

Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
Institut für Tierpathologie

**DIVERSITÄT DER CLCA-GENFAMILIE ZWISCHEN AUSGEWÄHLTEN
SÄUGERSPEZIES UND AUSWIRKUNGEN
AUF DIE
WAHL EINES TIERMODELLS**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Eingereicht von
Dr. med. vet. Lars Mundhenk

Berlin 2020

Gedruckt mit der Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): animal models, mice, pigs, cats, man, respiratory system, respiratory diseases, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cystic fibrosis, multigene families, gene expression, surface proteins, cytokines

Tag des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 17.11.2020

Meiner Familie

Inhalt

Abkürzungen	8
1. Einleitung	10
Die <i>CLCA</i> -Genfamilie und ihre mögliche Bedeutung bei Atemwegserkrankungen.....	12
Atemwegserkrankungen mit Dyskrie.....	12
Asthma.....	12
Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung	13
Mukoviszidose.....	13
Tiermodelle für Atemwegserkrankungen mit Dyskrie.....	14
Die <i>CLCA</i> -Familie	16
2. Offene Fragen und Hypothesen.....	20
3. Publikationsliste dieser kumulativen Habilitationsschrift	22
4. Zusammenfassung der Ergebnisse	26
Das <i>CLCA</i> -Genom, die Proteinstruktur und -prozessierung der <i>CLCA</i> -Mitglieder im Speziesvergleich (Publikationen P1-P7)	26
Expressionsmuster der <i>CLCA</i> -Mitglieder in den Atemwegen im Speziesvergleich (Publikationen P1-P8, P12).....	29
Untersuchungen postulierter Funktionen von <i>CLCA1</i> im Mausmodell (Publikationen P7-P13)	32
5. Übergreifende Diskussion	36
<i>CLCA1</i> ist zwischen den untersuchten Spezies am stärksten konserviert.	36
<i>CLCA2</i> ist zwar auf genomischer Ebene und in seiner Proteinstruktur zwischen den Tierarten ähnlich, zeigt aber abweichende Expressionsprofile im Atmungstrakt.....	37
<i>CLCA3</i> und <i>CLCA4</i> weisen eine hohe evolutionäre Dynamik mit speziesspezifischen abweichenden Expressionsmustern im Atmungstrakt auf.....	38
Die Diversität der <i>CLCA</i> -Familie im Respirationstrakt hat wahrscheinlich Konsequenzen für die Wahl eines geeigneten Tiermodells für menschliche Erkrankungen.	39
Die Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch <i>CLCA1</i> kann im Gegensatz zu anderen postulierten Funktionen im Mausmodell untersucht werden.	40
Die evolutionäre Dynamik in der <i>CLCA</i> -Familie erlaubt Spekulationen über ihre Funktion.....	41
6. Ausblick.....	43
7. Zusammenfassung.....	44
8. Summary	46
9. Tabellenverzeichnis.....	48
10. Literatur	49
11. Danksagung.....	60

Abkürzungen

BAC	künstliches Bakterienchromosom (engl. <i>bacterial artificial chromosome</i>)
BAL	B roncho a lveoläre L avage
BALT	Bronchienassoziertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>)
BPIF	engl. <i>bactericidal/permeability-increasing fold-containing</i>
CaCC	Kalzium-aktivierbarer Chloridkanal (engl. <i>calcium-activated chloride channel</i>)
CF	Zystische Fibrose (engl. <i>cystic fibrosis</i>)
CFTR	engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLCA	Chloridkanal Regulator, Kalzium-aktivierbar (engl. <i>chloride channel regulator, calcium-activated</i>)
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
DSS	Dextran Natriumsulfat (engl. <i>dextran sulfate sodium</i>)
ENaC	Epithelialer Natriumkanal (engl. <i>epithelial Na channel</i>)
h	h uman (zum Menschen gehörend)
HEXXH	Zink bindende Motivsequenz mit der Aminosäuresequenz: Histidin (H), Glutaminsäure (E), zwei beliebige Aminosäuren (X), Histidin (H)
IAD	engl. <i>inflammatory airway disease</i>
IL	I nterleukin
kDa	K ilodalton
KO	k nock-out
Lu-ECAM-1	engl. <i>lung-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
m	m urin (zur Maus gehörend)
MGNC	engl. <i>Mouse Gene Nomenclature Committee</i>

n-CLCA	amino-terminale CLCA Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROA	engl. <i>recurrent airway obstruction</i>
SH3GLB1	engl. <i>SH3-domain GRB2-like endophilin B1</i>
SMG	Submukosale Drüse (engl. <i>submucosal glands</i>)
ODF2L	engl. <i>outer dense fiber of sperm tails 2-like</i>
Th2	T-Helferzelle vom Subtyp 2
vWA	von Willebrand Faktor A
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Tiermodelle sind ein wertvolles Element der biomedizinischen Forschung. Sie helfen, die Funktion einzelner Gene sowie teils auch komplexe Krankheitsprozesse zu verstehen. Sie werden genutzt, um Wirkungen und Nebenwirkungen von Pharmaka zu analysieren, um Toxizität oder Infektiösität hervorzusagen oder abzuschätzen und neuartige Therapien zu testen. Üblicherweise werden dafür Nagetiere, insbesondere Mäuse, genutzt: aufgrund ihrer Größe sind sie leicht händelbar und in für das Studiendesign ausreichenden Zahlen zu halten, sie weisen eine kurze Generationszeit auf, haben viele Nachkommen, sind leicht zu transportieren und kostengünstig. Inzuchtstämme erlauben eine genetisch identische, und damit standardisierte Population. Weiterhin sind die Versuchs- und Haltungsbedingungen kontrollierbar und können entsprechend der Fragestellung gezielt manipuliert werden. Das Genom der Maus ist weitestgehend entschlüsselt und zahlreiche etablierte gentechnische Methoden erlauben die gezielte Modifikation ihrer Gene und lassen die Generierung neuer, u.a. humanisierter Tiermodelle zu, die an eine spezifische Fragestellung angepasst sind. Ein großer Teil der Gene ist bei Mensch und Maus vergleichbar, da 85 Prozent der Protein-codierenden Regionen bei beiden Spezies identisch sind (Makalowski *et al.*, 1996). Neben den Nagetieren werden auch andere Tierarten, abhängig von der Fragestellung, als Modelle für den Menschen genutzt.

Jedoch gibt es zahlreiche Beispiele dafür, dass Mäuse und andere Spezies den Menschen nicht immer in allen Aspekten identisch modellieren können (Uhl and Warner, 2015). Aufgrund einer speziesspezifischen Biochemie und Physiologie kommt es beispielsweise zu Unterschieden in der Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion von Substanzen (Martinez, 2011; Shanks *et al.*, 2009). Das scheint ein Grund dafür zu sein, dass im Nagermodell nur in 43 Prozent der Fälle die Toxizität von Stoffen für den Menschen korrekt vorhergesagt werden konnte (Olson *et al.*, 2000). Auch sind zahlreiche immunologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch bekannt, wie beispielsweise das im Gegensatz zur Maus weitestgehend nicht ausgeprägte bronchienassoziierte lymphatische Gewebe (BALT) bei gesunden Menschen, das Fehlen von Defensinen in Leukozyten der Maus oder die unterschiedliche Anzahl von Defensinen in den Paneth-Zellen beider Spezies (Mestas and Hughes, 2004). Auch spiegelte sich die Expressionsantwort von Genen auf entzündliche Erkrankungen des Menschen nicht in Mausmodellen wider (Seok *et al.*, 2013). Weiterhin ruft ein identischer Gendefekt nicht immer in allen Spezies einen vergleichbaren Phänotyp hervor. Mäuse, die den gleichen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cftr)*-Gendefekt wie Menschen tragen, entwickeln nicht den für die Zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) charakteristischen Lungenphänotyp (Semaniakou

et al., 2018). Dahingehend genetisch veränderte Schweine hingegen entwickeln die typischen Lungenveränderungen. Ein weiteres Beispiel ist die Duchenne-Muskeldystrophie. Mutationen im Muskelstrukturprotein kodierenden Dystrophin Gen führen beim Menschen zur Atrophie der Skelettmuskulatur (Bonilla *et al.*, 1988). Auch Hunde und genetisch veränderte Schweine zeigen bei diesem genetischen Defekt den gleichen Phänotyp (Klymiuk *et al.*, 2013; McGreevy *et al.*, 2015). Katzen mit diesem Gendefekt entwickeln jedoch eine Muskelhypertrophie (Gaschen *et al.*, 1992) und Mausmodelle wiederum zeigen nur eine milde Klinik (McGreevy *et al.*, 2015).

