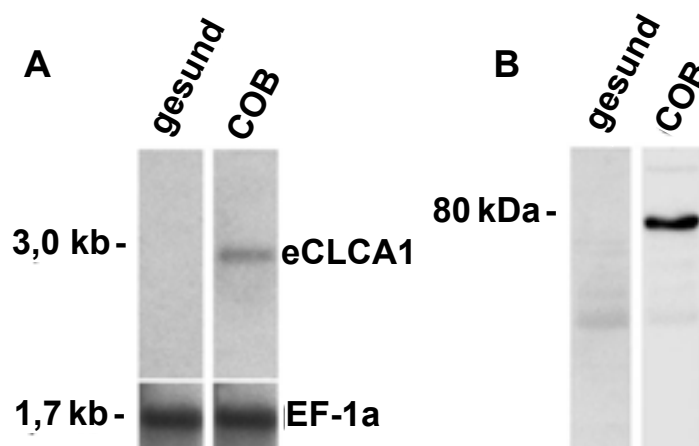


Abbildung 13: (A) Northern Blot Hybridisierung einer mRNA-Probe gewonnen aus einer Gesamtlungengewebsprobe eines COB-kranken (2506/03) und eines gesunden Tieres (1123/04) mit einer eCLCA1-DNA-Sonde und einer EF-1a-Sonde als Ladungskontrolle.

(B) Western Blot Hybridisierung eines Proteinlysates gewonnen aus Gesamtlungengewebsproben eines COB-kranken (2506/03) und eines gesunden Pferdes (1123/04) mit dem eCLCA1-spezifischen Antikörper eC4r (Verdünnung 1:500).

5.6.5 Quantifizierung der Becherzellhyperplasie und der eCLCA1-exprimierenden Zellen

Um die Ursache der eCLCA1-Überexpression in der Lunge bei COB näher zu charakterisieren, wurde eine Quantifizierung der Becherzellhyperplasie und der eCLCA1-exprimierenden Zellen mittels morphometrischer Untersuchungen vergleichend bei gesunden und COB-kranken Tieren durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, mögliche Modifikationen in respiratorischen Epithelien COB-kranker Pferde im Bezug auf die eCLCA1-Expression festzustellen.

Dazu wurde der Prozentsatz der PAS-positiven Zellen im Tracheal- und Bronchialepithel von COB-kranken und lungengesunden Pferden bestimmt. Für diese Untersuchung standen neun Pferde pro Gruppe zur Verfügung. In direkten Serienschnitten wurde mit Hilfe einer eCLCA1-Immunhistochemie, gefärbt nach den oben beschriebenen Protokollen, die Anzahl an eCLCA1-positiven Zellen im Verhältnis zu Epithelzellen ermittelt. Anschließend wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests die Ergebnisse auf statistische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen untersucht.

Die Anzahl an Becherzellen, identifiziert durch die PAS-Reaktion, war in allen Segmenten des Bronchialbaums COB-kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Tieren hochgradig erhöht. Diese Zunahme reichte von Faktor 1,3 in den kleinen Bronchien (KB) bis zu Faktor 2,6 im mittleren Trachealsegment (T2; Abbildung 14). Am deutlichsten wurde dies beim Vergleich des Prozentsatzes der Becherzellen in den Bronchiolen. Während die Bronchiolen (Bi) COB-erkrankter Tiere mit einem Durchmesser kleiner als 400 µm 34 Becherzellen pro 100 Bronchialepithelzellen im Median aufwiesen, konnten in keinem der Kontrolltiere Becherzellen in Bronchiolen nachgewiesen werden.

Sowohl bei gesunden als auch bei COB-kranken Pferden waren die Prozentsätze an Becherzellen im Bronchialepithel kleiner Bronchien mit einem Median von 34,9 und 44,4 am höchsten.

In allen Segmenten des Respirationstraktes konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen aufgezeigt werden.

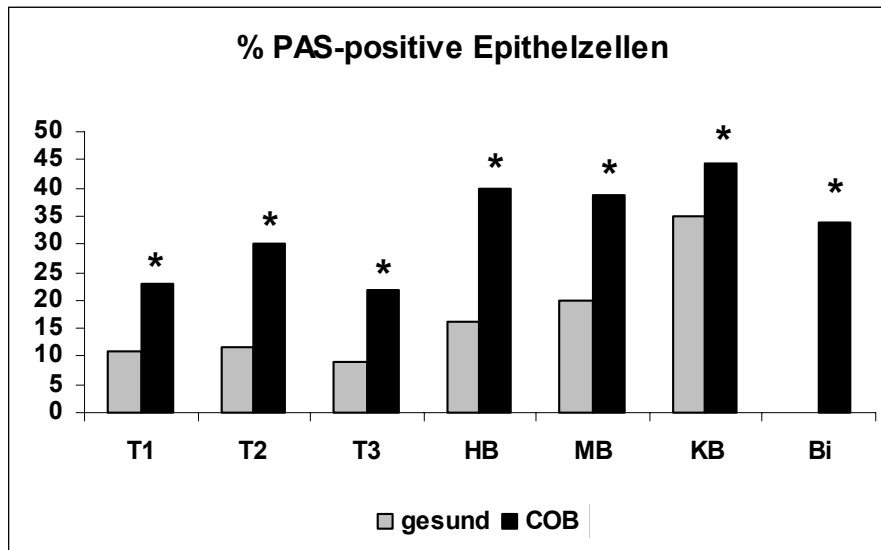


Abbildung 14: Prozentualer Anteil an PAS-positiven Epithelzellen (Becherzellen) vergleichend zwischen COB-kranken und gesunden Pferden, ermittelt an histologischen Gewebeschnitten. Die Abkürzungen T1-T3, HB, MB, KB beziehen sich auf die in Kapitel 4.1 erläuterten Probenentnahmelokalisationen. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea; HB, MB, und KB stammen aus dem Bronchialbaum HB = Hauptbronchus, MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel) und KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel). Bi steht für Bronchiolus. Die Säulen geben den Median der Prozentsätze der PAS-positiven Epithelzellen von jeweils neun Tieren pro Gruppe an. * symbolisiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

Die immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass das eCLCA1-Protein in COB-kranken und gesunden Tieren ausschließlich in den zytoplasmatischen Granula von Becherzellen und in intraluminal gelegenen Schleim lokalisiert war. eCLCA1-positive Zellen waren nahezu identisch mit PAS-positiven Zellen. Folglich konnte in Bronchiolen COB-kranker Pferde eine starke eCLCA1-Expression nachgewiesen werden, wohingegen das eCLCA1-Protein in den Bronchiolen gesunder Tiere nicht detektierbar war. Ähnlich den Ergebnissen der PAS-positiven Zellen konnte auch in der immunhistologischen Untersuchung in allen untersuchten Segmenten des Bronchialbaums eine deutliche Erhöhung des prozentualen Anteils an eCLCA1-positiven Zellen bei COB-kranken Pferden im Vergleich zu gesunden nachgewiesen werden (Abbildung 15). Diese war mit Faktoren von 1,9 im kleinen Bronchus bis 3,8 im mittleren Bronchus etwas größer als die der PAS-Auswertung. In beiden Gruppen konnten im Bronchialepithel kleiner Bronchien die höchsten Prozentsätze an eCLCA1-positiven Epithelzellen mit einem Median von 34,1 bei COB-kranken und 17,8 bei gesunden

Tieren nachgewiesen werden. Während der prozentuale Anteil an eCLCA1-positiven Zellen bei gesunden Tieren in allen übrigen Segmenten des Respirationstraktes (mit Ausnahme der Bronchiolen) relativ gleichmäßig war (7,0 T3 bis 8,8 T1), schwankten die Werte bei COB-kranken Tieren deutlicher (14,3 T3 bis 27,4 MB).

Für alle Segmente des Respirationstraktes konnten signifikant Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen aufgezeigt werden.

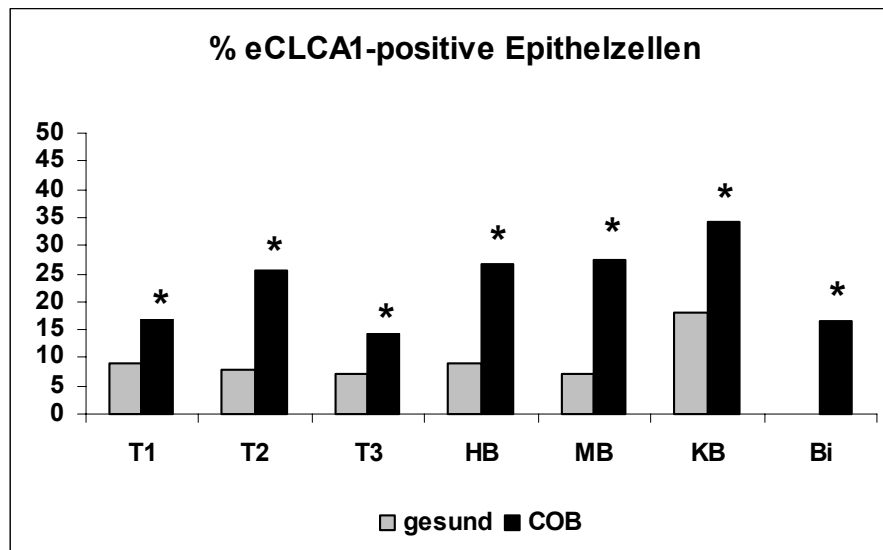


Abbildung 15: Prozentualer Anteil an PAS-positiven Epithelzellen (Becherzellen) vergleichend zwischen COB-kranken und gesunden Pferden, ermittelt an histologischen Gewebeschnitten. Die Abkürzungen T1-T3, HB, MB, KB beziehen sich auf die in Kapitel 4.1 erläuterten Probenentnahmelokalisationen. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea; HB, MB, und KB stammen aus dem Bronchialbaum HB = Hauptbronchus, MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel) und KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel). Bi steht für Bronchiolus. Die Säulen geben den Median der Prozentsätze der PAS-positiven Epithelzellen von jeweils neun Tieren pro Gruppe an. * symbolisiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen.

Sowohl bei COB-kranken als auch bei gesunden Pferden war der prozentuale Anteil an eCLCA1-exprimierenden Zellen in allen untersuchten Abschnitten des Bronchialbaums etwa gleich hoch wie der der PAS-positiven Zellen, wobei die Anzahl an eCLCA1-positiven Zellen jeweils geringgradig unter der der PAS-positiven Zellen lag (Abbildung 16). Das Verhältnis von eCLCA1-positiven zu PAS-positiven Zellen lag bei gesunden Tieren zwischen 0,36 und 0,82 und bei COB-kranken Tieren zwischen 0,49 und 0,85. Beim Vergleich der Verhältnisse von eCLCA1-positiven zu PAS-positiven Zellen zwischen COB-kranken und gesunden

Pferden konnten mit Ausnahme des Bronchiolus keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Da gesunde Tiere im Gegensatz zu COB-kranken weder PAS-positive noch eCLCA1-positive Zellen im Bronchiolus aufweisen, ist der signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen in dieser Lokalisation offensichtlich. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in beiden Pferdegruppen der Anteil an eCLCA1-positiven Zellen eng mit der Anzahl an Becherzellen korreliert war. Es kam demnach offenbar weder zu einem Verlust der eCLCA1-Expression in Becherzellen, noch zeigte sich eine *de novo*-Expression von eCLCA1 in anderen Zellen als Becherzellen.

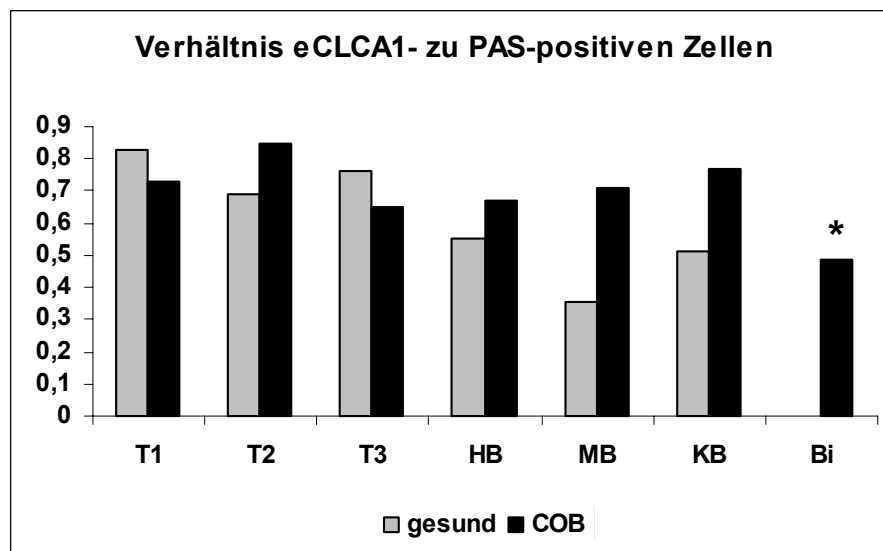


Abbildung 16: Verhältnis von eCLCA1- zu PAS-positiven Zellen. Die Säulen geben den Median des Verhältnisses von eCLCA1- zu PAS-positiven Zellen von jeweils 9 Tieren pro Gruppe an. Die Abkürzungen T1-T3 und HB, MB und KB beziehen sich auf die in Kapitel 4.1 erläuterten Probenlokalisationen; T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea; HB, MB und KB stammen aus dem Bronchialbaum HB = Hauptbronchus, MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel) und KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel); Bi steht für Bronchiolus. * symbolisiert signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen. Mit Ausnahme des Bronchiolus sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar.

5.6.6 Quantifizierung der eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle mittels Lasermikrodissektion und quantitativer RT-PCR

Um zu überprüfen, ob die zelluläre Expression von eCLCA1 in COB-kranken und gesunden Pferden unterschiedlich reguliert wird, wurde die relative eCLCA1-mRNA-Kopienzahl pro mRNA-Kopienzahl des *Housekeeping*-Gens EF-1a in der einzelnen Becherzelle bestimmt. Dies erfolgte mittels Lasermikrodissektion (engl. *laser capture microdissection*; LCM) und anschließender relativer RT-qPCR mit dem Laser Beam (PALM) und dem MX3000 (Stratagene; Protokolle siehe Kapitel 4.8.4 und 4.8.6). Für die Untersuchungen standen Proben von 3 COB-kranken (Pfd XIII, Pfd 20, Pfd 25) und 3 gesunden Pferden (Pfd 16, Pfd 26, 2043/04) zur Verfügung.

Wie auch bei der Untersuchung der Gesamtlungenproben (Kapitel 5.6.4) wurden von jeder Probe die Ct-Werte mit SD und hieraus die Kopienzahlen mit SD für eCLCA1 und das *Housekeeping*-Gen EF-1a ermittelt und die Kopienzahlen der eCLCA1-mRNA entsprechend gegen die Kopienzahlen der EF-1a-mRNA relativiert. Die Ergebnisse wurden anschließend in einem Punktdiagramm zusammengestellt (Abbildung 17), die Rohdaten sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 10.7).

Die höchsten relativen eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle (70,8) wurden in der Probe aus dem kleinen Bronchus von Pferd Pfd 26 (gesund) nachgewiesen. Auch die geringsten eCLCA1-mRNA-Kopien pro EF-1a-mRNA-Kopien wurden in einem gesunden Tier gemessen (Pferd Pfd 16, 0,98, mittlerer Bronchus; MB). Innerhalb der Gruppe der COB-kranken Pferde konnten ebenfalls große Schwankungen der relativen eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle zwischen den einzelnen Pferden festgestellt werden. Z.B. ergaben die Messungen bei Pferd Pfd XIII im Bronchialepithel an Lokalisation MB 58,28 relative eCLCA1-mRNA-Kopien pro Becherzelle und an der gleichen Lokalisation bei Pferd Pfd 25 nur 16,79 relative eCLCA1-mRNA-Kopien pro Becherzelle.

