

Inhalt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INHALTSVERZEICHNIS

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