Die zum Teil nicht ausreichende Modellierbarkeit des Menschen in Tiermodellen und die damit einhergehende mangelnde Vorhersagbarkeit für bzw. die Übertragbarkeit auf den Menschen wird von Wissenschaftler*innen, Behörden und auch von der Bevölkerung mit Sorge betrachtet (Horrobin, 2003; Shanks *et al.*, 2009; Uhl and Warner, 2015; Wall and Shani, 2008). Der Nutzen von Tieren als Model für den Menschen lässt sich anzweifeln und die generelle, unkritische Akzeptanz von Tiermodellen lässt nach. Speziesspezifische Unterschiede auf genetischer, molekular-funktioneller und pathophysiologisch-klinischer Ebene und deren mögliche Auswirkungen auf die Ausprägung eines Phänotyps müssen bekannt sein, um einschätzen zu können, ob ein Tiermodell für eine bestimmte Fragestellung geeignet ist.

Die Evolution hat die jeweiligen Arten über Millionen Jahre geprägt und selbstverständlich Unterschiede hervorgebracht, die einen Einfluss auf den Modellcharakter der jeweiligen Spezies für den Menschen haben. Die postgenomische Ära mit der wachsenden Entschlüsselung des Genoms in den zahlreichen Spezies hilft, die genetischen Grundlagen in den Spezies miteinander zu vergleichen und besser zu verstehen, um ein geeignetes Modell für die jeweilige Fragestellung zu finden oder vorhandene, alternativlose Modelle präziser interpretieren zu können.

In dieser Arbeit wurde die *CLCA*-Genfamilie (engl. *chloride channel regulators, calcium-activated*), die eine besondere Signifikanz bei Atemwegsentzündungen zu besitzen scheint, in ausgewählten Modell-Spezies untersucht, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zum Menschen zu identifizieren. Dies soll dabei helfen, für spätere spezifische Fragestellungen das geeignete Modell zu finden oder verfügbare Modelle und ihre Unterschiede zum Menschen besser zu verstehen.

Die *CLCA*-Genfamilie und ihre mögliche Bedeutung bei Atemwegserkrankungen

Mitglieder der *CLCA*-Genfamilie werden als Modulatoren, Biomarker und sogar als therapeutisches Ziel von bedeutsamen humanen respiratorischen Erkrankungen wie Asthma, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) sowie Mukoviszidose (synonym: CF) diskutiert (Patel *et al.*, 2009). Diese komplexen Erkrankungen sind unter anderem durch eine Überproduktion von Mukus mit Verlegung der Atemwege gekennzeichnet, was ein bedeutsamer Pathomechanismus und eine der häufigsten Todesursachen darstellt (Zhou-Suckow *et al.*, 2017). Von den zahlreichen Mitgliedern der *CLCA*-Familie wird insbesondere *CLCA1*, welches von Muzinproduzierenden Zellen des Respirationstrakts sezerniert wird, stark in den Atemwegen von Patienten, die an den Lungenerkrankungen wie Asthma oder COPD leiden, exprimiert (Gibson *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 1998a; Hauber *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2001).

Atemwegserkrankungen mit Dyskrinie

Respiratorische Erkrankungen wie Asthma oder COPD zählen zu den Atemwegsentzündungen mit einer der höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsraten weltweit. Sie verursachen neben dem individuellen Leid und dem massiven Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten hohe medizinische und sozioökonomische Kosten aufgrund der hohen krankheitsbedingten Fehlzeiten in der Schule oder bei der Arbeit sowie der reduzierten Produktivität von erkrankten Mitarbeitenden (https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/lungenerkrankungen/lungenerkrankungen_node.html; Juli 2019). Neben der Entzündungsreaktion, die bei beiden Erkrankungen auftritt, ist die Becherzellhyper- und metaplasie mit Mukusüberproduktion und Verlegungen der Atemwege mit Schleim ein gemeinsamer Pathomechanismus. Auch die Mukoviszidose ist durch eine Entzündung der Atemwege mit Dyskrinie gekennzeichnet, was für den Großteil der Mortalitäten bei dieser Krankheit verantwortlich ist.

Asthma

Das Asthma bronchiale (Asthma) ist eine chronische Erkrankung der unteren Atemwege, welche durch Entzündung, Dyskrinie, bronchiale Hyperreaktivität und Obstruktion der Atemwege gekennzeichnet ist (Holgate, 2008). Circa 235 Millionen Menschen leiden weltweit an dieser Lungenerkrankung mit anfallsartig auftretender Atemnot (<https://www.who.int/features/factfiles/asthma/en/>; Juli 2019). Es zeichnet sich eine steigende Prävalenz ab, so dass man davon

ausgeht, dass 2025 weitere 100 Millionen Menschen betroffen sein werden. Etwa 338.000 Menschen starben weltweit 2015 an diesen Lungenveränderungen (<https://www.who.int/features/factfiles/asthma/en/>; Juli 2019), welche eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung mit einem heterogenen Krankheitsbild darstellt. Die Ursache scheint ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren wie Luftverschmutzung, Allergenen, mit Wirtsfaktoren wie Infektionen, Ernährung, Übergewichtigkeit und mit genetischen Faktoren wie das Vorhandensein und die Ausprägung von Asthmaempfindlichen Genen und Loci zu sein (Dharmage *et al.*, 2019). In der Regel beginnt die Erkrankung im Kindesalter, aber sie kann auch während des gesamten Lebens auftreten (Dharmage *et al.*, 2019). Allergie und Atopie sind häufig bei Patient*innen, die an Asthma leiden, vorhanden.

Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) soll für circa 3 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich sein und stellt die viert häufigste Todesursache weltweit dar ([https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)); Juli 2019). Dieser Volkskrankheit kommt eine zunehmende Bedeutung zu. Wissenschaftler*innen prognostizieren, dass COPD 2030 die infektiöse Lungenentzündung weltweit als dritthäufigste Todesursache ablöst (Diaz-Guzman and Mannino, 2014). Ähnlich dem Asthma ist die Erkrankung durch eine chronische Bronchitis mit Mukusüberproduktion sowie Emphysemen gekennzeichnet. Sie wird im Gegensatz zum Asthma meist bei älteren Patient*innen über 50 Jahre diagnostiziert und die Atemnot tritt bei Belastung auf. Hauptursache der COPD, die einen progredienten Verlauf mit persistierender Obstruktion zeigt, ist das Rauchen, aber auch genetische Faktoren spielen bei der Pathogenese eine Rolle (Diaz-Guzman and Mannino, 2014).

Mukoviszidose

Im Gegensatz zu den zuerst beschriebenen Lungenerkrankungen beruht die Mukoviszidose auf einem von vielen möglichen genetischen Defekten in einem einzelnen Gen, dem *CFTR*-Gen, welcher zu einem fehlenden oder defekten Chloridkanal führt (Riordan *et al.*, 1989). Diese monogene Erbkrankheit ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte tödlich verlaufende Erkrankung in der hellhäutigen Bevölkerung und trifft etwa 70.000 Menschen weltweit. Über 2.000 Mutationen sind beim Menschen schon beschrieben (Gentzsch and Mall, 2018). 1938 lag die Lebenserwartung von Erkrankten bei durchschnittlich sechs Monaten (Riordan *et al.*, 1989), während heutzutage die mittlere Überlebenszeit bei etwa 40 bis 53 Jahren liegt. Es handelt sich um eine Multiorganerkrankung, die den Respirations-, den Intestinaltrakt, das Pankreas, die

Leber, die Haut sowie den männlichen Geschlechtstrakt betreffen (Aitken, 1995). Durch die gestörte Chloridsekretion kommt es zu einer Akkumulation eines viskösen Mukus und einer anschließenden Besiedlung der Lunge mit Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, welche eine Pneumonie zur Folge hat (Tummler and Kiewitz, 1999). Der progressive Lungenphänotyp ist für über 95 Prozent der Todesfälle verantwortlich. Weiterhin können Patient*innen an einer Pankreasinsuffizienz, intestinaler Obstruktion und Malabsorption und Gallengangszirrhose leiden (Aitken, 1995). Bei männlichen Patienten kann als angeborene Anomalie beidseits das Vas deferens fehlen.