Eine statistische Analyse der Ergebnisse mittels des Mann-Whitney-Tests konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der COB-kranken und der der gesunden Pferde dieser Untersuchung aufzeigen.

Auffällig war jedoch, dass mit Ausnahme des gesunden Pferdes Pfd 26 die relativen eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle bei jedem Tier nur sehr gering zwischen den einzelnen Lokalisationen divergierten. Während sich bei Pferd Pfd 26 die Werte in den einzelnen Lokalisationen um ca. 30 Kopien eCLCA1-mRNA pro Kopien EF-1a-mRNA unterschieden, wichen sie bei den übrigen untersuchten Pferden durchschnittlich lediglich um 7 relative eCLCA1-mRNA-Kopien pro Becherzelle ab. Diese offensichtliche Homogenität innerhalb der einzelnen Tiere spricht für eine gewisse Zuverlässigkeit der Methode und gegen eine artifizielle Ursache der Schwankungen.

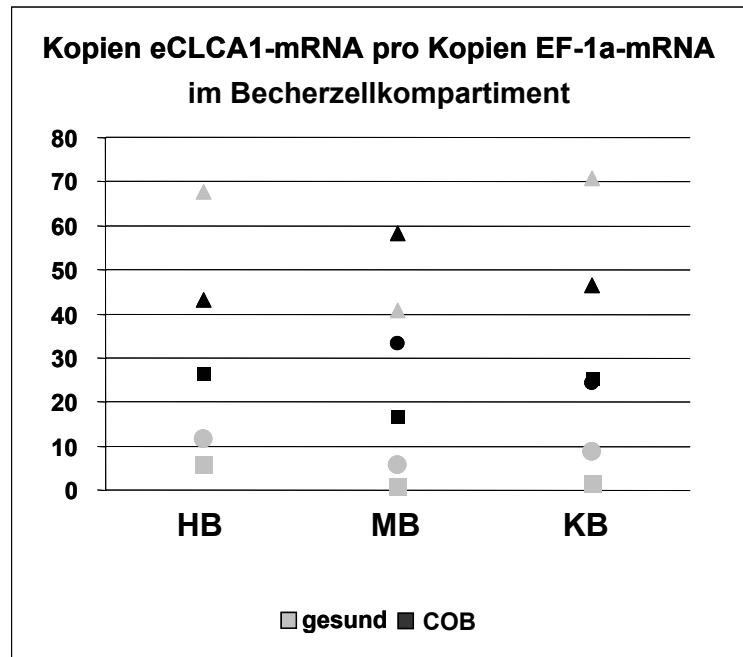


Abbildung 17: Relative eCLCA1-mRNA-Kopienzahlen pro Becherzelle vergleichend zwischen COB-kranken und gesunden Pferden. Die grauen Symbole stehen für die drei gesunden Pferde (\blacktriangle = Pfd 26; \bullet = 2043/04; \blacksquare = Pfd 16) und die schwarzen für die drei COB-kranken Pferde (\blacktriangle = Pfd XIII; \bullet = Pfd 20; \blacksquare = Pfd 25); HB, MB und KB stammen aus dem Bronchialbaum; HB = Hauptbronchus, MB = Mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel) und KB = Kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel). Die Probe aus dem Hauptbronchus von Pferd Pfd 20 enthielt kein für die LCM verwendbares Bronchialepithel und fehlt somit in der Darstellung. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar.

6. Diskussion

Die chronisch-obstruktive Bronchiolitis (COB) des Pferdes ist in der Literatur als eine bedeutsame, relativ weit verbreitete Atemwegserkrankung des unteren Respirationstraktes beschrieben, welche einen großen Teil der in Europa und Nordamerika vorwiegend unter Stallbedingungen gehaltenen Pferde betrifft. Einen wesentlichen Schlüsselmechanismus bei dieser Erkrankung stellt neben der Bronchokonstriktion die Obstruktion kleiner Atemwege durch die Hypersekretion eines zähen Schleims dar. COB weist zahlreiche klinische, funktionelle und histomorphologische Ähnlichkeiten mit dem Asthma bronchiale des Menschen auf. So stellen auch beim Asthma die Dyskrie und die Verlegung von Atemwegen einen wesentlichen Pathomechanismus neben der Bronchokonstriktion dar. Die Arbeiten der Gruppen um Nakanishi (2001) und Zhou (2001) postulieren, dass es bei Asthma bronchiale zu einer transkriptionellen Aufregulation von mCLCA3 bei der Maus und hCLCA1 beim Menschen kommt und dass diese CLCA-Proteine als frühe Auslöser der Becherzellmetaplasie und -hyperplasie und somit der Dyskrie in Frage kommen und folglich maßgeblich an der Pathogenese beteiligt zu sein scheinen. Hieraus ergab sich die zentrale Hypothese dieser Arbeit, nach der es einen equinen Homologen zu mCLCA3 und hCLCA1 gibt, mit einer ähnlich bedeutenden Rolle bei der Pathogenese der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis des Pferdes.

6.1 Identifizierung und Charakterisierung des ersten equinen CLCA-Vertreters

Erstes Ziel dieser Arbeit war es also, zunächst einen equinen Orthologen zu mCLCA3 und hCLCA1 zu identifizieren und zu klonieren. In einer Northern Blot Hybridisierung gelang es mit Hilfe einer mCLCA3-Sonde, in equiner mRNA, gewonnen aus der Kolonschleimhaut, ein eindeutiges Signal der erwarteten Größe in Form einer einzigen Bande zu erzeugen. Dies gab erste Hinweise auf die Existenz des equinen CLCA-Vertreters, welcher eine große Sequenz-Ähnlichkeit mit mCLCA3 und hCLCA1 aufweisen musste.

Mit Hilfe in Anlehnung an konservierte Regionen der Nukleotidsequenz von mCLCA3 und hCLCA1 generierter Primer und anschließender RACE konnte ein ca. 2.700 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert werden. Vergleiche der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit allen bisher bekannten CLCA-Vertretern weisen große Ähnlichkeiten mit hCLCA1 (81,1% Nukleotidsequenz, 82,4% Aminosäuresequenz), mCLCA3 (71,4% Nukleotidsequenz, 73,4% Aminosäuresequenz) und pCLCA1 (78,2 % Nukleotidsequenz, 71,6 % Aminosäuresequenz) auf. Aus genomischen Sequenzanalysen des vollständig sequenzierten humanen und murinen Genoms ist bekannt, dass es lediglich vier humane und sechs murine CLCA-

Vertreter gibt (Ritzka et al., 2003). Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass das hier klonierte eCLCA1-Protein zu irgendeinem anderen, bisher unbekanntem CLCA-Homologen des Menschen oder der Maus eine größere Ähnlichkeit aufweisen könnte. Zusammen mit pCLCA1, mCLCA3 und hCLCA1 repräsentiert eCLCA1 demnach offenbar ein eigenständiges Cluster innerhalb der CLCA-Genfamilie, was auf eine einzigartige, biomedizinische Signifikanz hindeutet.

Die immunhistochemische Untersuchung lieferte mit den beiden eigens dafür erzeugten, monospezifischen anti-eCLCA1-Antikörpern identische Ergebnisse, was eine hohe Spezifität der Ergebnisse zeigt. Auch konnten zwischen den untersuchten Pferden hinsichtlich des Expressionsmusters keine Unterschiede festgestellt werden. Entsprechend der Arbeitshypothese sollte es sich bei eCLCA1 um den equinen Orthologen zu dem murinen mCLCA3 handeln. Die Erstellung eines phylogenetischen Baums, welcher die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den einzelnen CLCA-Familienmitgliedern darstellt, zeigt eCLCA1 in einem Cluster mit mCLCA3, hCLCA1 und pCLCA1, was diese These erhärtet. Auch das gewebliche und zelluläre Verteilungsmuster von eCLCA1 weist dem entsprechend große Ähnlichkeiten mit dem von mCLCA3 und hCLCA1 auf, ist aber nicht identisch mit diesen. Eine Expression in Becherzellen und Drüsen des Respirationstraktes und in intestinalen Becherzellen scheint identisch mit mCLCA3 zu sein. Auffällig jedoch ist beim Pferd eine Expression des eCLCA1-Proteins in tubulären Schweißdrüsen der Haut des Innenschenkels und des Halses, wohingegen in der Haut von Mäusen mCLCA3 nicht nachgewiesen werden konnte (Leverkoehne und Gruber, 2002). Die Erklärung hierfür könnte möglicherweise in der besonderen, spezie-spezifischen Physiologie und Anatomie der Pferdehaut liegen. Mit Ausnahme des Menschen stellt das Pferd das einzige Säugetier dar, welches tubuläre Schweißdrüsen in allen Hautregionen aufweist. Eine weitere Besonderheit beim Pferd ist eine Sekretion von mukoproteinreichem Schweiß über die gesamte Körperoberfläche (Banks, 1993; McEwan Jenkinson et al., 2006; Talukdar et al., 1972). Die hier für eCLCA1 gefundenen Expressionsunterschiede sind mit diesen anatomischen Unterschieden erklärbar. Zudem weisen sie auf eine universelle Rolle dieser Proteine bei der Muzinproduktion hin.

Im Gegensatz zu mCLCA3 konnte das eCLCA1-Protein in epithelialen Zellen der Nierenpapillen nachgewiesen werden. Auch hierbei könnte die Ursache in spezie-spezifischen Besonderheiten der Anatomie des Pferdes liegen, denn das Vorkommen von muzinösen Drüsen und Becherzellen in der Nierenpapille wird nur bei Pferden, nicht aber bei Mensch und Maus beschrieben (Liebich und Maierl, 1999). Auch hier kann wieder die universelle Bedeutung für die Muzinproduktion abgelesen werden.

Bemerkenswert ist auch der Nachweis des eCLCA1-Proteins in intraluminalen Schleim unter anderem in den Atemwegen und im Gallengang, was sehr ungewöhnlich für ein Transmembranmolekül wäre und eher für das Vorliegen eines sezernierten Proteins sprechen könnte. Die Arbeiten von Gibson und Mitarbeitern (2005) und Mundhenk und Mitarbeitern (2006) konnten dieses bereits für hCLCA1 und mCLCA3 nachweisen. In seiner Dissertation konnte Mundhenk (2007) diese sezernierte Natur auch für das eCLCA1-Protein biochemisch eindeutig belegen.

Ohne Ausnahme war die Expression von eCLCA1 streng mit PAS-positiven, muzinproduzierenden Zellen oder PAS-positivem Schleim assoziiert. Diese Tatsache deutet auf eine wichtige, bisher jedoch nicht weiter bekannte Rolle bei der Muzinsynthese, Kondensation oder Sekretion von Muzinen hin. Aus immuntransmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an muriner Darmschleimhaut aus dem Jejunum und Kolon ist bekannt, dass das mCLCA3-Protein eng mit der Membran der Muzingranula von Becherzellen assoziiert ist. Es wird angenommen, dass es möglicherweise in die Azidifizierung des Granulainhaltes involviert ist, was einen wichtigen und kritischen Prozess bei der Packung und Sekretion von Muzinen darstellt (Leverkoehne und Gruber, 2002). Die große Ähnlichkeit des zellulären Expressionsmusters von mCLCA3 und eCLCA1 könnte auf eine ähnliche Funktion des equinen Homologen bei der Schleimsekretion hinweisen. Ein ähnlich detaillierter Vergleich mit dem Expressionsmuster des hCLCA1-Proteins des Menschen ist leider zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da das Verteilungsmuster des humanen Orthologen noch nicht systematisch untersucht worden ist. Basierend auf den mRNA-Daten, welche für hCLCA1 verfügbar sind, scheint auch hier eine Übereinstimmung der Expression von eCLCA1 und hCLCA1 im Respirations- und Intestinaltrakt zu bestehen (Gruber et al., 1998a; Hoshino et al., 2002), was insbesondere auch chronisch entzündliche Atemwegserkrankungen mit einschließt.

Größtenteils stimmt das mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmte Expressionsmuster mit den qPCR-Daten überein, was das ermittelte Verteilungsmuster von eCLCA1 zusätzlich bestätigt. Jedoch konnte im Uterus einer Stute ein, wenn auch nur geringes, mRNA-Signal nachgewiesen werden, wohingegen die immunhistochemische Untersuchung von fünf verschiedenen Tieren negativ verlief. Es ist denkbar, dass die eCLCA1-Proteinmengen bei diesen Stuten unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Zudem ist zu bedenken, dass die Schleimsekretion im Uterus starken, zyklusbedingten Schwankungen unterliegt und somit eine unterschiedliche Zusammensetzung des Schleims zu erwarten ist. Dies könnte sich auch auf die Produktion des eCLCA1-Proteins auswirken. Um diesen Punkt abschließend zu klären, wäre eine exakte Zyklusbestimmung der Stuten erforderlich. Da dies jedoch nicht Teil

der Fragestellung dieser Studie war, wurde auf weitergehende Untersuchungen zu diesem Punkt verzichtet.

Wie in den Arbeiten von Nakanishi und Mitarbeitern (2001) gezeigt, ist die Expression von mCLCA3 direkt mit dem Asthma-Phänotyp korreliert. Eine experimentell induzierte Überexpression von mCLCA3 führte zu einer deutlichen Becherzellmetaplasie und -hyperplasie mit stark vermehrter Schleimsekretion und deutlicher Verschlechterung des Asthma-Phänotyps. Eine *antisense*-Unterdrückung von mCLCA3 hingegen führte zu einer klaren Verbesserung des Krankheitsbildes. Auch für hCLCA1 konnten Hoshino und Mitarbeiter (2002) eine deutliche Überexpression bei Asthma bronchiale nachweisen.

Ähnlich wie die Aufregulierung von hCLCA1 bei Patienten mit Asthma bronchiale und mCLCA3 im murinen Asthmodell (Zhou et al., 2001; Hoshino et al., 2002; Toda et al., 2002) konnte in dieser Studie in Gesamtlungengewebsproben von COB-kranken Pferden sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene eine starke eCLCA1-Überexpression gezeigt werden.

Mittels Immunhistochemie konnte damit übereinstimmend deutlich gezeigt werden, dass das eCLCA1-Protein in den vermehrten, metaplastischen Becherzellen der kleinen Atemwege, insbesondere in den Bronchiolen, lokalisiert ist. Sowohl bei der COB der Pferde als auch beim humanen Asthma bronchiale und im murinen Asthmodell sind diese Becherzellen für die starke Schleimüberproduktion und die dadurch bedingte Obstruktion der Atemwege verantwortlich (Leguillette, 2003; Rogers, 2003). Aus diesem Grund könnten Pferde mit spontaner oder auch experimentell induzierter COB, wie bereits in früheren Arbeiten für andere Aspekte vorgeschlagen (Bureau et al., 2000; Snapper, 1986; Szelenyi, 2000; Zosky und Sly, 2007), als Modell für das humane Asthma bronchiale dienen, welches Untersuchungen zu der pathophysiologischen Rolle von eCLCA1 und hCLCA1 und auch deren mögliche therapeutische Relevanz mit einschließt.

Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich die Becherzellhyperplasie bei den hier untersuchten Pferden nicht nur auf den unteren Respirationstrakt beschränkt. Sowohl die morphometrischen Untersuchungen mittels PAS-Reaktion und Immunhistochemie (siehe Kapitel 5.6.5) als auch die Untersuchungen mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 5.6.1) zeigten neben der erwarteten Zunahme an Becherzellen im Bronchialepithel von Bronchien und Bronchiolen zusätzlich eine tracheale Becherzellhyperplasie bei COB, welches nach dem Kenntnisstand der Autorin bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Innerhalb des offenen Leserahmens von eCLCA1 konnten drei Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert werden. Nur die ersten beiden dieser SNP resultieren in einen Aminosäureaustausch (485 Histidin / Arginin und 490 Valin / Leuzin). Dieser Austausch führt

jedoch nur zu einer relativ kleinen Änderung des Aminosäurerestes. Sowohl Histidin als auch Arginin besitzen eine basische Seitenkette, Valin und Leuzin sind beides Aminosäuren mit einer hydrophoben Seitenkette. In wie weit es durch den Austausch dieser Aminosäuren zu einer Änderung der eCLCA1-Proteinstruktur und somit möglicherweise zu einer Beeinflussung der Funktion des Proteins kommt, bleibt zu diesem Zeitpunkt noch offen. Unser Kooperationspartner Wally B. Thoreson konnte in elektrophysiologischen Untersuchungen an transfizierten HEK 293-Zellen für beide Allelvariationen eine kalzium-aktivierbare Chloridionenleitfähigkeit nachweisen (Anton et al., 2005). Ein Unterschied zwischen den beiden Allelen konnte hierbei jedoch nicht aufgezeigt werden, so dass die biomedizinische Relevanz dieser SNP noch unklar bleibt.

Interessanterweise traten die SNP bei eCLCA1 in nur zwei Nukleotidkombinationen 1518 G / 1533 C / 1837 G beziehungsweise 1518 A / 1533 G / 1837 C in allen untersuchten 14 Pferden auf, was auf die Existenz von nur zwei verschiedenen, genomischen Allelen schließen lässt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die im Vergleich zu der genomischen Struktur von hCLCA1 sehr große, räumliche Nähe der SNP bei eCLCA1 sein, was das Vorkommen so genannter *crossing-over*-Ereignisse und dadurch bedingter intrachromosomaler Rekombinationen unwahrscheinlich macht. Von den untersuchten Pferden waren 30% bzw. 20% homozygot (Genotyp C bzw. Genotyp A) und 50% heterozygot (Genotyp B; siehe Abbildung 4). Dies deutet auf eine gleichmäßige Verteilung der Allele innerhalb der Pferdepopulation hin, wobei die hier untersuchte Tierzahl (n = 14) noch keinen endgültigen Schluss zulässt. In diesem Zusammenhang könnten die eCLCA1-SNP möglicherweise auch als Marker in genetischen Studien eingesetzt werden.

Für den humanen hCLCA1 ist bereits bekannt, dass Variationen in der Nukleotidsequenz eng mit der Disposition für Asthma bronchiale korreliert sind (Kamada et al., 2004). Auch für die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung des Menschen (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) konnten Hegab und Mitarbeiter (2004) einen Zusammenhang zwischen Nukleotidpolymorphismen und Haplotypen des hCLCA1 und der Wahrscheinlichkeit, an COPD zu erkranken, aufzeigen.

Für die COB der Pferde ist ebenfalls eine genetische Prädisposition bekannt (Marti et al., 1991). Hinsichtlich einer COB-Erkrankung konnte innerhalb der untersuchten 14 Pferde zunächst jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Alleltyp und einer möglichen Prädisposition aufgezeigt werden. Um diesen Aspekt näher beleuchten zu können, wäre die Untersuchung einer größeren Gruppe von Pferden erforderlich.

Um die Frage zu klären, welche Rolle eCLCA1 bei der equinen COB zukommt, musste geklärt werden, ob die deutlich vermehrte eCLCA1-mRNA-Molekülanzahl durch eine

transkriptionelle Aufregulation bedingt ist oder aber allein durch eine Zunahme der eCLCA1-exprimierenden Zellen. Dies ist wichtig, um zu beurteilen, ob CLCA-Moleküle primär als Regulatoren der Becherzellhyperplasie und Muzinproduktion fungieren, wie von den Gruppen um Nakanishi (2001) und Zhou (2001) angenommen, oder eine eher untergeordnete Rolle als „*Bystander*“-Moleküle spielen, welche sekundär durch die Becherzellhyperplasie bedingt ist. Die relative Quantifizierung der eCLCA1-mRNA-Kopienzahl in Becherzellen mittels *laser capture microdissection* und anschließender quantitativer RT-PCR konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der eCLCA1-Expression in Becherzellen von Pferden mit COB im Vergleich zu gesunden Pferden aufzeigen. Jedes Tier zeigte in jeder Becherzelle einen individuellen Expressionslevel, ohne dass die Höhe mit COB im Zusammenhang stand. Darüber hinaus konnte das eCLCA1-Protein bei COB mit Hilfe der Immunhistochemie in keiner anderen Zellpopulation nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse weiter untermauern zu können und sichere Aussagen über die gesamte Pferdepopulation treffen zu können, wäre jedoch die Untersuchung einer größeren Patientengruppe wünschenswert. Aus den in Kapitel 6.1.2 dargestellten Gründen wäre dies jedoch mit einem erheblichen Mehraufwand belastet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zunahme an eCLCA1-mRNA in Lungen COB-kranker Pferde einen Nebeneffekt darstellen könnte, welcher allein durch die Zunahme an eCLCA1-exprimierenden Becherzellen bedingt ist. Hinweise auf eine transkriptionelle Aufregulation in Becherzellen oder anderen Zellpopulationen ergaben die vorliegenden Ergebnisse nicht. Ähnliches konnte in der eigenen Arbeitsgruppe auch für den murinen Homologen mCLCA3 in einem murinen Modell für zystische Fibrose mit intestinaler Mukusobstruktion gezeigt werden, wo die Zunahme der mCLCA3-mRNA-Molekülzahl mit der der Becherzellanzahl korrelierte (Leverkoehne et al., 2006).

Dennoch könnte die mehr als zweifache Zunahme an eCLCA1-exprimierenden Becherzellen bei COB und in ähnlicher Weise die der mCLCA3-exprimierenden Becherzellen bei Mäusen im murinen CF-Modell auf eine signifikante, funktionelle Rolle dieser Moleküle bei COB bzw. CF hindeuten. Es bleibt unklar, wie die vektorinduzierte Überexpression des murinen Orthologen zu einer Becherzellhyperplasie führt und ihre *antisense*-Unterdrückung eine Reduktion der Becherzellen bewirkt (Hoshino et al., 2002; Nakanishi et al., 2001).

Darüber hinaus konnten die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Genexpressionsstudien an Gesamtgewebeproben kritisch hinterfragt werden müssen. Die unbestreitbar vorhandene Überexpression von eCLCA1-mRNA in Gesamtlungenproben von COB-kranken Pferden könnte ohne Beachtung der Anzahl der exprimierenden Becherzellen und einer Bestimmung

der mRNA-Kopienzahl auf Einzelzellebene zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse, nämlich einer transkriptionellen Aufregulation in den exprimierenden Zellen, verleiten.

Als ein unerwartetes Problem dieser Studie stellte sich die Beschaffung von geeignetem Probenmaterial COB-kranker Pferde heraus. Die in der Literatur angegebene hohe Prävalenz von bis zu 80% (Leguillette, 2003) bzw. 54,8% (Bracher et al., 1991) konnte bei den in dieser Studie zur Verfügung stehenden Tieren nicht bestätigt werden. Lediglich bei 22,5% der untersuchten, bereits stark vorselektierten Tiere fanden sich pathologische Veränderungen im Sinne einer COB. Bei 13 dieser 23 Pferde waren diese jedoch geringgradig und nur in einzelnen der zur Verfügung stehenden Lungenproben nachweisbar, so dass letztlich nur bei 10 Pferden zweifelsfrei die Diagnose COB histologisch gestellt werden konnte. Bei dem hier untersuchten Spektrum an Pferden handelt es sich jedoch nicht um eine zufällige Stichprobe im eigentlichen Sinn. Da ein Großteil der Tiere aus dem Sektionsgut der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover stammt, lag schon eine gewisse Vorauswahl vor. Interessanterweise wiesen dagegen 10 der 15 Schlachtpferde COB-verdächtige Befunde auf (66,6%), von denen sechs als eindeutig COB-erkrankt in die Studie eingingen.

Da das Probenmaterial aus verschiedenen Quellen relativ heterogen zusammengestellt war, lag eine unterschiedliche Qualität des Materials vor. Für die einzelnen, in dieser Studie durchgeführten Untersuchungsmethoden bestanden jedoch sehr unterschiedliche Ansprüche an die Qualität, Frische und Menge des Materials, so dass für die einzelnen Untersuchungsaspekte eine unterschiedliche Anzahl an Patienten zur Verfügung stand.

Die daraus resultierenden, schwankenden Gruppengrößen könnten als möglicher Schwachpunkt dieser Studie gewertet werden, waren aber aufgrund der technischen Bedingungen unvermeidbar. Es wurde immer die technisch maximal mögliche Anzahl an Patienten untersucht und die Gruppengrößen waren aus statistischer Sicht stets ausreichend.

6.2 Methodische Aspekte: Möglichkeiten und Grenzen der Ermittlung der mRNA-Kopienzahlen nach Lasermikrodissektion

Eine Herausforderung dieser Studie stellte unter anderem die Ermittlung der Kopienzahlen von eCLCA1-mRNA auf Einzelzellebene dar. Die hierfür eingesetzte Lasermikrodissektion (engl. *laser capture microdissection*, LCM) ist ein modernes Verfahren, welches zunehmend in Medizin und Wissenschaft eingesetzt wird. Die Schwierigkeit hierbei liegt in den extrem geringen Gewebe- und folglich auch geringen RNA-Mengen sowie einer reduzierten RNA-Erhaltung, was auf Gewebeprozessierungen einschließlich der Färbungen zurückzuführen ist. Um den Verlust an RNA durch Degradierung oder Auswaschen möglichst gering zu halten, werden für die LCM spezielle, verkürzte Färbeprotokolle verwendet. Für Färbungen wie Hämatoxylin/Eosin, Methyl Grün oder Nuclear Fast Red sind diese bereits etabliert (PALM).

Um also die Becherzellen mittels LCM aus dem Bronchialepithel herauszuschneiden und die enthaltene RNA zu isolieren, mussten diese zunächst exakt im Kryostatschnitt identifiziert werden, welches in H.E.-gefärbten Schnitten nur eingeschränkt zu gewährleisten ist. Die üblicherweise zur Detektion von Muzinen und somit von Becherzellen verwendeten Färbungen wie die PAS-Reaktion oder Alzian blau unter Verwendung der üblichen Protokolle führten in der eigenen Arbeit zu einem nahezu vollständigen Verlust der RNA und waren somit als Färbungen in der LCM ungeeignet. Auch ließen diese sich nicht in dem erforderlichen Maß kürzen, so dass nach alternativen Methoden zur Identifikation der Becherzellen gesucht wurde. Eine viel versprechende Methode stellte die „ultra-kurze Immunfärbemethode“ nach Smolinski (2006) dar. Hierbei handelt es sich um ein extrem verkürztes, immunhistologisches Protokoll. Voraussetzung ist ein optimal bindender Erstantikörper, der mit einem immunfluoreszierenden Fab-Fragment (Zenon „Alexa Fluor“[®] 488 Rabbit IgG Labeling Kit; Molekular Probes, Leiden, Niederlande) gekoppelt wird. Da der eCLCA1-spezifische Antikörper eC4r (Kapitel 4.11.1) in der konventionellen Immunhistochemie und im Western Blot sehr zuverlässig exakte Ergebnisse lieferte, wurde dieser in einem Vorversuch entsprechend der Herstellerangaben und dem Färbeprotokoll nach Smolinski (2006) eingesetzt. Diese Methode erwies sich für die Untersuchung der zu Verfügung stehenden Gewebeproben der Pferde jedoch als ungeeignet. Zwar konnte eine schwache Färbung der Becherzellen erzeugt werden, diese wurde jedoch durch eine extrem starke Eigenfluoreszenz des Gewebes überstrahlt.

Da demnach zur Identifizierung der Becherzellen eine direkte Färbung nicht möglich war, musste ein indirekter Weg etabliert werden. Dies sollte durch den Einsatz von Serienschnitten erfolgen. Von diesen wurde der erste nach den üblichen Protokollen PAS-gefärbt und die Schnittlinie um die nun gut zu identifizierenden Becherzellen mit Hilfe der PALM-Software eingezeichnet. Mittels der in der Software enthaltenen „Serial-Section-Funktion“

sollten die eingezeichneten Schnittlinien anhand von vorher markierten Gewebe-Referenzpunkten auf den zweiten, ungefärbten oder H.E.-gefärbten Serienschnitt übertragen werden. Schon minimalste Verzerrungen der Schnitte, welche sich aber bei der Anfertigung von Kryostatschnitten nicht immer vermeiden lassen, führten zu einer geringfügigen Divergenz der Referenzpunkte und somit zu einer unpräzisen Übertragung der Schnittlinien. Während diese Abweichung bei größeren Gewebeflächen möglicherweise noch tolerierbar ist, führt sie bei derart kleinen Objekten, wie den hier markierten Becherzellen (ca. 25 µm im Durchmesser), zu einer unakzeptablen Fehlerquote, sodass die Verwendung der „Serial-Section-Funktion“ ebenfalls ungeeignet für die Mikrodisektion von Einzelzellen war. Die verwendete Methode in dieser Studie umgeht dieses Problem, indem größere, exakt anhand prägnanter Strukturen im Schnitt definierte Bereiche des Epithels gewählt wurden. Die genaue Anzahl an Gesamtepithelzellen und Becherzellen in diesen Bereichen wurde anhand der PAS-gefärbten Schnitte bestimmt und die Bereiche anschließend aus den H.E.-gefärbten Schnitten herausgeschnitten. Zuvor wurde in Vorversuchen die Übertragbarkeit der Zellzahlen von einem zu dem anderen Schnitt überprüft. Die Fehlerquote lag hierbei stets unter einem Prozent (Daten nicht gezeigt). In den Untersuchungen zur Expression von eCLCA1 wurde gezeigt, dass im Bronchialepithel ausschließlich Becherzellen eCLCA1 exprimieren, so dass an Hand der in der quantitativen RT-PCR ermittelten Kopienzahlen direkt die eCLCA1-Kopienzahl pro Becherzelle berechnet werden konnte (Anhang 10.7, Tabelle 33). Das Referenzgen EF-1a wird hingegen auf konstantem Niveau von allen Zellen gleichermaßen exprimiert (Gruber und Levine, 1997), so dass für die Normalisierung der eCLCA1-Ergebnisse die EF-1a-Kopienzahlen auf die Gesamtanzahl an Epithelzellen bezogen werden müssen (Anhang 10.7, Tabelle 33). Diese indirekte Methode zur Bestimmung der mRNA-Expression in Einzelzellen mit Hilfe der LCM könnte sich als wertvolles Mittel für derartige Untersuchungen erweisen, auch wenn sie auf Grund der oft großen Anzahl an auszuzählenden Zellen recht aufwendig ist.