Tiermodelle für Atemwegserkrankungen mit Dyskrie

Für Asthma und COPD sowie in der CF-Forschung wird die Maus überwiegend als Modelltier eingesetzt (Aun *et al.*, 2017; Ghorani *et al.*, 2017; Scholte *et al.*, 2004). Aber auch andere Spezies werden als vielversprechende Modelle diskutiert und genutzt. Allgemein wird zwischen spontanen Modellen, bei denen die Erkrankung natürlich auftritt, sowie induzierten Modellen und genetisch generierten Modellen unterschieden.

Mäuse entwickeln sowohl unter Laborbedingungen als auch in der Natur oder als Haustier spontan kein Asthma (Rosenberg and Druey, 2018). Häufig werden induzierte Modelle in der biomedizinischen Forschung eingesetzt, sogenannte *allergen challenged models* (Rosenberg and Druey, 2018). Hierbei werden Mäuse mit gängigen Allergenen wie Ovalbumin, Bestandteilen von Pilzen oder Hausstaubmilben sensibilisiert, mit nachfolgender intranasaler Allergenchallenge. Aber auch Interleukin (IL)-13 wird in ähnlicher Weise dafür genutzt (Wills-Karp *et al.*, 1998). Als Folge entwickelt sich eine starke T-Helferzell- vom Subtyp 2 (Th2)-Antwort in den Atemwegen mit Hyperreaktivität, einer pulmonären Infiltration mit eosinophilen Granulozyten sowie einer verstärkten Zytokinexpression von IL-4, -5, und -13 (Rosenberg and Druey, 2018). Weiterhin zeigen die Mäuse eine Becherzellhyperplasie und Mukusüberproduktion. Auch genetisch veränderte Mäuse, die in Folge einer Überproduktion von bestimmten Zytokinen wie IL-5, -13 oder Eotaxin einen Asthmaphänotyp entwickeln, bzw. die aufgrund einer Deletion der entsprechenden Zytokine oder deren Rezeptoren nicht auf eine Provokation mit Allergenen ansprechen, werden als Modelle für Asthma genutzt (Rosenberg and Druey, 2018).

Als weitere Modelle für das Asthma des Menschen werden neben der Maus auch Haustiere diskutiert (Williams and Roman, 2016). Bei der Katze tritt spontan eine Atemwegserkrankung auf, die in ihrem pathologischen Phänotyp und ihrer Pathogenese ähnlich dem Asthma beim Menschen ist (Williams and Roman, 2016). Das feline Asthma ist wie beim Menschen mit einer

Hyperreaktivität der Atemwege gekennzeichnet (Reinero, 2011). Es zeigt ebenso eine eosinophile Atemwegsentzündung, eine Hyperplasie des respiratorischen Epithels der Bronchien und Bronchiolen, eine Hypertrophie der glatten Muskulatur sowie eine Mukusakkumulation (Shibly *et al.*, 2014; Williams and Roman, 2016). Der Th2-dominierte Phänotyp des felines Asthmas kann auch experimentell durch die wiederholte Gabe von Allergenen des Hundszahngras oder der Hausstaubmilbe induziert werden (Norris Reinero *et al.*, 2004). Die Ähnlichkeit zum Asthma des Menschen und die Verfügbarkeit eines experimentell induzierbaren Modells neben der natürlich vorkommenden Erkrankung machen die Katze zu einem attraktiven Tiermodell für das Verständnis der humanen Erkrankung (Williams and Roman, 2016).

Die *equine inflammatory airway disease* (IAD) und die *recurrent airway obstruction* (RAO) des Pferdes sind chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen, die in einigen Aspekten dem menschlichen Asthma ähneln, und ebenfalls als Modelle für die milde bzw. schwere Form des Asthmas diskutiert werden (Bond *et al.*, 2018).

Experimentell induzierte Tiermodelle werden auch für die Erforschung von COPD eingesetzt. Hierfür werden hauptsächlich Maus, Meerschweinchen und Ratte genutzt (Ghorani *et al.*, 2017). Der COPD Phänotyp wird durch Induktion mit Zigarettenrauch, intratrachealer Gabe von Lipopolysacchariden oder intranasaler Applikation von Elastase ausgelöst.

Als Modell für die monogene Erbkrankheit Mukoviszidose wird unter anderem mit gentechnisch veränderten Tiermodellen gearbeitet, bei denen unterschiedliche Mutationen des humanen *CFTR*-Gens gespiegelt wurden (Semaniakou *et al.*, 2018). Am häufigsten mit über 14 verschiedenen Modellen wird die Spezies Maus genutzt. Die jeweiligen CF-Mausmodelle zeigen zum Teil eine unterschiedliche Teilexpression von *CFTR* mit verschiedenen Überlebensraten (Semaniakou *et al.*, 2018). Jedoch zeigt keines der Modelle mit manipuliertem *CFTR*-Gen einen dem Menschen vergleichbaren entzündlichen Lungenphänotyp (Scholte *et al.*, 2004). Als mögliche Erklärung wird unter anderem das Vorhandensein einer alternativen Chloridleitfähigkeit, die Kalzium-aktivierbar ist, in den Atemwegen der Maus angenommen (Clarke *et al.*, 1994). Eine Überexpression der β -Untereinheit eines epithelialen Natriumkanals (ENaC), welcher bei der Pathogenese von CF ebenfalls eine Rolle spielt, führt zwar wie bei den humanen CF-Patient*innen zu einer Mukusakkumulation in den Atemwegen der Maus (Mall *et al.*, 2004), aber dieser Phänotyp wird nicht durch die eigentliche Ätiologie ausgelöst. Das Markenzeichen aller CF-Mausmodelle ist ein Darmphänotyp vergleichbar dem des Menschen mit Becherzellhyperplasie, Mukusakkumulation und Kryptdilatation, welcher zu schweren intestinalen Obstruktionen führt (Semaniakou *et al.*, 2018). Im Gegensatz zum Menschen zeigen CF-Mausmodelle

wahrscheinlich aufgrund einer deutlich geringeren Expression des CFTR-Proteins im murinen Pankreas nur eine milde Pankreopathologie (Gray *et al.*, 1995).

In der Mukoviszidoseforschung ist das Schwein in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus gerückt. Die Größe, die Anatomie, die Physiologie und die Biochemie sind denen des Menschen sehr ähnlich, was insbesondere für den Atmungsstrakt zutrifft (Rogers *et al.*, 2008a). Die Sequenz der Aminosäuren des porcinen CFTR-Proteins weist eine 93-prozentige Übereinstimmung mit der des Menschen auf (Semaniakou *et al.*, 2018). Weiterhin ist das Schweinegenom nahezu vollständig entschlüsselt und effiziente gentechnische Methoden wurden entwickelt, um Krankheitsmodelle zu generieren (Aigner *et al.*, 2010). Die ersten gentechnisch veränderten CF-Schweinemodelle, welche im Gegensatz zur Maus auch den respiratorischen Phänotyp von humaner CF widerspiegeln, sind in der Europäischen Union und den Vereinigten Staaten von Amerika verfügbar (Klymiuk *et al.*, 2012; Meyerholz *et al.*, 2010a; Meyerholz *et al.*, 2010b; Ostedgaard *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2008b; Stoltz *et al.*, 2010). Neugeborene CF-Schweine zeigen eine intestinale Obstruktion mit einer 100-prozentigen Prävalenz, was auch ihre Haupttodesursache darstellt. Weiterhin entwickeln die Tiere ähnlich den CF-Erkrankten eine Pankreas- und Leberpathologie. Auch weisen männliche CF-Tiere Malformationen des Vas deferens auf. Gestaltsänderungen der luftführenden Wege finden sich bei neugeborenen CF-Ferkeln, die auch beim Menschen beschrieben sind (Klymiuk *et al.*, 2012; Meyerholz *et al.*, 2010a). Eine chirurgische Therapie des Mekonium-Ileus kann die Lebenszeit der CF-Schweine verlängern. Dann entwickeln die älter werdenden Tiere eine ähnliche Lungenpathologie wie CF-Patient*innen mit Mukusakkumulation und Lungenentzündung (Stoltz *et al.*, 2010). Weiterhin wurden Frettchenmodelle generiert, die einen Lungen-, Darm- und Pankreasphänotyp vergleichbar zum Menschen zeigen (Semaniakou *et al.*, 2018). Ein gentechnisch verändertes Rattenmodell zeigte einen intestinalen Phänotyp und angeborene tracheale Malformationen sowie pathophysiologische Veränderungen ähnlich dem Menschen (Tuggle *et al.*, 2014). Die Tiere entwickeln aber keine progressiven Lungenveränderungen.