7. Zusammenfassung

Bei der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis der Pferde (COB; *recurrent airway obstruction*, RAO) stellt die Becherzellmetaplasie und -hyperplasie mit einer hieraus resultierenden Dyskrinie und Obstruktion der kleinen Luftwege einen zentralen Pathomechanismus dar. Dabei finden sich klinisch, pathogenetisch und histologisch zahlreiche Ähnlichkeiten zum Asthma bronchiale des Menschen. Die vor wenigen Jahren entdeckte Genfamilie der CLCA-Chloridkanäle (CLCA = engl. *chloride channel, calcium activated*) scheint eine zentrale Funktion bei der Muzinsynthese in Becherzellen und bei der Sekretion von Ionen und Wasser an epithelialen Barrieren einzunehmen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es bei Asthma bronchiale zu einer transkriptionellen Aufregulation von mCLCA3 bei der Maus und hCLCA1 beim Menschen kommt. Diese CLCA-Proteine kommen als frühe Auslöser der Becherzellmetaplasie und -hyperplasie und somit der Dyskrinie in Frage und scheinen folglich maßgeblich an der Pathogenese beteiligt zu sein. Ziel dieser Studie war es, die Rolle eines equinen Homologen zu hCLCA1 und mCLCA3 bei der chronisch-obstruktiven Bronchiolitis des Pferdes zu charakterisieren.

Hierzu wurde zunächst der entsprechende equine Vertreter der CLCA-Chloridkanäle, eCLCA1, identifiziert, kloniert und charakterisiert. Eine Sequenzanalyse identifizierte eCLCA1 als direkten Orthologen zu hCLCA1 und mCLCA3. Es wurden zwei eCLCA1-Allelvarianten, die sich durch insgesamt drei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) unterscheiden, identifiziert. Die beiden Allele scheinen in der Pferdepopulation etwa gleich stark verteilt zu sein. Nach Erzeugung von spezifischen anti-eCLCA1-Antikörpern wurde das eCLCA1-Protein immunhistochemisch in Muzin-produzierenden Becherzellen des Respirations- und Intestinaltraktes sowie in Schweißdrüsen der Haut und Schleimdrüsen der Nieren lokalisiert. In Gesamtgewebeproben des Atmungstraktes von Pferden mit COB wurde eine deutliche Überexpression von eCLCA1 durch Immunhistochemie und quantitative *real-time* RT-PCR gezeigt. Das eCLCA1-Protein wurde in hyper- und metaplastischen, bronchiolären und trachealen Becherzellen und in intraluminal gelegenen Schleim COB-erkrankter Pferde lokalisiert. Morphometrische Untersuchungen zeigten eine signifikante Zunahme von eCLCA1-exprimierenden Becherzellen bei COB sowohl in Bronchien und Bronchiolen als auch in der Trachea. Die Ermittlung der eCLCA1-mRNA Expressionsrate auf Einzelzellebene mittels *laser capture microdissection* und anschließender quantitativer RT-PCR hingegen konnte keinen Unterschied zwischen COB-kranken Pferden und gesunden Tieren aufzeigen, so dass die in Gesamtgewebeproben ermittelte Überexpression vermutlich auf die Zunahme der Becherzellanzahl zurückzuführen ist und nicht auf eine transkriptionelle Aufregulation.

Die mehr als zweifache Zunahme an eCLCA1-exprimierenden Becherzellen bei COB weist dennoch auf eine signifikante, funktionelle Rolle dieses Moleküls bei COB hin. Dabei wären die erhobenen Befunde sowohl mit einer primär-pathogenetischen Rolle von eCLCA1 bei der COB als auch mit einer sekundären, eventuell kompensatorischen Funktion vereinbar, möglicherweise über eine induzierte Aktivierung Kalzium-aktivierter Chloridströme zur vermehrten Befeuchtung des Atemwegschleims. Neben ihrem Modellcharakter für das Asthma des Menschen, bei dem eine derartige Untersuchung kaum durchgeführt werden kann, können die Ergebnisse bei zukünftigen Untersuchungen eingesetzt werden, die auf ein besseres Verständnis der eigentlichen Funktion von eCLCA1 abzielen.

8. Summary

Cloning and molecular characterization of the first equine CLCA homologue, eCLCA1, and first studies on its significance in equine chronic obstructive bronchiolitis

Goblet cell hyper- and metaplasia and a resulting mucus overproduction and obstruction of small airways are key mechanisms of chronic obstructive bronchiolitis in horses (COB; recurrent airway obstruction, RAO). There are numerous clinical, functional and histological similarities between COB and human asthma. Members of the CLCA gene family (chloride channels, calcium activated) have recently been shown to be critically involved in epithelial disorders with aberrant mucus production including asthma and cystic fibrosis. Specifically, the human hCLCA1 and the murine mCLCA3 induce goblet cell metaplasia and overproduction of mucins and are prime candidates as genetic modulators in childhood asthma and murine models of asthma. The aim of this study was to determine the role of an equine CLCA-family member in the pathogenesis of chronic obstructive bronchiolitis in horses.

In this study, the first equine homologue of the CLCA gene family, eCLCA1, was identified, cloned and characterized. Sequence analyses identified eCLCA1 as the equine orthologue of the human hCLCA1 and the murine mCLCA3. Two allelic variations of eCLCA1 with three single nucleotide polymorphisms (SNP) were identified, with an approximately equal distribution in the equine population. Immunohistochemical analyses using antibodies raised against eCLCA1 identified expression in various mucin producing cells in the respiratory and alimentary tracts as well as in the kidney and skin. Importantly, real-time RT-qPCR as well as immuno-histochemistry disclosed a strong upregulation of eCLCA1 in the airways of horses suffering from COB. The eCLCA1 protein was detected in hyper- and metaplastic goblet cells of bronchi, bronchioli and trachea of COB-affected horses as well as in intraluminal mucins. A significant increase in eCLCA1-expressing goblet cells was identified by morphometrical analyses in bronchial and tracheal epithelia of COB-affected horses. No difference in the eCLCA1 mRNA expression level per single goblet cell was detected between COB-affected and unaffected horses by RT-qPCR following laser capture microdissection, suggesting that the increase in eCLCA1 expression is due to increased numbers of goblet cells, rather than transcriptional upregulation in the individual cell. Nevertheless, the more than two-fold increase of goblet cells secreting eCLCA1 under conditions of equine COB may still be consistent with a significant functional role of this molecule in COB. The results of this study are compatible with a primary pathogenic role of eCLCA1 in COB as well as with a secondary, possibly compensatory function, potentially due to increased hydration of the airway mucus by mediating calcium-activated chloride conductions. In addition to their model

character for human asthma in which such a study is hard to perform, the results of this study set the stage for future investigations focused on the molecular function of eCLCA1.

9. Literaturverzeichnis

- Abdel-Ghany, M., H.C. Cheng, R.C. Elble, H. Lin, J. DiBiasio und B.U. Pauli, 2003: The interacting binding domains of the beta(4) integrin and calcium-activated chloride channels (CLCAs) in metastasis. *J Biol Chem* 278:49406-16.
- Agnel, M., T. Vermat und J.M. 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* 455:295-301.
- Anderson, M.P., R.J. Gregory, S. Thompson, D.W. Souza, S. Paul, R.C. Mulligan, A.E. Smith und M.J. Welsh, 1991: Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-5.
- Angermann, J.E., A.R. Sanguinetti, J.L. Kenyon, N. Leblanc und I.A. Greenwood, 2006: Mechanism of the inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents by phosphorylation in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 128:73-87.
- Banks, W., 1993: *Applied Veterinary Histology*. 3 ed. St Louis, Mosby Year Book.
- Barnes, S., 1994: After transduction: response shaping and control of transmission by ion channels of the photoreceptor inner segments. *Neuroscience* 58:447-59.
- Barnes, S. und B. Hille, 1989: Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J Gen Physiol* 94:719-43.
- Beech, J., 1991: Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 7:79-91.
- Berger, H.A., M.P. Anderson, R.J. Gregory, S. Thompson, P.W. Howard, R.A. Maurer, R. Mulligan, A.E. Smith und M.J. Welsh, 1991: Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest* 88:1422-31.
- Böck, P., 1989: *Romeis – Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Verlag Urban und Schwarzenberg, München.
- Bormann, J., O.P. Hamill und B. Sakmann, 1987: Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-86.
- Boushey, H.A. und J.V. Fahy, 1995: Basic mechanisms of asthma. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6:229-33.
- Bracher, V., R. von Fellenberg, C.N. Winder, G. Gruenig, M. Hermann und A. Kraehenmann, 1991: An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Vet J* 23:136-41.

- Broadstone, R.V., J.S. Scott, F.J. Derksen und N.E. Robinson, 1988: Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J Appl Physiol* 65:2720-5.
- Bureau, F., S. Delhalle, G. Bonizzi, L. Fievez, S. Dogne, N. Kirschvink, A. Vanderplasschen, M.P. Merville, V. Bours und P. Lekeux, 2000: Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol* 165:5822-30.
- Bustin, S.A., 2000: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-93.
- Chen, T.Y. und C. Miller, 1996: Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl- channel. *J Gen Physiol* 108:237-50.
- Chung, C., I. Fang, V. Nguyen, C. Luk, G. Kent und R. Rozmahel, 2001: Investigation of mCLCA3 as a modifier of CF disease in mice. *Pediatr Pulm Suppl* 22:A125.
- Clarke, A.F., 1987: A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine Vet J* 19:435-41.
- Clarke, L.L., B.R. Grubb, S.E. Gabriel, O. Smithies, B.H. Koller und R.C. Boucher, 1992: Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* 257:1125-8.
- Clarke, L.L., B.R. Grubb, J.R. Yankaskas, C.U. Cotton, A. McKenzie und R.C. Boucher, 1994: Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:479-83.
- Cliff, W.H., R.A. Schoumacher und R.A. Frizzell, 1992: cAMP-activated Cl channels in CFTR-transfected cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol* 262:C1154-60.
- Connon, C.J., S. Kawasaki, K. Yamasaki, A.J. Quantock und S. Kinoshita, 2005: The quantification of hCLCA2 and colocalisation with integrin beta4 in stratified human epithelia. *Acta Histochem* 106:421-5.
- Connon, C.J., K. Yamasaki, S. Kawasaki, A.J. Quantock, N. Koizumi und S. Kinoshita, 2004: Calcium-activated chloride channel-2 in human epithelia. *J Histochem Cytochem* 52:415-8.
- Cornet-Boyaka, E., A. Di, S.Y. Chang, A.P. Naren, A. Tousson, D.J. Nelson und K.L. Kirk, 2002: CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12477-82.
- Cunningham, S.A., M.S. Awayda, J.K. Buben, I.I. Ismailov, M.P. Arrate, B.K. Berdiev, D.J. Benos und C.M. Fuller, 1995: Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem* 270:31016-26.
- Deegen, E., W. Drommer, H.J. Klein und F.J. Kaup, 1987: Zur Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis beim Pferd: Klinische und funktionelle Parameter sowie licht-

- und elektronenmikroskopische Befunde. 17. Kongress der DVG, Bad Nauheim:242-55.
- Delay, R.J., A.E. Dubin und V.E. Dionne, 1997: A cyclic nucleotide-dependent chloride conductance in olfactory receptor neurons. *J Membr Biol* 159:53-60.
- Derksen, F.J., 1991: Chronic obstructive pulmonary disease, p. 223-235, *In* J. Beech, ed. *Equine Respiratory Disorders*. Lea and Febiger, Philadelphia London.
- Derksen, F.J., 1993: Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition. *Equine Vet J* 25:257-8.
- Derksen, F.J., N.E. Robinson, J.S. Scott und J.A. Stick, 1988: Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res* 49:933-8.
- Dixon, P.M., D.I. Railton und B.C. McGorum, 1995: Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. *Equine Vet J* 27:416-21.
- Duan, D., C. Winter, S. Cowley, J.R. Hume und B. Horowitz, 1997: Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390:417-21.
- Dutzler, R., E.B. Campbell, M. Cadene, B.T. Chait und R. MacKinnon, 2002: X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287-94.
- Eggermont, J., 2004: Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved? *Proc Am Thorac Soc* 1:22-7.
- Ehrenberg, L., I. Fedorcsak und F. Solymosy, 1974: Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 16:189 - 262.
- Elble, R.C., G. Ji, K. Nehrke, J. DeBiasio, P.D. Kingsley, M.I. Kotlikoff und B.U. Pauli, 2002: Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J Biol Chem* 277:18586-91.
- Elble, R.C. und B.U. Pauli, 2001: Tumor suppression by a proapoptotic calcium-activated chloride channel in mammary epithelium. *J Biol Chem* 276:40510-7.
- Elble, R.C., V. Walia, H.C. Cheng, C.J. Connon, L. Mundhenk, A.D. Gruber und B.U. Pauli, 2006: The putative chloride channel hCLCA2 has a single C-terminal transmembrane segment. *J Biol Chem* 281:29448-54.
- Elble, R.C., J. Widom, A.D. Gruber, M. Abdel-Ghany, R. Levine, A. Goodwin, H.C. Cheng und B.U. Pauli, 1997: Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J Biol Chem* 272:27853-61.
- Evans, S.R., W.B. Thoreson und C.L. Beck, 2004: Molecular and functional analyses of two new calcium-activated chloride channel family members from mouse eye and intestine. *J Biol Chem* 279:41792-800.

- Fairbairn, S.M., C.P. Page, P. Lees und F.M. Cunningham, 1993: Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy* 23:821-8.
- Firestein, S. und G.M. Shepherd, 1995: Interaction of anionic and cationic currents leads to a voltage dependence in the odor response of olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 73:562-7.
- Frizell, R.A., D.R. Halm, G. Rechkemmer und R.L. Shoemaker, 1986: Chloride channel regulation in secretory epithelia. *Federation Proc* 45:2727-31.
- Fuller, C.M. und D.J. Benos, 2000: Ca²⁺-Activated Cl⁻ Channels: A Newly Emerging Anion Transport Family. *News Physiol Sci* 15:165-71.
- Fuller, C.M., I.I. Ismailov, D.A. Keeton und D.J. Benos, 1994: Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 269:26642-50.
- Furukawa, T., T. Ogura, Y. Katayama und M. Hiraoka, 1998: Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am J Physiol* 274:C500-12.
- Gabriel, S.E., L.L. Clarke, R.C. Boucher und M.J. Stutts, 1993: CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363:263-8.
- Gandhi, R., R.C. Elble, A.D. Gruber, K.D. Schreur, H.L. Ji, C.M. Fuller und B.U. Pauli, 1998: Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem* 273:32096-101.
- Gaspar, K.J., K.J. Racette, J.R. Gordon, M.E. Loewen und G.W. Forsyth, 2000: Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. *Physiol Genomics* 3:101-11.
- Geisel, O. und J. von Sandersleben, 1987: Pathomorphologie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung beim Pferd. *Tierarztl Prax Suppl* 2:52-6.
- Gibson, A., A.P. Lewis, K. Affleck, A.J. Aitken, E. Meldrum und N. Thompson, 2005: hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J Biol Chem* 280:27205-12.
- Giguere, S., L. Viel, E. Lee, R.J. MacKay, J. Hernandez und M. Franchini, 2002: Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol* 85:147-58.
- Gray, P.R., F.J. Derksen, N.E. Robinson, L.J. Carpenter-Deyo, H.G. Johnson und R.A. Roth, 1989a: The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am Rev Respir Dis* 140:154-60.

- Gray, M.A., A. Harris, L. Coleman, J.R. Greenwell und B.E. Argent, 1989b: Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am J Physiol* 257:C240 - 51.
- Grubb, B.R. und R.C. Boucher, 1999: Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev* 79:S193-214.
- Gruber, A.D., R.C. Elble, H.L. Ji, K.D. Schreur, C.M. Fuller und B.U. Pauli, 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* 54:200-14.
- Gruber, A.D., R.C. Elble und B. U. Pauli, 2002: Discovery and cloning of the CLCA gene family. *Curr Top Membr* 53:367-87.
- Gruber, A.D., C.M. Fuller, R.C. Elble, D.J. Benos und B.U. Pauli, 2000: The CLCA gene family: a novel family of putative chloride channels. *Curr Genomics* 1:201-22.
- Gruber, A.D., R. Gandhi und B.U. Pauli, 1998b: The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochem Cell Biol* 110:43-9.
- Gruber, A.D. und R.A. Levine. 1997: In situ assessment of mRNA accessibility in heterogeneous tissue samples using elongation factor-1 alpha (EF-1 alpha). *Histochem Cell Biol* 107:411-6.
- Gruber, A.D. und B.U. Pauli, 1999a: Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Biochim Biophys Acta* 1444:418-23.
- Gruber, A.D. und B.U. Pauli, 1999b: Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res* 59:5488-91.
- Gruber, A.D., K.D. Schreur, H.L. Ji, C.M. Fuller und B.U. Pauli, 1999c: Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am J Physiol* 276:C1261-70.
- Guggino, W.B., 1994: Current topics in membranes, p. 1-354, *In* W.B. Guggino, ed. Chloride channels, Vol. 42, Academic Press, San Diego.
- Halm, D.R., G.R. Rechkemmer, R.A. Schoumacher und R.A. Frizzell, 1988: Apical membrane chloride channels in a colonic cell line activated by secretory agonists. *Am J Physiol* 254:C505-11.
- Hartzell, C., I. Putzier und J. Arreola, 2005: Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67:719-58.
- Hauber, H.P., A. Tsicopoulos, B. Wallaert, S. Griffin, N.G. McElvaney, P. Daigneault, Z. Mueller, R. Olivenstein, K.J. Holroyd, R.C. Levitt und Q. Hamid, 2004: Expression of

- HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction. *Eur Respir J* 23:846-50.
- Hegab, A.E., T. Sakamoto, Y. Uchida, A. Nomura, Y. Ishii, Y. Morishima, M. Mochizuki, T. Kimura, W. Saitoh, H.H. Massoud, H.M. Massoud, K.M. Hassanein und K. Sekizawa. 2004: CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 41:e27.
- Herness, M.S. und X.D. Sun, 1999: Characterization of chloride currents and their noradrenergic modulation in rat taste receptor cells. *J Neurophysiol* 82:260-71.
- Horowitz, B., S.S. Tsung, P. Hart, P.C. Levesque und J.R. Hume, 1993: Alternative splicing of CFTR Cl⁻ channels in heart. *Am J Physiol* 264:H2214-20.
- Hoshino, M., S. Morita, H. Iwashita, Y. Sagiya, T. Nagi, A. Nakanishi, Y. Ashida, O. Nishimura, Y. Fujisawa und M. Fujino, 2002: Increased expression of the human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1132-6.
- Hubner, C.A., V. Stein, I. Hermans-Borgmeyer, T. Meyer, K. Ballanyi und T.J. Jentsch, 2001: Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30:515-24.
- Hwang, T.C., L. Lu, P.L. Zeitlin, D.C. Gruenert, R. Haganir und W.B. Guggino, 1989: Cl⁻ channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* 244:1351-3.
- Ismailov, I., C.M. Fuller, B.K. Berdiev, V.G. Shlyonsky, D.J. Benos und K.E. Barrett, 1996: A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10505-9.
- Itoh, R., S. Kawamoto, Y. Miyamoto, S. Kinoshita und K. Okubo, 2000: Isolation and characterization of a Ca(2+)-activated chloride channel from human corneal epithelium. *Curr Eye Res* 21:918-25.
- Jackson, P.S., R. Morrison und K. Strange, 1994: The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am J Physiol* 267:C1203-9.
- Jentsch, T.J., V. Stein, F. Weinreich und A.A. Zdebik, 2002: Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503-68.
- Jentsch, T.J., K. Steinmeyer und G. Schwarz, 1990: Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348:510-4.

- Jeong, S.M., H.K. Park, I.S. Yoon, J.H. Lee, J.H. Kim, C.G. Jang, C.J. Lee und S.Y. Nah, 2005: Cloning and expression of Ca²⁺-activated chloride channel from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 334:569-76.
- Jovov, B., I.I. Ismailov, B.K. Berdiev, C.M. Fuller, E.J. Sorscher, J.R. Dedman, M.A. Kaetzel und D.J. Benos, 1995: Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* 270:29194-200.
- Kamada, F., Y. Suzuki, C. Shao, M. Tamari, K. Hasegawa, T. Hirota, M. Shimizu, N. Takahashi, X.Q. Mao, S. Doi, H. Fujiwara, A. Miyatake, K. Fujita, Y. Chiba, Y. Aoki, S. Kure, G. Tamura, T. Shirakawa und Y. Matsubara, 2004: Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun* 5:540-7.
- Kaup, F.J., W. Drommer, S. Damsch und E. Deegen, 1990: Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J* 22:349-55.
- Kaupmann, K., K. Huggel, J. Heid, P.J. Flor, S. Bischoff, S.J. Mickel, G. McMaster, C. Angst, H. Bittiger, W. Froestl und B. Bettler, 1997: Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-46.
- Kleene, S.J. und R.C. Gesteland, 1991: Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J Neurosci* 11:3624-9.
- Komiya, T., Y. Tanigawa und S. Hirohashi, 1999: Cloning and identification of the gene gob-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 255:347-51.
- Krapivinsky, G.B., M.J. Ackerman, E.A. Gordon, L.D. Krapivinsky und D.E. Clapham, 1994: Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76:439-48.
- Kurahashi, T. und K.W. Yau, 1994: Olfactory transduction. Tale of an unusual chloride current. *Curr Biol* 4:256-8.
- Laemmli U. K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Landry, D.W., M.H. Akabas, C. Redhead, A. Edelman, E.J. Cragoe Jr. und Q. Al-Awqati, 1989: Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science* 244:1469-72.
- Landry, D.W., S. Sullivan, M. Nicolaidis, C. Redhead, A. Edelman, M. Field, Q. Al-Awqati und J. Edwards, 1993: Molecular cloning and characterization of p64, a chloride channel protein from kidney microsomes. *J Biol Chem* 268:14948-55.

- Lavoie, J.P., K. Maghni, M. Desnoyers, R. Taha, J.G. Martin und Q.A. Hamid, 2001: Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1410-3.
- Lee, M.G., D.W. Macglashan Jr. und B.J. Undem, 2005: Role of chloride channels in bradykinin-induced guinea pig airway vagal C-fibre activation. *J Physiol* 566:205-12.
- Leguillette, R., 2003: Recurrent airway obstruction - heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract* 19:63-86.
- Lepple-Wienhues, A., I. Szabo, T. Laun, N.K. Kaba, E. Gulbins und F. Lang, 1998: The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol* 141:281-6.
- Leverkoehne, I. und A.D. 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* 50:829-38.
- Leverkoehne, I., B.A. Horstmeier, G. von Samson-Himmelstjerna, B.J. Scholte und A.D. Gruber, 2002: Real-time RT-PCR quantitation of mCLCA1 and mCLCA2 reveals differentially regulated expression in pre- and postnatal murine tissues. *Histochem Cell Biol* 118:11-7.
- Leverkoehne, I., H. Holle, F. Anton und A.D. Gruber, 2006: Differential expression of calcium-activated chloride channels (CLCA) gene family members in the small intestine of cystic fibrosis mouse models. *Histochem Cell Biol* 126:239-50.
- Liebich, H.G. und J. Maierl, 1999: Harnorgane (Organa urinaria), p. 246-261, *In* H. J. Liebich, ed. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, Vol. 3. Schattauer, Stuttgart.
- Littlejohn, A., 1979: Chronic obstructive pulmonary disease in horses. *Vet Bull* 49:907-17.
- Loewen, M.E., L.K. Bekar, W. Walz, G.W. Forsyth und S.E. Gabriel, 2004: pCLCA1 lacks inherent chloride channel activity in an epithelial colon carcinoma cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G33-41.
- Loewen, M.E., S.E. Gabriel und G.W. Forsyth, 2002: The calcium-dependent chloride conductance mediator pCLCA1. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C412-21.
- Lowe, G. und G.H. Gold, 1993: Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J Physiol* 462:175-96.
- Machaca, K. und S. Haun, 2002: Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca(2+) store depletion from store-operated Ca(2+) entry. *J Cell Biol* 156:75-85.
- Mair, T.S., 1995: Changing concepts of COPD. *Equine Vet J* 27:402-3.
- Maitra, A. und V. Kumar, 2005: Diseases of infancy and Childhood, p. 489-495, *In* Kummur und A. Fausto, eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed. Elsevier Saunders.

- Maricq, A.V. und J.I. Korenbrot, 1988: Calcium and calcium-dependent chloride currents generate action potentials in solitary cone photoreceptors. *Neuron* 1:503-15.
- Marmorstein, L.Y., P.J. McLaughlin, J.B. Stanton, L. Yan, J.W. Crabb und A.D. Marmorstein, 2002: Bestrophin interacts physically and functionally with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 277:30591-7.
- Marquardt, A., H. Stohr, L.A. Passmore, F. Kramer, A. Rivera und B.H. Weber, 1998: Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Hum Mol Genet* 7:1517-25.
- Marti, E., H. Gerber, G. Essich, J. Oulehla und S. Lazary, 1991: The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* 23:457-60.
- McBride, D.W. Jr. und S.D. Roper, 1991: Ca(2+)-dependent chloride conductance in *Necturus* taste cells. *J Membr Biol* 124:85-93.
- McEwan Jenkinson, D., H.Y. Elder und D.L. Bovell, 2006: Equine sweating and anhidrosis Part 1-equine sweating. *Vet Dermatol* 17:361-92.
- McGorum, B.C., P.M. Dixon und R.E. Halliwell, 1993: Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J* 25:261-7.
- McGorum, B.C., J. Ellison und R.T. Cullen, 1998: Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J* 30:430-4.
- McPherson, E.A., G.H. Lawson, J.R. Murphy, J.M. Nicholson, J.A. Fraser, R.G. Breeze und H.M. Pirie, 1978: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. *Equine Vet J* 10:47-53.
- Miller, C., 1982: Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299:401-11.
- Mundhenk, L., M. Alfalah, R.C. Elble, B.U. Pauli, H.Y. Naim und A.D. Gruber, 2006: Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. *J Biol Chem* 281:30072-80.
- Mundhenk, L. 2007: Proteinbiochemische Strukturanalysen der orthologen CLCA-Proteine eCLCA1 des Pferdes und mCLCA3 der Maus: Ein Beitrag zum Verständnis ihrer Funktionsweisen. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Nakanishi, A., S. Morita, H. Iwashita, Y. Sagiya, Y. Ashida, H. Shirafuji, Y. Fujisawa, O. Nishimura und M. Fujino, 2001: Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5175-80.
- Nilius, B., J. Eggermont und G. Droogmans, 2000: The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem* 10:313-20.

- Owens, D.F., L.H. Boyce, M.B. Davis und A.R. Kriegstein, 1996: Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-23.
- Pawlowski, K., M. Lepisto, N. Meinander, U. Sivars, M. Varga und E. Wieslander, 2006: Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels. *Proteins* 63:424-39.
- Pearson, E.G. und T.W. Riebold, 1989: Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc* 194:1287-91.
- Petrukhin, K., M.J. Koisti, B. Bakall, W. Li, G. Xie, T. Marknell, O. Sandgren, K. Forsman, G. Holmgren, S. Andreasson, M. Vujic, A.A. Bergen, V. McGarty-Dugan, D. Figueroa, C.P. Austin, M.L. Metzker, C.T. Caskey und C. Wadelius, 1998: Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 19:241-7.
- Pirie, R.S., P.M. Dixon, D.D. Collie und B.C. McGorum, 2001: Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 33:311-8.
- Piwon, N., W. Gunther, M. Schwake, M.R. Bosl und T.J. Jentsch, 2000: CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-73.
- Qian, Z., D. Okuhara, M.K. Abe und M.R. Rosner, 1999: Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J Biol Chem* 274:1621-7.
- Qu, Z., R.W. Wei, W. Mann und H.C. Hartzell, 2003: Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca²⁺-activated Cl⁻ currents. *J Biol Chem* 278:49563-72.
- Racette, K.J., S.E. Gabriel, K.J. Gaspar und G.W. Forsyth, 1996: Monoclonal antibody against conductive chloride transport in pig ileal apical membrane vesicles. *Am J Physiol* 271:C478-85.
- Radostits, O.M., D.C. Blood und C.C. Gay, 1994: Diseases characterized by respiratory tract involvement, *In* D. C. B. C. C. G. O.M. Radostits, ed. *Veterinary Medicine: a textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 8th ed. Balliere Tindall, London.
- Ran, S. und D.J. Benos, 1991: Isolation and functional reconstitution of a 38-kDa chloride channel protein from bovine tracheal membranes. *J Biol Chem* 266:4782-8.
- Ran, S. und D.J. Benos, 1992: Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl⁻ channel protein isolated from bovine trachea. *J Biol Chem* 267:3618-25.
- Redhead, C.R., A.E. Edelman, D. Brown, D.W. Landry und Q. Al-Awqati, 1992: A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3716-20.

- Reichling, D.B., A. Kyrozis, J. Wang und A.B. MacDermott, 1994: Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J Physiol* 476:411-21.
- Rich, D.P., H.A. Berger, S.H. Cheng, S.M. Travis, M. Saxena, A.E. Smith und M.J. Welsh, 1993: Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem* 268:20259-67.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic und J.L. Chou, 1989: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73.
- Ritzka, M., F. Stanke, S. Jansen, A.D. Gruber, L. Pusch, S. Woelfl, H.J. Veeze, D.J. Halley und B. Tümmler, 2004: The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. *Hum Genet* 115:483-91.
- Ritzka, M., C. Weinel, F. Stanke und B. Tümmler, 2003: Sequence Comparison of the Whole Murine and Human CLCA Locus Reveals Conserved Synteny Between Both Species. *Genome Letters* 2:149-54.
- Rivera, C., J. Voipio, J.A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma und K. Kaila, 1999: The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-5.
- Robinson, N.E., 2001: International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 33:5-19.
- Robinson, N.E., F.J. Derksen, M.A. Olszewski und V.A. Buechner-Maxwell, 1996: The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J* 152:283-306.
- Robinson, N.E. und R. Wilson, 1989: Airway obstruction in the horse. *J Equine vet Sci* 9:155-9.
- Rogers, D.F., 2003: The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1-6.
- Romio, L., L. Musante, R. Cinti, M. Seri, O. Moran, O. Zegarra-Moran und L.J. Galletta, 1999: Characterization of a murine gene homologous to the bovine CaCC chloride channel. *Gene* 228:181-8.
- Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy und N. Hidaka, 1989: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-65.
- Rowntree, R.K. und A. Harris, 2003: The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 67:471-85.
- Rozmahel, R., M. Wilschanski, A. Matin, S. Plyte, M. Oliver, W. Auerbach, A. Moore, J. Forstner, P. Durie, J. Nadeau, C. Bear und L.C. Tsui, 1996: Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 12:280-7.