Die CLCA-Familie

Die ersten Mitglieder der *CLCA*-Genfamilie wurden beim Rind vor über 20 Jahren entdeckt (Cunningham *et al.*, 1995; Elble *et al.*, 1997). Seitdem sind zahlreiche Orthologe und weitere Homologe in anderen Spezies wie dem Menschen und der Maus beschrieben worden (Patel *et al.*, 2009). Zwei postulierte biomedizinische Funktionen prägten initial den Forschungsdrang um diese Familie: zum einen die Funktion der Genprodukte als Adhäsionsmoleküle bei der

Tumormetastasierung (Elble *et al.*, 1997) und zum anderen die Funktion als Kalzium-aktivierbarer Chloridkanal (CaCC) in unterschiedlichen Epithelien (Cunningham *et al.*, 1995). Da die ersten untersuchten *CLCA*-Proteine *in vitro* eine Kalzium-aktivierbare Chlordleitfähigkeit auslösten, wurden sie zunächst als potentielle molekulare Kandidaten für die zum CFTR bekannte alternative Chlordleitfähigkeit gesehen, welche ein großes therapeutisches Potential bei CF besaß (Gruber *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass sich die Mitglieder aufgrund ihrer Proteinstruktur in komplett sezernierte Proteine und in Proteine mit einer einzigen carboxy-terminalen Transmembrandomäne einteilen lassen (Elble *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2005; Mundhenk *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2009). Beiden Strukturklassen ist gemeinsam, dass das Vorläuferprotein in eine größere, abhängig vom Homolog und Glykosylierungsstatus circa 80 bis 110 Kilodalton (kDa) große amino-terminale und einer kleinere, circa 35 kDa große carboxy-terminale Einheit gespalten wird. Diese Strukturen lassen eine Funktion als Kanal *per se* nicht zu, und führte zum derzeitigen Namen: *chloride channel regulator, calcium activated*.

Zahlreiche Studien zeigten, dass einige Mitglieder eine Rolle bei respiratorischen Erkrankungen mit Dyskrinie spielen. So konnte eine Überexpression vom humanen *CLCA1* in den Atemwegen von Patient*innen mit Asthma und COPD nachgewiesen werden (Hauber *et al.*, 2005; Hauber *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2002; Toda *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2007b). Auch in der Flüssigkeit von bronchoalveolären Lavagen (BAL) von an Asthma erkrankten Menschen wurde das Protein im Vergleich zu gesunden Menschen in größeren Mengen nachgewiesen (Gibson *et al.*, 2005). Eine vermehrte Expression von *CLCA1* konnte auch im Respirationstrakt von CF-Patient*innen gefunden werden (Hauber *et al.*, 2003). Lungenproben von COPD-Patient*innen wiesen auch erhöhte Expressionswerte von zwei weiteren Homologen Vertretern des Menschen, nämlich *CLCA2* und -4, auf (Patel *et al.*, 2009).

Auch genetische Analysen zeigten eine Verbindung von *CLCA* Polymorphismen mit der Ausprägung entzündlicher Atemwegserkrankungen (Patel *et al.*, 2009). Genetische Veränderungen in einer Region des humanen Chromosom 1 mit dem Genlocus der *CLCA*-Genfamilie zeigten einen Zusammenhang mit der Lungenfunktion von COPD-Patientenkohorten (Palmer *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2002). Haplotyp-Analysen von Einzelnukleotid Polymorphismen wiesen eine Verbindung des humanen *CLCA1* mit Asthma und COPD auf (Hegab *et al.*, 2004; Kamada *et al.*, 2004). Auch wurden genetische Variationen im *CLCA*-Genlocus und im *CLCA4*-Gen, die mit dem intestinalen Schweregrad bei CF-Patient*innen assoziiert waren, entdeckt (Kolbe *et al.*, 2013; Ritzka *et al.*, 2004). Somit werden Polymorphismen im *CLCA*-Genlocus, insbesondere des *CLCA1*-Gens, als ein Faktor für die Empfänglichkeit von Erkrankungen mit Dyskrinie diskutiert.

Auch in Asthma- und CF-Mausmodellen wurde *CLCA1*, welches identisch zum Menschen von mizinproduzierenden Zellen exprimiert wird (Leverkoehne and Gruber, 2002), vermehrt in der BAL-Flüssigkeit oder im Gewebe nachgewiesen (Gibson *et al.*, 2005; Leverkoehne *et al.*, 2006). Sowohl ein knockdown der *Clca1* (alias *gob-5*) -Genexpression als auch der Einsatz von Anti-*CLCA1* Antikörpern verbesserte den Lungenphänotyp im Hinblick auf eine reduzierte Atemwegsentzündung und verminderte Becherzellmetaplasie in Asthma-Mausmodellen (Nakanishi *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2013). Obwohl es in der *CLCA*-Familie, insbesondere bei *CLCA1*, auffällige Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Maus gibt, existieren auch zahlreiche Unterschiede zwischen den Spezies, mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen in experimentellen Studien.

Die *CLCA*-Familie besteht aus einer speziesspezifisch unterschiedlichen Anzahl an Mitgliedern, welches ein Hindernis bei der Aufklärung ihrer Bedeutung bei den respiratorischen Erkrankungen und ihrer Funktion darzustellen scheint. So besitzt der Mensch vier *CLCA*-Gene wohingegen in der Maus acht vorliegen (Patel *et al.*, 2009). Das humane *CLCA3*-Gen stellt vermutlich ein Pseudogen ohne Funktion dar (Gruber and Pauli, 1999), wohingegen seine Orthologen bei der Maus funktionell sind und im Respirationstrakt exprimiert werden (Elble *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 1998b; Leverkoehne *et al.*, 2002). Weiterhin bestehen Unterschiede in der Expression von *CLCA4* zwischen Mensch und Maus (Bothe *et al.*, 2008). Während *CLCA4* im Respirationstrakt des Menschen nachgewiesen wurde (Agnel *et al.*, 1999; Mall *et al.*, 2003), sind die Mausorthologe ausschließlich im Darmtrakt exprimiert (Al-Jumaily *et al.*, 2007; Bothe *et al.*, 2008). Eine postulierte Funktion der Regulation der Mukuszellmetaplasie durch *CLCA1*, welches ein entscheidendes pathologisches Charakteristikum bei Atemwegserkrankungen mit Dyskrinie ist, konnte beim Menschen, aber nicht bei der Maus gezeigt werden (Alevy *et al.*, 2012). Es wird diskutiert, dass homologe *CLCA*-Vertreter bei der Maus im Gegensatz zum Menschen redundante Funktionen haben und sich gegenseitig kompensieren können (Alevy *et al.*, 2012). Somit scheint die Übertragbarkeit der Erkenntnisse zwischen den Spezies in gewissen Aspekten eingeschränkt. Um die Rolle einzelner *CLCA*-Mitglieder sowie ihre Übertragbarkeit aus Tiermodellen auf den Menschen besser zu verstehen, ist es essentiell, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Spezies zu kennen.

Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der *CLCA*-Genfamilie in den als Tiermodellen für respiratorische Erkrankungen wie Mukoviszidose oder Asthma relevanten Spezies Maus, Schwein und Katze im Hinblick auf ihre Struktur auf Genomebene, ihre Proteinstruktur und -prozessierung sowie ihr zelluläres Expressionsmuster im Atmungstrakt. Des Weiteren sollten für den Menschen postulierte Funktionen von *CLCA1* in der Spezies Maus untersucht

werden. Sämtliche Ergebnisse wurden mit Daten des Menschen verglichen. Insgesamt sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Spezies aufgeklärt werden, um die diesbezügliche Eignung der einzelnen Spezies als Modelle für die Erforschung der *CLCA*-Familie und ihrer Translatierbarkeit auf dem Menschen abschätzen zu können.

Ein erweitertes Ziel dieser Untersuchungen bestand auch darin, die Eignung und Übertragbarkeit der einzelnen Tiermodelle für menschliche Atemwegserkrankungen mit Blick auf die *CLCA*-Genfamilie zu beleuchten. Da diese Genfamilie sehr bedeutsam für mehrere Lungenerkrankheiten des Menschen zu sein scheint, wird damit auch ein weiterer Beitrag geleistet, Möglichkeiten und Grenzen von Tiermodellen durch Aufklärung molekularer Speziesunterschiede besser zu verstehen.