- Sasse, H.H.L., 1995: C.O.B.-Prognose und Behandlungsmaßnahmen. *Collegium Veterinarium* 25:XXV, 66-9.
- Sato, K. und N. Suzuki, 2000: The contribution of a Ca(2+)-activated Cl(-) conductance to amino-acid-induced inward current responses of ciliated olfactory neurons of the rainbow trout. *J Exp Biol* 203:253-62.
- Schmidbauer, S.M., M. Venner, G. von Samson-Himmelstjerna, W. Drommer und A.D. Gruber, 2004: Compensated overexpression of procollagens alpha 1(I) and alpha 1(III) following perilla mint ketone-induced acute pulmonary damage in horses. *J Comp Pathol* 131:186-98.
- Schmidt-Rose, T. und T.J. Jentsch, 1997: Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7633-8.
- Schwiebert, E.M., M.E. Egan, T.H. Hwang, S.B. Fulmer, S.S. Allen, G.R. Cutting und W.B. Guggino, 1995: CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81:1063-73.
- Scott, J.S., R.V. Broadstone, F.J. Derksen und N.E. Robinson, 1988: Beta-adrenergic blockade in ponies with recurrent obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 64:2324-8.
- von Smolinski D., M. Blessenohl, C. Neubauer, K. Kalies und A. Gebert. 2006: Validation of a novel ultra-short immuno-labelling method for high quality mRNA preservation in laser microdissection and real-time RT-PCR. *J Mol Diagn* 8(2):246-53.
- Snapper, J.R. 1986: Large animal models of asthma. *Am Rev Respir Dis* 133:351-2.
- Shibata, H., T.O. Satoh, T. Ugawa, N. Masuda, H. Yanai-Inamura, A. Abe, Y. Kondo, T. Kuramochi, S. Akamatsu und W. Uchida, 2005: Characterization of the pharmacology of YM-198313 on volume-regulated anion channels. *Biol Pharm Bull* 28:1187-91.
- Stohr, H., A. Marquardt, I. Nanda, M. Schmid und B.H. Weber, 2002: Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur J Hum Genet* 10:281-4.
- Strauss, O. und R. Rosenthal, 2005: Funktion des Bestrophin. *Ophthalmologe* 102:122-6.
- Sun, H., T. Tsunenari, K.W. Yau und J. Nathans, 2002: The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4008-13.
- Surprenant, A., G. Buell und R.A. North, 1995: P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18:224-9.
- Szelenyi, I. 2000: Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res* 49:639-54.
- Talukdar, A.H., M.L. Calhoun und A.W. Stinson, 1972: Microscopic anatomy of the skin of the horse. *Am J Vet Res* 33:2365-90.

- Thevenod, F., E. Roussa, D.J. Benos und C.M. Fuller, 2003: Relationship between a HCO₃⁻-permeable conductance and a CLCA protein from rat pancreatic zymogen granules. *Biochem Biophys Res Commun* 300:546-54.
- Thorsen, J., R.A. Willoughby, W. McDonell, V.E. Valli, L. Viel und W. Bignell, 1983: Influenza hemagglutination inhibiting activity in respiratory mucus from horses with chronic obstructive pulmonary disorders (heaves syndrome). *Can J Comp Med* 47:332-5.
- Thurlbeck, W.M. und F.C. Lowell, 1964: Heaves in Horses. *Am Rev Respir Dis* 89:82-8.
- Toda, M., M.K. Tulic, R.C. Levitt und Q. Hamid. 2002: A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109:246-50.
- Trouet, D., B. Nilius, A. Jacobs, C. Remacle, G. Droogmans und J. Eggermont, 1999: Caveolin-1 modulates the activity of the volume-regulated chloride channel. *J Physiol* 520 Pt 1:113-9.
- Tsunenari, T., H. Sun, J. Williams, H. Cahill, P. Smallwood, K.W. Yau und J. Nathans, 2003: Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *J Biol Chem* 278:41114-25.
- Valverde, M.A., M. Diaz, F.V. Sepúlveda, D.R. Gill, S.C. Hyde und C.F. Higgins, 1992: Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355:830-33.
- Voets, T., V. Manolopoulos, J. Eggermont, C. Ellory, G. Droogmans und B. Nilius, 1998: Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol* 506 Pt 2:341-52.
- Wagner, J.A., A.L. Cozens, H. Schulman, D.C. Gruenert, L. Stryer und P. Gardner, 1991: Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Nature* 349:793-6.
- Wang, J., D.B. Reichling, A. Kyrozis und A.B. MacDermott, 1994: Developmental loss of GABA- and glycine-induced depolarization and Ca²⁺ transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *Eur J Neurosci* 6:1275-80.
- Webster, A.J., A.F. Clarke, T.M. Madelin und C.M. Wathes, 1987: Air hygiene in stables. 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine Vet J* 19:448-53.
- Willumsen, N.J. und R.C. Boucher, 1989: Activation of an apical Cl⁻ conductance by Ca²⁺ ionophores in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 256:C226-33.
- Yamazaki, J., K. Okamura, K. Ishibashi und K. Kitamura, 2005: Characterization of CLCA protein expressed in ductal cells of rat salivary glands. *Biochim Biophys Acta* 1715:132-44.

- Yoon, I.S., S.M. Jeong, S.N. Lee, J.H. Lee, J.H. Kim, M.K. Pyo, B.H. Lee, S.H. Choi, H. Rhim, H. Choe und S.Y. Nah, 2006: Cloning and heterologous expression of a Ca²⁺-activated chloride channel isoform from rat brain. *Biol Pharm Bull* 29:2168-73.
- Zhou, Y., Q. Dong, J. Louahed, C. Dragwa, D. Savio, M. Huang, C. Weiss, Y. Tomer, M.P. McLane, N.C. Nicolaides und R.C. Levitt, 2001: Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:486-91.
- Zhou, Y., M. Shapiro, Q. Dong, J. Louahed, C. Weiss, S. Wan, Q. Chen, C. Dragwa, D. Savio, M. Huang, C. Fuller, Y. Tomer, N.C. Nicolaides, M. McLane und R.C. Levitt, 2002: A calcium-activated chloride channel blocker inhibits goblet cell metaplasia and mucus overproduction. *Novartis Found Symp* 248:150-65; discussion 165-70, 277-82.
- Zhu, D., C.F. Cheng und B.U. Pauli, 1992: Blocking of lung endothelial cell adhesion molecule-1 (Lu-ECAM-1) inhibits murine melanoma lung metastasis. *J Clin Invest* 89:1718-24.
- Zhu, D.Z., C.F. Cheng und B.U. Pauli, 1991: Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9568-72.
- Zosky, G.R. und P.D. Sly. 2007: Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37:973-88.

10. Anhang

10.1 Untersuchte Pferde

Tabelle 22: Untersuchte Pferde

Identifikation*	Geschlecht / Rasse**	Gewicht in kg	Alter in Jahren
2146/03	Wallach	323	2
2249/03	Stute	466	7
2270/03	Stute	506	13
2346/03	Hengst	190	0,5
2352/03	Wallach	556	Adult
2353/03	Wallach / Pony	258	13
2362/03	Hengst	190	0,5
2441/03	Stute	550	10
2506/03	Wallach	590	7
2563/03	Hengst	204	Fohlen
2582/03	Hengst	258	0,5
2587/03	Wallach / Pony	264	Adult
2618/03	Stute	447	Adult
2642/03	Hengst	470	12,5
2746/03	Wallach	636	6
3036/03	Stute / Pony	256	9
0290/04	Stute	n.a.	18
0387/04	Stute / Isländer	310	Adult
0396/04	Wallach	379	8
0420/04	Stute	498	9
1123/04	Wallach	536	9
1168/04	Stute	612	4
1201/04	Stute	612	8
1243/04	Wallach	280	1,5
1286/04	Stute	455	10
1404/04	Stute	398	2
1500/04	Wallach / Pony	218	20
1518/04	Stute	n.a.	12
1520/04	Hengst	350	1
1572/04	Stute	623	18
1762/04	Wallach	315	22
1809/04	Stute	233	0,5
1816/04	Stute	290	4,5
1836/04	Wallach	605	14
1850/04	Stute	549	6,5

Fortsetzung von Tabelle 22

Identifikation*	Geschlecht / Rasse**	Gewicht in kg	Alter in Jahren
1863/04	Wallach	422	7
1872/04	Wallach	466	7
1924/04	Stute	623	6
1939/04	Hengst	93	Fohlen
1949/04	Stute	316	Adult
1957/04	Stute	175	0,5
1977/04	Wallach	483	18
2002/04	Wallach	542	12
2016/04	Stute	519	6
2037/04	Stute	270	1
2043/04	Stute	372	1
2224/04	Wallach	380	10
2335/04	Wallach	463	17
2362/04	Wallach	336	2
2363/04	Hengst	561	9
2366/04	Stute	646	16
2368/04	Hengst	510	1,5
2383/04	Stute	326	2
2405/04	Wallach	484	Adult
2414/04	Stute	480	3
2420/04	Hengst	340	2,5
2422/04	Hengst	412	8
2423/04	Wallach	518	8
2516/04	Stute / Pony	280	16
2517/04	Wallach / Friese	309	1,5
2538/04	Stute	621	16
2555/04	Wallach	439	11
2569/04	Stute / Pony	168	4
2589/04	Stute	598	6
2634/04	Wallach	397	6
2683/04	Stute	439	14
2734/04	Wallach	523	Adult
2746/04	Wallach / Isländer	286	8
2769/04	Stute / Pony	265	13
202/05	Wallach	520	10
637/05	Wallach	573	10
914/05	Stute	n.a.	12
986/05	Wallach	550	10
987/05	Stute	540	8
1109/05	Stute	75	5 Wochen
1110/05	Wallach	512	11

Fortsetzung von Tabelle 22:

Identifikation*	Geschlecht / Rasse**	Gewicht in kg	Alter in Jahren
Pfd I	Stute	486	8
Pfd II	Wallach	432	13
Pfd III	Stute	480	Adult
PfdIV	Wallach	606	8
Pfd V	Wallach	462	15
Pfd VI	Stute	305	17
Pfd VII	Wallach	ca. 500	9
Pfd VIII	Wallach	ca. 550	Adult
Pfd IX	Wallach	ca. 550	15
Pfd X	Wallach	ca. 500	6
Pfd XI	Stute	420	8
Pfd XII	Wallach	540	16
Pfd XIII	Stute	580	19
Pfd 14	Stute	550	6
Pfd 15	Stute	500	22
Pfd 16	Wallach	580	8
Pfd 17	Wallach	345	16
Pfd 18	Stute	248	15
Pfd 19	Wallach	750	18
Pfd 20	Wallach	490	19
Pfd 21	Wallach	510	Adult
Pfd 22	Stute	480	30
Pfd 23	Stute	500	24
Pfd 24	Stute	500	7
Pfd 25	Wallach	550	28
Pfd 26	Wallach	570	11

* Sektionsnummer des Instituts für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Pfd I bis Pfd XII, Pferde aus dem Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ohne Sektionsnummer; Pfd XIII bis Pfd 26, Pferde aus dem Schlachthof Peter Ströh in Celle

** Rasse = Warmblut, sofern nicht anders angegeben

10.2 Reagenzien, Lösungen und Protokolle für Formalinfixierung, Paraffineinbettung und Färbungen

Formaldehyd, stabilisiert mit 10% Methanol, 37% p.a. (Roth, Karlsruhe);

CaCO₃, 99% pulv. (Roth, Karlsruhe);

Paraffin, Paraplast Plus (Shandon, Frankfurt);

Perjodsäure (Roth, Karlsruhe);

Hämatoxylin (Merck, Darmstadt);

Glycogen (Invitrogen, Karlsruhe);

EDTA (Riedel de Haen, Morris Township, NJ, USA);

SDS (Roth, Karlsruhe);

Tris Pufferan™, ≥ 99,9%, p.a. (Roth, Karlsruhe);

4%iges, neutralgepuffertes Formalin nach Lillie (Böck, 1989)

Formalin (37% Formaldehyd)	100 ml
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4 g
Na ₂ HPO ₄	6,5 g
Aqua dest.	ad 1 l

10%iges, neutralgepuffertes Formalin

Formalin (37% Formaldehyd)	22 l
CaCO ₃	40 g
Aqua dest.	60 l

Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebe

10%iges, neutralgepuffertes Formalin	1 h
Leitungswasser	45 min
70 Vol.% Ethanol	45 min
80 Vol.% Ethanol	45 min
96 Vol.% Ethanol	2 x 45 min
Isopropanol	1 h
Essigsäure-n-Butylester	2 x 1 h
Paraffin, Paraplast Plus	2 x 1 h bei 60 °C

Anschließend Eingießen der Gewebeblöcke in Kunststoffkapseln

1% Perjodlösung für die PAS-Reaktion

Perjodsäure	10 g
Aqua dest.	ad 1 l

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin	1 g
Natriumjodat	0,2 g
Chemisch reines Kalialaun	50 g
Wasser (bzw. DEPC-behandeltes Wasser)	ad 1000 ml

Unter Rühren erwärmen (ca. 75°C) 4 h
Erkalten lassen und mindestens 10 h ruhen lassen

Chloralhydrat	50 g
Kristalline Zitronensäure	1g

Abschließend filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

Eosin-Lösung

Eosin Y	10 g
Wasser (bzw. DEPC-behandeltes Wasser)	ad 1000 ml

Warm lösen

Abschließend filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

Zum Färben auf 100 ml Eosin-Lösung 2 Tropfen Eisessig hinzugeben

Natriumazetat (3 M; pH 5,2)

Natriumazetat	32,81 g
DEPC-behandeltes Wasser	ad 100 ml

Autoklavieren

LB-Medium

Trypton	5 g
Hefe-Extrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Autoklavieren

10.3 Reagenzien, Lösungen und Puffer für die immunhistochemischen Arbeiten

PBS-Lösung

NaCl	40 g
NaH ₂ PO ₄	8,97 g
Mit 1 N Natronlauge auf pH 7,0 bis 7,2 einstellen	
Aqua dest.	ad 5 l

0,05% Pronase-E-Lösung

Pronase-E (Merck, Darmstadt)	0,1 g
CaCl ₂ (Merck, Darmstadt)	0,2 g

In 200 ml 37°C warmer PBS-Lösung lösen und mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen

DAB-Stock-Lösung

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB; Fluka, Buchs, Schweiz); 5 g

In 2,5 l Aqua dest. im Dunkeln 3 bis 4 h lösen

Zu je 50 ml aliquotieren und bei -20°C lagern

DAB-Gebrauchslösung

DAB-Stock-Lösung	50 ml
PBS	150 ml

Filtrieren, 2 ml verwerfen und 2 ml 3% H₂O₂ hinzugeben

10.4 Reagenzien, Lösungen, Puffer und Wasser für die molekularbiologischen Arbeiten

Aqua bidest. (Wasseraufbereitungsanlage des Institutes für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin) für das Ansetzen von Puffern und Lösungen;

Wasser für die Molekularbiologie (Roth, Karlsruhe);

10 x Thermophilic Buffer (Magnesium Free; M190; Promega, Madison, WI, USA);

100 mM dNTP Set (25 µmol each; GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA);

Taq DNA Polymerase (5 U/µl; Promega, Madison, WI, USA);

Glyzerin, wasserfrei, > 99,5% (Fluka, Buchs, Schweiz);

1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe);

Agarose (Bioline, Luckenwalde);

Ethidiumbromid (Pharmacia LKB, Freiburg);

Quiaquick Gel Extraction Kit™ (Quiagen, Hilden);

RQ 1 RNase free DNase (Promega, Madison, WI, USA);

Omniscript RT Kit™ (Quiagen, Hilden);

RNaseOUT (40 U/µl; GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA);

Brilliant Quantitative PCR Core Reagent Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA);

DEPC, Pyrokohlensäurediäthylester (Aldrich, Steinheim);

EDTA (Riedel de Haen, Morris Township, New Jersey, USA);

10.4.1 Reagenzien und Kits für die RNA-Isolierung

RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden);

β-Mercaptoethanol (Sigma, Steinheim);

TRIZOL-Reagent (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA);

DEPC-behandeltes Wasser (0,1 Vol% DEPC; Ehrenberg et al., 1974)

DEPC	2 ml
Aqua dest.	ad 2 l

Bei 37°C 2 h rühren, autoklavieren

dNTP-Stammlösung (10 mM; 2,5 mM je dNTP) für die PCR

dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 100 mM	je 10 µl
DEPC-behandeltes Wasser	ad 400 µl

Glyzerin-Farbstoffpuffer zum Beladen von Agarosegelen

Glyzerin	50 %
EDTA (pH 8,0)	1 mM
Bromphenolblau	0,1 %

10 x TBE Puffer für Gelelektrophorese

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	121 g
Borsäure	51 g
EDTA (pH 8,0)	3,7 g
Aqua bidest.	ad 600 ml

Mit konz. HCl auf pH 8,0 einstellen

Aqua bidest.	ad 1 l
--------------	--------

Für 0,5 x TBE-Puffer 1:20 mit Aqua bidest. verdünnen

10.4.2 Reagenzien und Protokolle für die Northern Blot Hybridisierung

(3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) MOPS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen);

10 x MOPS

1M MOPS Stock solution pH 7,6	50 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	5 ml
3 M Natriumacetat-Lösung	5 ml
DEPC-Wasser	190 ml

Agarosegel für die RNA-Gelelektrophorese

DEPC-behandeltes Wasser	74 ml
Agarose	1 g

In der Mikrowelle bei 800 Watt 2 min erhitzen und im Wasserbad bei 70°C inkubieren, bis die Agarose vollständig gelöst ist

10 x MOPS	10 ml
Formaldehyd (37%)	16 ml

Mischen und im Wasserbad auf 70°C erwärmen

Mit der Wasser-Agarose-Lösung gut vermischen und in die mit einem Kamm bestückte Elektrophoresekammer (Mini SUB® Cell GT; BioRad, München) gießen.

Bei Raumtemperatur erkalten lassen

RNA-Probenpuffer

Deionisiertes Formamid	100 µl
Formaldehyd	40 µl
10 x MOPS	30 µl

Glycerin-Farbstoff-Lösung für RNA-Gelelektrophorese

EDTA pH 8,0	1 mM
Bromphenolblau	0,1%
Glycerin	50%
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	1%

Bei poly-A⁺-RNA-Proben wird auf die Zugabe von Ethidiumbromid verzichtet!

20 x Natriumchlorid / Natriumcitrat-Lösung (20 x SSC)

NaCl	175,3 g
Natriumcitrat	88,2 g

In Aqua dest. lösen, den pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 7,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

10.4.3 Reagenzien und Protokolle für die Western Blot Analyse

Dithiotreitol (DTT; Sigma, Steinheim);

Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC; Roth, Karlsruhe);

Protease-Inhibitor-Mix

Phenylmethanolsulfonylfluorid PMSF	1 mM
Pepstatin	1 µg/ml
Aprotinin	1 µg/ml
Antipain	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor	100 µg/ml

Alle Komponenten des Protease-Inhibitor-Mixes wurden von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen.

Lysispuffer

Tris-HCl 1 M pH 8,0	1,25 ml (25 mM)
NaCl 5 M	0,5 ml (50 mM)
DOC (50 mg/ml)	5 ml (0,5%)
Triton-X-100	250 µl (0,5%)
Aqua dest.	ad 50 ml

Vor Gebrauch wurden zu 1 ml Lysispuffer 20 µl Protease-Inhibitor-Mix gegeben.

5 x Elektrophorese-Puffer

Tris Base	15,1 g (125 mM)
Glycin	94 g (1,25 M)

In 900 ml Aqua dest. auflösen

50 ml 10% (Masse/Volumen) SDS Stock-Solution hinzufügen

Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Für 1 x Elektrophorese-Puffer 1:5 mit Aqua dest. verdünnen

Endkonzentration: 25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% (Masse/Volumen) SDS

3 x Lämmli-Puffer

SDS	6 g (6%)
Glyzerin	30 ml (30%)
Tris-HCl, pH 6,8	15 ml (150 mM)
Bromphenolblau	20 mg (0,02%)

Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

Vor Gebrauch 150 mM DTT (Stock-Solution 1 M bei -20°C) hinzufügen

10 x Transferpuffer

Tris	30,3 g
Glycin	144 g

Mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Vor Gebrauch mit Aqua dest. 1:10 verdünnen und Methanol zusetzen

Endkonzentration: 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol; 0,1% SDS

TTBS 0,1% Tween 20, pH 7,4

Tween 20	5 ml (0,1 %)
NaCl	40 g (150 mM)
KCl	1 g (2,7 mM)
Tris Base	15 g (10 mM)

Mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen

Mit HCl pH einstellen

Blockierungspuffer

TTBS 0,1 Tween, pH 7,4	100 ml
Magermilchpulver	5 g (5%)

10.5 Organische Lösungsmittel

Chloroform, 99%, stabilisiert mit Amylen (Sigma, Steinheim);

Ethanol, $\geq 99,8\%$, p.a. (Roth, Karlsruhe);

Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol, 25:24:1 (Sigma, Steinheim);

Isopropanol, 2-Propanol, 99,7%, p.a. (Roth, Karlsruhe);

Xylol (Isomere) $> 98\%$ (Roth, Karlsruhe);

Essigsäure-n-butylester, $\geq 99\%$ (Roth, Karlsruhe);

70% Ethanol für die RNA-Isolierung:

Ethanol, $\geq 99,8\%$ 70 ml

DEPC-behandeltes Wasser ad 100 ml

75% Ethanol für die RNA-Isolierung:

Ethanol, $\geq 99,8\%$ 75 ml

DEPC-behandeltes Wasser ad 100 ml

10.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

18' Einmalkanülen (WDT, Garbsen);

Spektrophotometer (Biometra, Göttingen);

Automat zur Paraffineinbettung: Citadel 1000 (Shandon, Frankfurt);

Rotationsmikrotom: HM 325 (Microm GmbH, Walldorf);

Trockenschrank (Biometra, Göttingen);

Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg);

MX3000P und Mx4000 Multiplex QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA);

Optical Cap 8 x Strip (Stratagene, La Jolla, CA, USA);

Strip Tube 8 x 0,2 ml (Stratagene, La Jolla, CA, USA);

10.7 Ergebnisse zu den molekularbiologischen Untersuchungen (Rohdaten)

Tabelle 23: RT-qPCR Ergebnisse der Vorversuche mit *taqMan*-Sonden; \bar{x} bezeichnet den arithmetischen Mittelwert der Ct-Werte und SD die Standardabweichung

Eingesetzte Kopienzahlen	EF-1a		eCLCA1	
	\bar{x} Ct-Wert	SD Ct-Wert	\bar{x} Ct-Wert	SD Ct-Wert
10^8	18,03	0,42	15,30	0,31
10^7	22,68	0,14	17,86	0,86
10^6	25,31	0,37	22,41	0,06
10^5	28,51	0,01	26,05	0,06
10^4	31,70	0,22	29,65	0,44
10^3	--	--	32,54	0,30
10^2	--	--	36,39	0,54

Tabelle 24: RT-qPCR Ergebnisse der Vorversuche mit SYBRGreen; \bar{x} bezeichnet den arithmetischen Mittelwert der Ct-Werte und SD die Standardabweichung

Eingesetzte Kopienzahlen	EF-1a		eCLCA1	
	\bar{x} Ct-Wert	SD Ct-Wert	\bar{x} Ct-Wert	SD Ct-Wert
10^8	10,50	0,18	10,41	0,05
10^7	13,67	0,12	13,92	0,01
10^6	17,15	0,08	17,62	0,09
10^5	20,73	0,05	21,14	0,13
10^4	24,84	0,06	24,75	0,02
10^3	28,35	0,12	27,65	0,80
10^2	31,72	0,13	30,59	0,09

Tabelle 25: qPCR-Rohdaten von Gesamtgewebsproben; eCLCA1

Gewebe	eCLCA1					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Siebbein	24,44	0,53	2,15	118195,00	42680,75	36,11
Nasenscheidewand	17,73	0,75	4,24	10185833,33	6940107,82	68,13
Nasenmuschel	22,56	0,61	2,70	409750,00	174712,52	42,64
Ösophagus	34,68	0,98	2,82	176,61	100,69	57,01
Magen	27,08	1,02	3,86	24451,33	17145,10	70,12
Pankreas	31,40	0,68	2,18	1537,33	620,63	40,37
Gl. parotis	33,47	0,62	1,87	334,40	156,25	46,73
Ln. mandibularis	33,10	0,40	1,22	485,47	136,85	28,19
Gl. thyreoidea	34,12	0,65	1,91	231,18	109,60	47,41
Leber	36,02	0,94	2,61	64,79	30,06	46,39
Milz	27,71	0,70	2,53	14486,83	6985,44	48,22
Herz	34,26	0,70	2,05	198,73	76,68	38,58
Haut	34,04	0,80	2,35	239,00	98,13	41,06
Gehirn	29,50	0,71	2,41	4516,33	2227,84	49,33
Uterus	26,10	0,70	2,67	41378,33	19700,61	47,61
Ovar	29,00	0,77	2,64	6264,00	2843,00	45,39
Nierenrinde	29,94	0,83	2,78	3419,17	1384,41	40,49
Nierenpapille	28,50	0,41	1,44	8124,17	1971,52	24,27
Harnblase	34,20	0,51	1,50	230,03	76,99	33,47
Duodenum	20,49	0,47	2,28	1835000,00	514810,64	28,06
Jejunm	20,34	0,31	1,51	1980000,00	329969,70	16,67
Ileum	20,10	0,77	3,83	2515000,00	1150213,02	45,73
Zaekum	22,96	0,44	1,91	364333,33	101565,09	27,88
Kolon	18,07	0,30	1,68	8751666,67	1651331,79	18,87
Rektum	18,27	0,25	1,35	7625000,00	1044274,87	13,70
Lunge L1	41,15	0,78	1,89	13,38	11,91	89,00
Lunge L2	26,82	0,80	2,98	70233,33	19761,16	28,14
Lunge L3	36,50	0,95	2,59	118,87	41,57	34,97
Lunge L4	30,29	0,89	2,93	4591,60	1814,39	39,52
Trachea	25,74	0,95	3,70	18739,30	47328,72	252,56

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. L1 stammt aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

Tabelle 26: qPCR-Rohdaten von Gesamtgewebsproben; EF-1a

Gewebe	EF-1a					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Siebbein	25,48	0,21	0,82	1028833,33	106443,26	10,35
Nasenscheidewand	25,16	0,47	1,87	1316533,33	378885,98	28,78
Nasenmuschel	25,51	0,39	1,53	1025083,33	221043,98	21,56
Ösophagus	25,29	0,30	1,17	1170666,67	124500,07	10,63
Magen	25,75	0,42	1,64	869116,67	147690,47	16,99
Pankreas	24,95	0,39	1,58	1479500,00	290397,49	19,63
Gl. parotis	25,22	0,16	0,62	1224666,67	149572,28	12,21
Ln. mandibularis	24,82	0,35	1,40	2715333,33	719285,39	26,49
Gl. thyroidea	25,39	0,25	0,97	1866833,33	331170,30	17,74
Leber	26,09	0,31	1,20	1201866,67	258606,07	21,52
Milz	25,88	0,62	2,40	1454500,00	765974,09	52,66
Herz	26,82	0,22	0,81	435333,33	103950,37	23,88
Haut	35,78	0,42	1,17	1765,00	757,44	42,91
Gehirn	25,99	0,16	0,60	751233,33	179382,01	23,88
Uterus	26,19	0,17	0,66	647233,33	89211,54	13,78
Ovar	24,95	0,31	1,26	1467000,00	245149,75	16,71
Nierenrinde	26,04	0,37	1,42	724566,67	154085,45	21,27
Nierenpapille	28,51	0,90	3,15	295516,67	201309,05	68,12
Harnblase	25,86	0,21	0,80	803983,33	101793,27	12,66
Duodenum	23,62	0,28	1,19	5791666,67	997323,35	17,22
Jejunm	24,12	0,38	1,58	4247500,00	1149322,02	27,06
Ileum	23,20	0,33	1,41	7599166,67	1535650,14	20,21
Zäkum	22,30	0,23	1,05	13316666,67	1760541,58	13,22
Kolon	23,40	0,17	0,73	6600833,33	700515,07	10,61
Rektum	23,79	0,13	0,57	5137166,67	443686,11	8,64
Lunge L1	24,72	0,54	2,19	1778250,00	457201,18	25,71
Lunge L2	24,93	0,10	0,38	1573500,00	69322,92	4,41
Lunge L3	25,07	0,54	2,15	1441300,00	357026,55	24,77
Lunge L4	25,13	0,28	1,10	1373000,00	205039,83	14,93
Trachea	27,24	0,10	0,35	359725,00	96710,89	26,88

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. L1 stammt aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

Tabelle 27: qPCR-Rohdaten von Gesamtlungengewebeproben gesunder Pferde; eCLCA1

Pferd u. Lokalisation	eCLCA1					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
2366/04 L1	28,74	0,10	0,36	495,33	32,32	6,52
2366/04 L2	29,12	0,34	1,18	283,30	58,26	20,56
2366/04 L3	28,17	0,08	0,28	514,90	28,06	5,45
2366/04 L4	28,55	0,26	0,91	405,10	64,72	15,98
2366/04 T1	16,49	0,13	0,81	1192666,67	105954,39	8,88
2366/04 T2	18,10	0,61	3,42	321266,67	98601,43	30,69
2366/04 T3	16,85	0,10	0,60	808100,00	51582,65	6,38
1863/04 L1	27,30	0,07	0,26	1198,33	53,59	4,47
1863/04 L2	27,36	0,17	0,61	1176,67	116,76	9,92
1863/04 L3	29,53	0,31	1,03	216,83	41,76	19,26
1863/04 L4	26,67	0,06	0,23	1803,33	66,58	3,69
1863/04 T1	19,06	0,19	0,97	155000,00	17754,15	11,45
1863/04 T2	17,30	0,24	1,39	480233,33	69948,86	14,57
1863/04 T3	17,63	0,03	0,18	489266,67	11197,02	2,29
2043/04 L1	26,12	0,04	0,15	2546,67	60,28	2,37
2043/04 L2	28,01	0,17	0,59	768,57	79,97	10,40
2043/04 L3	24,25	0,02	0,06	8282,00	65,21	0,79
2043/04 L4	25,00	0,09	0,36	2781,67	171,82	6,18
2043/04 T1	20,39	0,23	1,11	93456,67	14034,77	15,02
2043/04 T2	15,18	0,06	0,41	2358666,67	93044,79	3,94
2043/04 T3	16,44	0,10	0,61	1053600,00	66111,12	6,27
1123/04 L1	35,84	0,77	2,15	4,01	1,94	48,32
1123/04 L2	32,93	0,58	1,77	26,57	9,47	35,64
1123/04 L3	26,33	0,58	2,20	1931,67	704,59	36,48
1123/04 L4	32,67	1,06	3,23	36,70	23,00	62,67
1123/04 T1	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
1123/04 T2	21,54	0,03	0,12	31366,67	551,75	1,76
1123/04 T3	16,77	0,07	0,43	852500,00	38312,92	4,49

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 und T1-T3 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea, L1 aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