2. Offene Fragen und Hypothesen

Die CLCA-Genfamilie war bislang in den Spezies Mensch und Maus intensiv im Hinblick auf ihre Genomstruktur, ihre Proteinstruktur und -prozessierung sowie ihr gewebliches und zelluläres Expressionsmuster erforscht worden (Patel *et al.*, 2009) und bedeutsame Unterschiede zwischen den beiden Spezies wurden bereits identifiziert (siehe Einleitung). Nahezu unbekannt war jedoch die CLCA-Familie beim Schwein. Einzig der porcine Vertreter CLCA1 war bekannt und *in vitro* auf seine Eigenschaften bei der Induktion einer Chloridleitfähigkeit untersucht worden (Gaspar *et al.*, 2000; Loewen *et al.*, 2002a; Loewen *et al.*, 2004; Loewen *et al.*, 2002b). Diese *in vitro* Untersuchungen zeigten Unterschiede zwischen der Art und Regulation der induzierten Chloridleitfähigkeit zum Menschen und somit erste Differenzen zwischen den Spezies auf.

Die Anzahl der CLCA-Mitglieder beim Schwein, ihre genomische Struktur, ihre Proteinstruktur und -prozessierung sowie das jeweilige zelluläre Expressionsmuster waren bislang unbekannt. Bezüglich der CLCA-Genfamilie der Katze lagen keinerlei Daten vor. Eine Vergleichbarkeit zum Menschen oder der Maus, insbesondere auf die Expression der CLCA-Mitglieder im Respirationstrakt, war in beiden Spezies somit nicht umfassend möglich.

Hypothesen 1 und 2:

In den Spezies Schwein und Katze finden sich CLCA-Orthologe zum Menschen, die auch im Respirationstrakt exprimiert werden, und dort möglicherweise krankheitsrelevant sind.

Die CLCA-Genfamilie unterliegt einer speziesspezifischen Evolution, wonach zwischen den Spezies Mensch, Maus, Schwein und Katze bedeutsame Unterschiede bestehen.

Bezüglich der Rolle der CLCA-Mitglieder bei respiratorischen Erkrankungen kommt CLCA1 die größte Bedeutung zu (Patel *et al.*, 2009). Zahlreiche Funktionen sind bislang für CLCA1 postuliert worden. Namensgebend war die Beobachtung, dass CLCA1 *in vitro* eine Kalzium-abhängige Chloridleitfähigkeit induziert (Gruber *et al.*, 1998a). Die Mitglieder stellen jedoch keine Chloridkanäle *per se* dar, sondern modulieren den Kalzium-abhängigen Chloridkanal TMEM16A (Sala-Rabanal *et al.*, 2015). CLCA1 ist beim Menschen als Signalmolekül für die Mukuszellformation und Mukusproduktion identifiziert worden (Alevy *et al.*, 2012). Des Weiteren ist das humane CLCA1 in der Lage, Alveolarmakrophagen zu aktivieren (Ching *et al.*, 2013) und scheint Eigenschaften einer Metalloprotease zu haben (Pawlowski *et al.*, 2006). Auch wird diskutiert, dass CLCA1 ähnlich den Muzinen ein wichtiger struktureller Bestandteil des Mukusschicht ist (Rodriguez-Pineiro *et al.*, 2013).

Bislang wurde der Einfluss von *CLCA1* auf die Mukuszellformation bei der Maus untersucht. Es zeigte sich aber, dass die Maus nicht das geeignete Modell ist, diese *CLCA1* Funktion zu untersuchen (Alevy *et al.*, 2012). Unklar war, ob die anderen postulierten Funktionen auch vom murinen *CLCA1* erfüllt werden und in dieser Spezies möglicherweise untersucht werden können.

Hypothese 3:

Die Maus als Modell ist nicht geeignet, alle postulierten Funktionen von CLCA1 beim Menschen zu untersuchen.

Eine speziesspezifische Evolution einer Genfamilie kann durchaus zu einer Änderung der Funktionsweise der Proteine in den jeweiligen Arten führen. Bei einer fehlenden Expression in einem Gewebe einer Tierart kann die Funktion des Proteins in dem Organ auch nicht vorliegen. Bzw. kann eine überlappende Expression von mehreren Mitgliedern einer Genfamilie in demselben Gewebe einer Spezies zu einer überlappenden oder redundanten Funktionsweise der Proteine führen, die bei anderen Spezies mit einem unterschiedlichen Expressionsmuster nicht vorliegen muss.

3. Publikationsliste dieser kumulativen Habilitationsschrift

Insgesamt sind 13 *peer reviewed* Publikationen in englischsprachigen Fachzeitschriften Teil der vorliegenden Habilitationsschrift, davon sechs mit eigener Erst- oder Letztautorenschaft.

Die Publikationen sind in der Reihenfolge ihrer Erstnennung in dieser Habilitationsschrift wie folgt aufgelistet. Außerdem werden die Einzelbeiträge der beteiligten Autoren angegeben.

- P1. Plog S, **Mundhenk L**, Klymiuk N, Gruber AD. (2009) Genomic, tissue expression, and protein characterization of pCLCA1, a putative modulator of cystic fibrosis in the pig. *J Histochem Cytochem.* 57(12):1169-81. DOI: 10.1369/jhc.2009.954594
- a. Idee: Mundhenk, Gruber
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Plog
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Plog, Klymiuk, Mundhenk
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Plog, Gruber
- P2. **Mundhenk L***, Erickson NA*, Klymiuk N, Gruber AD. (2018) Interspecies diversity of chloride channel regulators, calcium-activated 3 genes. *PLoS One.* 18;13(1):e0191512. * geteilte Autorenschaft <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191512>
- a. Idee: Mundhenk
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Erickson, Klymiuk
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Erickson, Klymiuk, Mundhenk
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Erickson, Gruber, Klymiuk
- P3. Plog S, Grötzsch T, Klymiuk N, Kobalz U, Gruber AD, **Mundhenk L**. (2012) The porcine chloride channel calcium-activated family member pCLCA4a mirrors lung expression of the human hCLCA4. *J Histochem Cytochem.* 60(1):45-56.
DOI: 10.1369/0022155411426455
- a. Idee: Mundhenk
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Plog
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Plog, Grötzsch, Klymiuk, Mundhenk, Kobalz
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Plog, Gruber
- P4. Plog S, Klymiuk N, Binder S, Van Hook MJ, Thoreson WB, Gruber AD, **Mundhenk L**. (2015) Naturally Occurring Deletion Mutants of the Pig-Specific, Intestinal Crypt

- Epithelial Cell Protein CLCA4b without Apparent Phenotype. PLoS One. 16;10(10):e0140050. DOI:10.1371/journal.pone.0140050
- a. Idee: Mundhenk
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Plog
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Mundhenk, Plog, Klymiuk, Binder, van Hooh, Thoreson
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Plog, Gruber
- P5. Plog S, **Mundhenk L**, Langbein L, Gruber AD. (2012) Synthesis of porcine pCLCA2 protein during late differentiation of keratinocytes of epidermis and hair follicle inner root sheath. Cell Tissue Res. 2012 350(3):445-53. DOI 10.1007/s00441-012-1482-9
- a. Idee: Mundhenk, Gruber
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Plog
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Plog, Mundhenk, Langbein
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Plog, Gruber
- P6. Erickson NA, Gruber AD, **Mundhenk L**. (2019) The Family of Chloride Channel Regulator, Calcium-activated Proteins in the Feline Respiratory Tract: A Comparative Perspective on Airway Diseases in Man and Animal Models. J Comp Pathol. 2019 174: 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.10.193>
- a. Idee: Mundhenk
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Erickson
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Erickson, Mundhenk
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Gruber, Erickson
- P7. Erickson NA, Nyström EE, **Mundhenk L**, Arike L, Glauben R, Heimesaat MM, Fischer A, Bereswill S, Birchenough GM, Gruber AD, Johansson ME. (2015) The Goblet Cell Protein Clca1 (Alias mClca3 or Gob-5) Is Not Required for Intestinal Mucus Synthesis, Structure and Barrier Function in Naive or DSS-Challenged Mice. PLoS One. 10;10(7):e0131991. doi:10.1371/journal.pone.0131991
- a. Idee: Mundhenk, Gruber, Johannsson
 - b. Versuchsplanung: Mundhenk, Erickson, Johannsson
 - c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Mundhenk, Erickson, Nyström, Arike, Glauben, Heimesaat, Fischer, Bereswill, Birchenough
 - d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Erickson, Nyström, Gruber, Johannsson

- P8. Dietert K, **Mundhenk L**, Erickson NA, Reppe K, Hocke AC, Kummer W, Witzentrath M, Gruber AD. (2015) Murine *CLCA5* is uniquely expressed in distinct niches of airway epithelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2015 143(3):277-87. DOI 10.1007/s00418-014-1279-x
- Idee: Gruber, Dietert
 - Versuchsplanung: Dietert, Mundhenk
 - Versuchsdurchführung/Auswertung: Dietert, Erickson, Mundhenk, Reppe, Hocke, Kummer, Witzentrath
 - Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Dietert, Gruber
- P9. **Mundhenk L**, Johannesson B, Anagnostopoulou P, Braun J, Bothe MK, Schultz C, Mall MA, Gruber AD. (2012) *mCLCA3* does not contribute to calcium-activated chloride conductance in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 47(1):87-93. DOI: 10.1165/rcmb.2010-0508 OC
- Idee: Mundhenk
 - Versuchsplanung: Mundhenk, Mall
 - Versuchsdurchführung/Auswertung: Mundhenk, Johannesson, Anagnostopoulou, Braun, Bothe
 - Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Mall, Gruber
- P10. Bothe MK, **Mundhenk L**, Kaup M, Weise C, Gruber AD. (2011) The murine goblet cell protein *mCLCA3* is a zinc-dependent metalloprotease with autoproteolytic activity. *Mol Cells.* 32(6):535-41. DOI/10.1007/s10059-011-0158-8
- Idee: Mundhenk, Gruber
 - Versuchsplanung: Mundhenk, Bothe
 - Versuchsdurchführung/Auswertung: Bothe, Kaup, Mundhenk, Weise
 - Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Bothe, Gruber
- P11. Erickson NA, **Mundhenk L**, Giovannini S, Glauen R, Heimesaat MM, Gruber AD. (2016) Role of goblet cell protein *CLCA1* in murine DSS colitis. *J Inflamm (Lond).* 4;13:5. DOI 10.1186/s12950-016-0113-8
- Idee: Mundhenk, Gruber
 - Versuchsplanung: Mundhenk, Erickson
 - Versuchsdurchführung/Auswertung: Mundhenk, Erickson, Giovanni, Glauen, Heimesaat

- d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Erickson, Gruber

P12. Dietert K, Reppe K, **Mundhenk L**, Witzenrath M, Gruber AD. (2014) mCLCA3 modulates IL-17 and CXCL-1 induction and leukocyte recruitment in murine *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One*. 2014 17;9(7):e102606. doi:10.1371/journal.pone.0102606

- a. Idee: Gruber
- b. Versuchsplanung: Dietert, Mundhenk
- c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Dietert, Reppe, Mundhenk, Witzenrath
- d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Dietert, Gruber

P13. Erickson NA, Dietert K, Enders J, Glauben R, Nouailles G, Gruber AD, **Mundhenk L**. (2018) Soluble mucus component CLCA1 modulates expression of leukotactic cytokines and BPIFA1 in murine alveolar macrophages but not in bone marrow-derived macrophages. *Histochem Cell Biol*. 149(6):619-633. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1664-y>

- a. Idee: Mundhenk, Dietert
- b. Versuchsplanung: Mundhenk, Erickson, Dietert
- c. Versuchsdurchführung/Auswertung: Erickson, Enders, Glauben, Nouailles, Dietert, Mundhenk
- d. Erstellung des Manuskripts: Mundhenk, Erickson, Gruber, Dietert

Folgende dieser Publikationen bzw. deren Daten sind in bereits abgeschlossene bzw. in Vorbereitung befindliche Dissertationen am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin eingeflossen. Die Daten wurden jedoch nicht für andere Habilitationsschriften genutzt.

Melanie K. Bothe (Ph.D. Dissertation 2012): 10P

Stephanie Plog (Ph.D. Dissertation 2012): 1P, 3P

Tanja Grötzsch (Dr. med. vet. Dissertation 2013): 3P

Kristina Dietert (Ph.D. Dissertation 2014): 8P, 12P

Nancy Ann Erickson (Ph.D. Dissertation 2019): 7P, 11P, 13P

Nancy Ann Erickson (Dr. med. vet. Dissertation in Vorbereitung): 2P, 6P

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das *CLCA*-Genom, die Proteinstruktur und -prozessierung der *CLCA*-Mitglieder im Speziesvergleich (Publikationen P1-P7)

Im ersten Teil dieses Projekts wurde die *CLCA*-Familie zwischen den relevanten Spezies auf Genomebene miteinander verglichen. Hierbei wurde zum einen auf in den Datenbanken (GenBank und ensemble) befindliche Sequenzen der *CLCA*-Gene zurückgegriffen. Zum anderen wurden auf künstlichen Bakterienchromosomen (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) die porzinen *CLCA*-Gene lokalisiert und die entsprechenden BACs wurden dann sequenziert (**P1**).

Die Analyse der Genome zeigte, dass sich die *CLCA*-Genfamilie in allen untersuchten Spezies konserviert zwischen den flankierenden Genen *outer dense fiber of sperm tails 2-like (ODF2L)* und *SH3-domain GRB2-like endophilin B1 (SH3GLB1)* befindet (**P1, P2**). Dies ist nicht nur bei Säugetieren der Fall, sondern findet sich auch konserviert beim Huhn wieder (**P2**). Ausgehend von den vier menschlichen *CLCA*-Genen lassen sich die *CLCA*-Mitglieder der einzelnen Säugetierspezies in vier Cluster eingruppiert (**P1, P2**). Die Anordnung der *CLCA*-Homologe im *CLCA*-Genlokus der einzelnen Spezies ist identisch. Auch besteht das *CLCA*-Cluster 1 und 2 in jeder untersuchten Spezies ausschließlich aus einem *CLCA*-Mitglied, jedoch gibt es durch Duplikationen und Inaktivierungen von Genen bedeutsame speziesspezifische Unterschiede in der Anzahl der Gene der *CLCA*-Cluster 3 und 4 (**P2**). Beim Menschen liegt das *CLCA3*-Gen inaktiv als Pseudogen vor (Gruber and Pauli, 1999). Der Mensch besitzt wie weitere Primatenspezies ein zusätzliches Exon durch eine aktive *splice acceptor* Stelle im Intron 8 (**P2**). Dieses kryptische Exon besitzt vorzeitige Terminationscodone, weitere befinden sich in anderen Teilen des humanen *CLCA3*-Gens. Auch beim Schwein liegt das *CLCA3*-Gen als Pseudogen vor (**P1**), jedoch scheint der Mechanismus der Inaktivierung nicht auf einem kryptischen Exon mit vorzeitigem Terminationscodon zu beruhen (**P2**). Beim Schwein finden sich stattdessen zahlreiche Stopcodone und Frameshift Mutationen im *CLCA3*-Gen. Die Katze hat ebenfalls ein einziges *CLCA3*-Gen, jedoch ist dieses im Gegensatz zu Mensch und Schwein aktiv (**P2**). Die Maus besitzt hingegen drei aktive Gene im *CLCA*-Cluster 3 (**P2**, (Patel *et al.*, 2009)).

Im *CLCA*-Cluster 4 findet sich beim Menschen ein *CLCA*-Mitglied (**P1, P2**), welches funktionell ist (Agnel *et al.*, 1999). Auch die Katze hat ein *CLCA4*-Gen (**P2**), wohingegen beim Schwein und bei der Maus durch Duplikationen zwei bzw. drei *CLCA4*-Gene vorliegen (**P1, P2**).

Somit gibt es Unterschiede in der Anzahl der *CLCA*-Gene und deren Funktionalität zwischen den Spezies (Tabelle 1).

Eigenschaften des <i>CLCA</i>-Genoms	Mensch (Patel <i>et al.</i>, 2009)	Maus (Patel <i>et al.</i>, 2009)	Schwein (P1)	Katze (P2)
Anzahl der <i>CLCA</i> -Gene	4	8	5	4
Vorhandensein von Pseudogenen	Ja	Nein	Ja	Nein
Vorhandensein von Duplikationen	Nein	Ja	Ja	Nein
Anzahl mutmaßlich funktioneller <i>CLCA</i> -Gene	3	8	4	4

Tabelle 1: Tierartvergleichende Betrachtung des *CLCA*-Genoms

Weiterhin wurden einzelne *CLCA*-Gene zwischen den Spezies verglichen. Die Gene bestehen in jeder Spezies aus 14 Exone mit gemeinsamen Exon-Intron Strukturen (**P1-P4**) und weisen somit in ihrem genomischen Aufbau zwischen den Spezies eine große Gemeinsamkeit auf, mit Ausnahme des bereits oben erwähnten *CLCA3*-Gens (**P2**). Weiterhin wurde im porzinen *CLCA4b*-Gen bei einigen Schweinen verschiedener Rassen eine einzigartige Deletionsmutation in der Spleißakzeptorstelle entdeckt, die zu einem alternativen Spleißen mit vorzeitigen Terminationscodon und verkürzten vorhergesagten offenen Leserahmen führt (**P4**). Diese Schweine exprimieren kein Protein, zeigen aber auch keinen offensichtlichen Phänotyp (**P4**).