Tabelle 28: qPCR-Rohdaten von Gesamtlungengewebeproben gesunder Pferde; Ef-1a

Pferd u. Lokalisation	EF-1a					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
2366/04 L1	17,67	0,18	1,02	546933,33	63033,67	11,52
2366/04 L2	18,39	0,18	1,00	343866,67	39675,73	11,54
2366/04 L3	17,48	0,07	0,40	615700,00	29564,84	4,80
2366/04 L4	18,08	0,40	2,20	426633,33	113709,03	26,65
2366/04 T1	15,22	0,28	1,84	3312000,00	570821,34	17,23
2366/04 T2	16,90	0,19	1,15	1366000,00	150840,98	11,04
2366/04 T3	16,15	0,10	0,64	1862000,00	116245,43	6,24
1863/04 L1	18,30	0,22	1,22	1416333,33	210678,27	14,87
1863/04 L2	17,89	0,12	0,69	768333,33	57366,05	7,47
1863/04 L3	17,84	0,26	1,44	493666,67	80649,88	16,34
1863/04 L4	18,17	0,13	0,74	395500,00	33186,90	8,39
1863/04 T1	16,52	0,47	2,86	1746666,67	446215,57	25,55
1863/04 T2	15,14	0,05	0,33	3861666,67	110753,48	2,87
1863/04 T3	15,76	0,20	1,26	2371000,00	282703,02	11,92
2043/04 L1	17,31	0,18	1,04	1085766,67	112353,30	10,35
2043/04 L2	18,52	0,07	0,36	1212666,67	54884,73	4,53
2043/04 L3	18,64	0,06	0,34	1116666,67	48232,08	4,32
2043/04 L4	17,91	0,14	0,78	1829000,00	171554,66	9,38
2043/04 T1	17,67	0,46	2,59	759566,67	200198,96	26,36
2043/04 T2	14,65	0,10	0,66	4691666,67	282878,65	6,03
2043/04 T3	15,45	0,17	1,08	2871333,33	299523,51	10,43
1123/04 L1	20,02	0,15	0,76	178633,33	16821,51	9,42
1123/04 L2	17,69	0,69	3,92	770833,33	293629,23	38,09
1123/04 L3	19,49	0,23	1,16	240900,00	32575,91	13,52
1123/04 L4	18,02	0,08	0,43	591166,67	27775,23	4,70
1123/04 T1	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
1123/04 T2	19,87	0,18	0,91	235033,33	24925,15	10,60
1123/04 T3	15,68	0,32	2,05	2517000,00	525315,14	20,87

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 und T1-T3 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea, L1 aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

Tabelle 29: qPCR-Rohdaten von Gesamtlungengewebeproben COB-kranker Pferde; eCLCA1

Pferd u. Lokalisation	eCLCA1					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Pfd 17 L1	22,03	0,17	0,77	22290,00	2702,57	12,12
Pfd 17 L2	21,93	0,05	0,21	23950,00	1741,24	7,27
Pfd 17 L3	23,00	0,04	0,15	11246,67	715,29	6,36
Pfd 17 L4	19,97	0,17	0,83	100006,67	10770,08	10,77
Pfd 17 T1	16,90	0,04	0,22	912966,67	21483,56	2,35
Pfd 17 T2	15,74	0,14	0,88	1304333,33	115283,71	8,84
Pfd 17 T3	16,42	0,33	2,03	1083866,67	214853,10	19,82
Pfd 20 L1	23,55	0,19	0,79	14596,67	1766,98	12,11
Pfd 20 L2	23,22	0,06	0,26	15633,33	550,76	3,52
Pfd 20 L3	20,81	0,11	0,55	70433,33	5128,68	7,28
Pfd 20 L4	21,09	0,05	0,25	33406,67	1131,61	3,39
Pfd20 T1	15,57	0,10	0,65	2177333,33	138597,74	6,37
Pfd 20 T2	14,91	0,09	0,58	2223666,67	125436,57	5,64
Pfd20 T3	16,87	0,04	0,24	796666,67	19222,21	2,41
1836/04 L1	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
1836/04 L2	23,73	0,02	0,09	11300,00	173,21	1,53
1836/04 L3	24,12	0,74	3,06	13260,00	282,84	2,13
1836/04 L4	21,24	0,01	0,03	44013,33	117,19	0,27
1836/04 T1	15,13	0,49	3,21	3012333,33	948911,13	31,50
1836/04T2	14,86	0,14	0,93	2295000,00	213438,52	9,30
1836/04 T3	15,24	0,23	1,48	2284000,00	340170,55	14,89
2506/04 L1	32,25	0,10	0,31	39,52	2,60	6,57
2506/04 L2	23,41	0,09	0,39	12850,00	771,75	6,01
2506/04 L3	22,12	0,60	2,70	31623,33	13003,98	41,12
2506/04 L4	24,12	0,28	1,18	8128,67	1442,65	17,75
2506/04 T1	16,02	0,11	0,69	1093000,00	79899,94	7,31
2506/04 T2	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
2506/04 T3	17,02	0,15	0,87	728366,67	69091,92	9,49

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 und T1-T3 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea, L1 aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*

Tabelle 30: qPCR-Rohdaten von Gesamtlungengewebeproben COB-kranker Pferde; EF-1a

Pferd u. Lokalisation	EF-1a					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Pfd 17 L1	18,78	0,01	0,06	1017666,67	10969,66	1,08
Pfd 17 L2	18,60	0,34	1,82	1164233,33	251724,38	21,62
Pfd 17 L3	19,04	0,38	1,99	872200,00	204977,36	23,50
Pfd 17 L4	17,75	0,29	1,61	1065766,67	171964,13	16,14
Pfd 17 T1	16,10	0,08	0,50	1923666,67	94521,60	4,91
Pfd 17 T2	17,02	0,11	0,67	1273333,33	86309,52	6,78
Pfd 17 T3	16,73	0,20	1,20	1314000,00	158606,43	12,07
Pfd 20 L1	18,18	0,38	2,09	400000,00	94687,64	23,67
Pfd 20 L2	16,98	0,19	1,15	857233,33	105047,15	12,25
Pfd 20 L3	16,98	0,19	1,15	857233,33	105047,15	12,25
Pfd 20 L4	17,46	0,10	0,57	623933,33	39933,99	6,40
Pfd 20 T1	15,25	0,07	0,47	3224666,67	144361,81	4,48
Pfd 20 T2	15,82	0,29	1,81	2602000,00	425608,98	16,36
Pfd20 T3	16,05	0,59	3,70	2067000,00	717052,30	34,69
1836/04 L1	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
1836/04 L2	18,06	0,31	1,74	428300,00	85456,19	19,95
1836/04 L3	18,00	0,06	0,31	441866,67	16064,35	3,64
1836/04 L4	17,45	0,04	0,25	627966,67	18491,71	2,94
1836/04 T1	14,76	0,36	2,43	4410000,00	908368,32	20,60
1836/04T2	15,25	0,11	0,70	3617333,33	227847,17	6,30
1836/04 T3	14,52	0,07	0,50	5071000,00	219246,44	4,32
2506/04 L1	17,08	0,25	1,47	1070033,33	158474,61	14,81
2506/04 L2	17,25	0,41	2,38	978333,33	243677,03	24,91
2506/04 L3	17,60	0,51	2,91	801133,33	262940,78	32,82
2506/04 L4	18,95	0,09	0,46	341400,00	18113,25	5,31
2506/04 T1	16,87	0,08	0,45	1384333,33	65378,39	4,72
2506/04 T2	Qualität des Probenmaterials für q-PCR nicht ausreichend					
2506/04 T3	16,97	0,30	1,77	1136133,33	209825,29	18,47

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen L1-L4 und T1-T3 beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. T1-T3 stammen kranial, mittig und kaudal aus der Trachea, L1 aus dem rechten *Lobus cranialis* und L2-L4 kranial, mittig und kaudal aus dem rechten *Lobus caudalis*.

Tabelle 31: qPCR-Rohdaten von LCM-Proben gesunder (Pfd 16, Pfd 26 und 2043/04) und COB-kranker (Pfd 20, Pfd 25 und Pfd XIII) Pferde; eCLCA1

Pferd u. Lokalisation	eCLCA1					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Pfd 16 HB	27,01	0,13	0,47	1040,20	181,16	17,42
Pfd 16 MB	32,80	0,30	0,92	18,02	0,50	2,78
Pfd 16 KB	31,69	0,18	0,57	38,72	3,10	8,01
Pfd 26 HB	21,45	0,12	0,57	55716,67	5610,85	10,07
Pfd 26 MB	25,81	0,07	0,27	3023,67	277,58	9,18
Pfd 26 KB	23,88	0,08	0,34	10937,33	1103,01	10,08
2043/04 HB	25,70	0,10	0,39	8685,40	257,27	2,96
2043/04 MB	29,31	0,29	0,97	529,68	55,78	10,53
2043/04 KB	28,38	0,31	1,09	2003,18	29,68	1,48
Pfd 20 HB	kein für die LCM verwendbares Bronchialepithel vorhanden					
Pfd 20 MB	24,89	0,24	0,97	6989,00	232,23	3,32
Pfd 20 KB	26,54	0,19	0,73	2249,80	138,16	6,14
Pfd 25 HB	27,33	0,27	1,00	817,06	69,22	8,47
Pfd 25 MB	24,75	0,19	0,76	4765,40	852,81	17,90
Pfd 25 KB	24,73	0,11	0,46	5798,33	448,99	7,74
Pfd XIII HB	26,82	0,15	0,56	1359,00	141,52	10,41
Pfd XIII MB	24,51	0,02	0,08	7091,40	506,41	7,14
Pfd XIII KB	24,57	0,07	0,29	6465,33	331,71	5,13

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen HB, MB und KB beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. HB = Hauptbronchus; MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel); KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel)

Tabelle 32: qPCR-Rohdaten von LCM-Proben gesunder (Pfd 16, Pfd 26 und 2043/04) und COB-kranker (Pfd 20, Pfd 25 und Pfd XIII) Pferde; EF-1a

Pferd u. Lokalisation	EF-1a					
	\bar{x} Ct	SD Ct	VK Ct	\bar{x} Kopien	SD Kopien	VK Kopien
Pfd 16 HB	26,89	0,12	0,46	3091,83	252,70	8,17
Pfd 16 MB	29,75	0,17	0,58	449,93	78,43	17,43
Pfd 16 KB	28,21	0,15	0,52	1287,40	554,29	43,05
Pfd 26 HB	23,17	0,13	0,58	37700,00	3378,76	8,96
Pfd 26 MB	27,88	0,26	0,95	1717,00	135,93	7,92
Pfd 26 KB	26,94	0,26	0,96	3189,67	231,43	7,26
2043/04 HB	24,50	0,17	0,70	15216,67	2683,59	17,64
2043/04 MB	27,52	0,20	0,71	2479,50	70,56	2,85
2043/04 KB	27,21	0,24	0,90	2999,33	150,54	5,02
Pfd 20 HB	kein für die LCM verwendbares Bronchialepithel vorhanden					
Pfd 20 MB	27,79	0,20	0,71	2459,60	1042,69	42,39
Pfd 20 KB	28,67	0,45	1,57	1239,62	186,61	15,05
Pfd 25 HB	30,56	0,16	0,51	245,92	12,91	5,25
Pfd 25 MB	27,16	0,28	1,03	2565,80	1091,26	42,53
Pfd 25 KB	26,05	0,19	0,72	5417,20	2252,33	41,58
Pfd XIII HB	29,45	0,21	0,73	547,42	42,93	7,84
Pfd XIII MB	28,82	0,25	0,88	808,67	124,73	15,42
Pfd XIII KB	28,57	0,15	0,51	990,35	68,52	6,92

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die Bezeichnungen HB, MB und KB beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. HB = Hauptbronchus; MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel); KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel)

Tabelle 33: Anzahl an Epithel- und Becherzellen in den LCM-Proben (Tabelle 31 und 32) sowie die hieraus ermittelten Kopienzahlen pro Becherzelle

Pferd u. Lokalisation	Anzahl an Epithelzellen	Anzahl an Becherzellen	Kopien EF-1a	Kopien eCLCA1	Kopien eCLCA1 / Kopien EF-1a
			pro Becherzelle		
Pfd 16 HB	14387	811	0,21	1,23	5,72
Pfd 16 MB	10912	452	0,04	0,04	0,97
Pfd 16 KB	9170	184	0,14	0,21	1,50
Pfd 26 HB	24996	546	1,51	102,05	67,66
Pfd 26 MB	11054	478	0,16	6,33	40,72
Pfd 26 KB	15378	744	0,21	14,70	70,87
2043/04 HB	21793	435	0,70	8,13	11,65
2043/04 MB	8586	230	0,29	1,62	5,61
2043/04 KB	10516	266	0,29	2,52	8,82
Pfd 20 HB	kein für die LCM verwendbares Bronchialepithel vorhanden				
Pfd 20 MB	17208	1468	0,14	4,18	29,25
Pfd 20 KB	11416	851	0,11	2,64	24,35
Pfd 25 HB	11636	1460	0,02	0,56	26,48
Pfd 25 MB	16100	1780	0,16	2,87	18,02
Pfd 25 KB	9779	561	0,06	1,92	34,33
Pfd XIII HB	16020	676	0,34	6,48	19,16
Pfd XIII MB	7736	1164	0,10	6,09	58,28
Pfd XIII KB	4964	697	0,20	7,07	35,46

Die Bezeichnungen HB, MB und KB beziehen sich auf das in Abbildung 2 dargestellte Probenentnahmeschema. HB = Hauptbronchus; MB = mittlerer Bronchus (Übergang vom 2. zum 3. Drittel); KB = kleiner Bronchus (Übergang vom 3. zum 4. Viertel)

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertationsschrift mit dem Titel:

„Klonierung und Charakterisierung des ersten equinen CLCA-Homologen, eCLCA1, und erste Untersuchungen zu seiner Bedeutung bei chronisch-obstruktiver Bronchiolitis des Pferdes“

selbständig verfasst habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Friederike Range

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine uneingeschränkte und kompetente Betreuung.

Bei Herrn Peter Ströh möchte ich mich für die unkomplizierte Unterstützung und humorvolle Atmosphäre bei der Probennahme bedanken.

Ina Leverkus danke ich für unermüdliches Mutmachen, konstruktive Kritik und fürs Korrekturlesen.

Dorthe von Smolinski danke ich für die Einführung in die Laborgeheimnisse, die ehrenamtliche qPCR-Hotline und viele, lustige Telefonate.

Bei Julia Schirrmeier, Jana Enders und Monika Schaerig bedanke ich mich für kompetente technische Unterstützung.

Bei meinen Mitdoktoranten Lars Mundhenk, Steffi Deppenmeier, Hannah Holle, Silke Mateika und Jo Braun bedanke ich mich für ganz viel Spaß bei der Arbeit, hilfreiche Ideen und ein tolles Miteinander. Mein ganz besonderer Dank gilt Meli Bothe für viele kleine und große „Dienste“, Motivation und dafür, dass sogar die Nächte im Labor lustig sein können.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und für die Möglichkeit, den Mx4000™ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baumgärtner Ph.D. zu nutzen.

Bei meinen Kollegen des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin bedanke ich mich für die nette Atmosphäre und ihr Verständnis.

Verena Marwede danke ich für Anrufe „im richtigen Moment“ und fürs Korrekturlesen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung und dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Und ganz besonders danke ich meinem Mann Alex für seine Geduld, sein Verständnis und dafür dass er mir zu jeder Zeit den Rücken gestärkt hat. Danke, dass Du für mich da bist!