Zwischen den Spezies war die Nomenklatur der *CLCA*-Genfamilie lange Zeit inkonsistent und damit verwirrend. Dies hatte zur Folge, dass direkte Orthologe nicht leicht gefunden werden konnten. Die ersten entdeckten Vertreter beim Rind wurden nach ihrer vermuteten Funktion benannt: ein Homologe wurde *calcium-activated chloride channel* (*CaCC*) (Cunningham *et al.*, 1995) genannt, während der andere als *lung-endothelial cell adhesion molecule-1* (*Lu-ECAM-1*) beschrieben wurde (Elble *et al.*, 1997). Mit der Entdeckung weiterer Mitglieder in verschiedenen Spezies wurde ein erster Versuch unternommen, die Namensgebung zu strukturieren und zu vereinheitlichen (Gruber *et al.*, 2000). So erhielten alle Mitglieder zunächst den Namen *chloride channel, calcium-activated*, da erste *in vitro* Experimente die Funktion eines Chloridkanals *per se* vermuten ließen (Gruber *et al.*, 1998a). Die Spezies wurde mit einem Präfix versehen wie *h* für *human*, oder *m* für *mouse*, und homologe Vertreter chronologisch nach Ihrer Entdeckung beziffert. Jedoch führte dies dazu, dass der direkte Orthologe von hCLCA1 mCLCA3

genannt wurde und mCLCA1 der direkte Orthologe von hCLCA3 war. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Proteine keine Kanäle *per se* darstellen können, sondern vielmehr andere Chloridkanäle regulieren, so dass die Familie in *chloride channel regulator, calcium-activated* (CLCA) umbenannt wurde (Gaspar *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2005; Mundhenk *et al.*, 2006). Im Zuge dieses Projektes wurden die neuentdeckten porcinen und felines Mitglieder direkt nach ihren menschlichen Orthologen benannt (**P1-P6**), damit eine direkte Zuordnung gewährleistet ist. Weiterhin wurde auch die murine Nomenklatur mit dem *Mouse Gene Nomenclature Committee* (MGNC) harmonisiert und an die des Menschen angepasst (**P7**), so dass nun eine einheitliche, vergleichbare Nomenklatur dieser Genfamilie vorliegt.

Auf Proteinebene werden alle bislang untersuchten CLCA-Vertreter posttranslational in eine abhängig von der Spezies circa 80 bis 90 kDa amino-terminale und eine circa 30 bis 40 kDa carboxy-terminale Untereinheit gespalten (Gruber *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2009). Weiterhin lassen sich die Proteine von Mensch und Maus anhand ihrer Proteinstruktur in zwei Gruppen einteilen (Patel *et al.*, 2009): 1) Proteine, die komplett extrazellulär sezerniert werden, wie das humane und murine CLCA1- Protein sowie die Proteine des CLCA 3-Clusters, und 2) Proteine, deren amino-terminales Spaltprodukt von der Zelle abgegeben wird, wohingegen das carboxy-terminale Spaltprodukt an der Plasmamembran aufgrund einer Transmembrandomäne verbleibt wie die Proteine des Cluster 2 und 4. Im nächsten Schritt erfolgten *in silico* Analysen und *in vitro* Experimente, die exemplarisch aufzeigen sollten, ob die CLCA-Proteine beim Schwein und bei der Katze den gleichen Regeln unterliegen und sich analog eingruppierten lassen. Auch die CLCA-Proteine bei Schwein und Katze weisen eine posttranslationale Spaltung auf (**P1-P6**). Das CLCA1- und CLCA3-Protein bei Schwein und Katze enthalten keine Transmembrandomänen (**P1, P2, P6**), wohingegen die CLCA2- und CLCA4-Proteine am carboxy-terminalen Ende eine Transmembrandomäne besitzen (**P3, P4, P6**). Somit lassen sich die Proteine auch in diesen Spezies analog zu denen des Menschen und der Maus einordnen (Tabelle 2).

CLCA Cluster	Mensch (Patel <i>et al.</i> , 2009)	Maus (Patel <i>et al.</i> , 2009)	Schwein (P1, P3-5)	Katze (P2, P6)
CLCA1	sezerniert	sezerniert	sezerniert	sezerniert
CLCA2	TM	TM	TM	TM
CLCA3	trunkiert	3a1: sezerniert 3a2: sezerniert 3b: sezerniert	trunkiert	sezerniert
CLCA4	TM	4a: TM 4b: TM 4c: trunkiert	4a: TM 4b: TM	TM

Tabelle 2: Tierartvergleichende Betrachtung der CLCA-Proteine
(TM – Transmembrandomäne)

Weiterhin konnten typische Strukturelemente der CLCA-Proteine wie eine Spaltungsstelle, die amino-terminale CLCA Domäne (n-CLCA) und die von Willebrand Faktor A (vWA) Domäne (Patel *et al.*, 2009) in allen hier untersuchten CLCA-Aminosäuresequenzen gefunden werden (**P1-P6**). Somit sind diese Elemente nicht nur zwischen den Spezies, sondern auch zwischen den einzelnen CLCA-Homologen hochkonserviert, was eine ähnliche Funktion der CLCA-Proteine vermuten lässt.

Zusammengefasst wurde festgestellt, dass der *CLCA*-Genlocus bei Säugetieren in seiner Grundeinheit aus vier *CLCA*-Genen besteht und konserviert an einem Ort im Genom zu finden ist (**P1, P2**). Durch speziesspezifische Duplikationen und Inaktivierungen im *CLCA*-Gen 3 und 4 liegt aber eine unterschiedliche Anzahl an *CLCA*-Genen in den jeweiligen Spezies vor. Kein Modelltier besitzt die gleiche Anzahl an funktionellen *CLCA*-Genen wie der Mensch (Tabelle 1). Die einzelnen orthologen *CLCA*-Gene und -Proteine sind in ihrem Aufbau und Prozessierung zwischen den Spezies nahezu identisch. Eine große Ausnahme bildet hier aber das *CLCA3*-Gen (**P2**).

Expressionsmuster der CLCA-Mitglieder in den Atemwegen im Speziesvergleich (Publikationen P1-P8, P12)

Im weiteren Untersuchungsverlauf wurde das gewebliche und zelluläre Expressionsmuster einzelner CLCA-Mitglieder in den Spezies Schwein (CLCA1, 2, 4a und 4b), Katze (CLCA1, -2, -3 und -4) sowie Maus (CLCA2) auf Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA)-Ebene

mittels konventioneller oder quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) sowie auf Proteinebene immunhistochemisch oder per Westernblot untersucht und mit denen des Menschen verglichen.

Das porcine CLCA1-Mitglied findet sich wie bei Mensch (Gruber *et al.*, 1998a) und Maus (Leverkoehne and Gruber, 2002) bevorzugt im Respirations- und Intestinaltrakt und wird dort von Becher- und anderen Muzinproduzierenden Zellen exprimiert (**P1**). Es findet sich auch extrazellulär als Bestandteil des Mukus. Weiterhin konnte das Protein in den großen Ausführungsgängen des Pankreas, der Leber sowie der Gallenblase nachgewiesen werden (**P1**). Eine solche Expression ist bislang bei Mensch oder Maus nicht beschrieben (Gruber *et al.*, 1998a; Leverkoehne and Gruber, 2002). Es kann sich hierbei tatsächlich um eine speziesspezifische Expression handeln, aber auch auf technische Gründe oder dem jeweiligen Studiendesign zurückzuführen sein. Bezogen auf den Respirationstrakt ist das Expressionsmuster zwischen Schwein, Mensch und Maus aber identisch (Tabelle 3). CLCA1 wurde auch bei der Katze in muzinproduzierenden Zellen des Atmungstraktes sowie extrazellulär nachgewiesen (**P6**). Weiterhin zeigten Katzen mit felinem Asthma eine verstärkte Expression des Proteins im Mukus der Atemwege (**P6**). Im Unterschied zu den anderen Spezies wird dieser CLCA-Vertreter aber nicht in submukosalen Drüsen (engl. *submucosal glands*, SMG) des Respirationstraktes exprimiert (**P6**).

CLCA2 wurde beim Schwein, wie zuvor bei der Maus (Braun *et al.*, 2010) und beim Menschen (Connon *et al.*, 2004) beschrieben, in den Keratinozyten der Haut nachgewiesen (**P5**). Im Respirationstrakt wird das Protein außerdem in den SMGs des Respirationstraktes exprimiert (**P8**). In diesen Zellen wird CLCA2 auch beim Mensch und bei der Maus exprimiert (**P8**). Die Anzahl der CLCA2-positiven SMGs variiert aber abhängig von der Spezies: in der Maus fanden sich mehr positive Zellen als beim Schwein und beim Menschen (**P8**). Einzig konnte bei der Maus das CLCA2-Protein in bestimmten bronchialen Epithelzellen inklusive dort befindlicher Mukuszellen an der bronchialen Bifurkation nachgewiesen werden (**P8**). Dieses Expressionsmuster stellt einen bedeutsamen speziesspezifischen Unterschied in der Expression dar. CLCA2 wurde bei der Katze ebenfalls in den Keratinozyten der Haut gefunden (**P6**). In den Atemwegen wurde CLCA2 zwar im Ganzorganlysat auf RNA-Ebene geringfügig nachgewiesen, aber nicht auf zellulärer Ebene mittels *in-situ* Hybridisierung oder Immunhistologie (**P6**).

Das *CLCA3*-Gen ist bei Mensch und Schwein offenbar ein Pseudogen, dessen genomische Sequenz zahlreiche vorzeitige Stopcodone aufweist und in den beiden Spezies durch unterschiedliche Mechanismen inaktiviert wurde (siehe auch Punkt 2, **P2**). Bei der Maus finden sich durch

Duplikationen drei homologe Vertreter. Es wurde in anderen Studien gezeigt, dass *CLCA3a1* und *3a2* ein breites Expressionsmuster in zahlreichen Geweben aufweisen. Sie wurden in sekretorischen Epithelzellen, Endothelzellen und Keratinozyten nachgewiesen (Gruber *et al.*, 1998b; Leverkoehne *et al.*, 2002; Roussa *et al.*, 2010). Der dritte *CLCA3*-Homologe *CLCA3b* fand sich insbesondere in glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Elble *et al.*, 2002).

In der Katze findet sich wie bei Mensch und Schwein nur ein *CLCA3*-Gen, welches aber aktiv ist. Dieses *CLCA*-Mitglied wird bei der Katze im Ösophagus und im Respirationstrakt gefunden (**P2**). Es wird in den Plattenepithelzellen des Ösophagus sowie vereinzelt in zillierten Bronchialepithelzellen und in den mukösen Anteilen der SMGs entlang des Respirationstraktes exprimiert (**P2**).

Beim Mensch ist die Expression von *CLCA4* auf RNA-Ebene im oberen Respirationstrakt wie der Nasenschleimhaut und der Trachea (Agnel *et al.*, 1999; Mall *et al.*, 2003) sowie im Gastrointestinaltrakt und zahlreichen anderen Geweben wie Harnblase, Speicheldrüse, Gehirn, Hoden, Prostata und Uterus beschrieben (Agnel *et al.*, 1999). Auf Proteinebene liegen derzeit noch keine Daten vor.

Im Gegensatz zum Menschen finden sich bei der Maus drei homologe *CLCA4*-Vertreter. Das Expressionsmuster von *Clca4c* ist bislang noch unbekannt, *Clca4a* und *4b* sind aber im Magen-Darmtrakt auf RNA-Ebene beschrieben worden (Al-Jumaily *et al.*, 2007; Bothe *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde die RNA von *Clca4a* in der Milz, der Niere und dem Auge nachgewiesen (Evans *et al.*, 2004). *Clca4a* ist auf Proteinebene in Enterozyten exprimiert, wurde aber nicht im Respirationstrakt gefunden (Bothe *et al.*, 2008). Auch fand sich *Clca4b* nicht im Respirationstrakt (**P12**).

Das Schwein hat im Gegensatz zum Mensch und zur Maus zwei homologe *CLCA4*-Vertreter (**P1**). Auf RNA-Ebene konnte *CLCA4a* im oberen Respirationstrakt, im Magendarmtrakt, dem Auge und dem Uterus verortet werden (**P3**). Das Protein konnte hingegen ausschließlich in respiratorischen Epithelzellen des oberen Atmungstraktes und in Enterozyten des Dünndarmes belegt werden (**P3**). Das *CLCA4b*-Protein wurde nur in Kryptepithelzellen des Dün- und Dickdarms gefunden (**P4**). Somit besetzen die beiden *CLCA4*-Vertreter beim Schwein unterschiedliche zelluläre Nischen im Darmtrakt (**P4**), im Atmungstrakt ist nur das *CLCA4a*-Protein, aber nicht das *CLCA4b*-Protein exprimiert. Bei der Katze wird *CLCA4* ausschließlich im Darmtrakt, aber nicht in den Atemwegen exprimiert (**P6**).

Die Expression von CLCA1 weist im Gegensatz zu den anderen CLCA-Mitgliedern ein nahezu identisches zelluläres Expressionsmuster in den Atemwegen der untersuchten Spezies auf (Tabelle 3). Einzig fehlt im Gegensatz zu den anderen Spezies das CLCA1 Protein in dem SMGs der Katze.

CLCA-Cluster	Mensch	Maus	Schwein	Katze
CLCA1	Muzinproduzierende Zellen (Becherzellen und submukosale Drüsen) (Hoshino <i>et al.</i> , 2002)	Muzinproduzierende Zellen (Becherzellen und submukosale Drüsen) (Leverkoehne and Gruber, 2002)	Muzinproduzierende Zellen (Becherzellen und submukosale Drüsen) (P1)	Muzinproduzierende Zellen (nur Becherzellen) (P6)
CLCA2	Submukosale Drüsen (P7)	Submukosale Drüsen und bronchiale Epithelzellnische (P7)	Submukosale Drüsen (P7)	Nicht auf zelluläre Ebene nachgewiesen (P6)
CLCA3	Pseudogen – inaktiv (Gruber and Pauli, 1999)	Clca3a1/3a2 : sekretorische Epithelzellen, Endothelzellen (Gruber <i>et al.</i> , 1998b) Clca3b : glatte Muskelzellen, Endothelzellen (Elble <i>et al.</i> , 2002)	Pseudogen – inaktiv (P1)	Zillierte bronchiale Epithelzellen, submukosale Drüsen (muköser Anteil) (P2)
CLCA4	Nasenschleimhaut, Trachea (Agnel <i>et al.</i> , 1999; Mall <i>et al.</i> , 2003); zelluläre Nachweis bislang n.u.	Clca 4a und 4b : nicht im Atmungstrakt exprimiert; (Bothe <i>et al.</i> , 2008), (P12) Clca4c : n.u.	CLCA4a : Respiratorische Epithelzellen des oberen Atmungstrakts (P3) CLCA4b : Nicht auf Proteinebene exprimiert (P4)	Nicht im Atmungstrakt exprimiert (P6)

Tabelle 3: Tierartvergleichende Betrachtung der CLCA-Expression im Respirationstrakt (n.u. – nicht untersucht)

Untersuchungen postulierter Funktionen von CLCA1 im Mausmodell (Publikationen P7-P13)

Die physiologische und pathophysiologische Funktion der CLCA-Familie bzw. einzelner Mitglieder ist noch lange nicht verstanden. Seit der Entdeckung der Familie kam es sogar zu Paradigmenwechseln bezüglich ihrer Funktionsweise. Die ursprüngliche Hypothese, dass es sich

um CaCC handelt, musste verworfen werden (Gibson *et al.*, 2005; Mundhenk *et al.*, 2006). Es konnte aber gezeigt werden, dass das humane CLCA1 den Kalzium-abhängigen Chloridkanal TMEM16 A moduliert (Sala-Rabanal *et al.*, 2015). Weiterhin wurde eine zentrale Rolle bei der Entstehung der respiratorischen Mukuszellmeta- und hyperplasie beim Menschen gezeigt (Alevy *et al.*, 2012). Es stellte sich aber heraus, dass die Maus kein geeignetes Modell ist, diese Funktion zu untersuchen (Alevy *et al.*, 2012).

Die nachstehenden Forschungsergebnisse nehmen die Maus als Modell für weitere potenzielle Funktion von CLCA1 in den Blick. Zum einen wurde eine mögliche Modulation der Kalzium-aktivierbaren Chloridleitfähigkeit durch CLCA1 im Tiermodell Maus getestet (**P9**). Dazu wurden CLCA1-knock-out (KO)-Mäuse mit Wildtyp (WT)-Mäusen unter naiven Bedingungen sowie nach IL-13 Challenge u.a. im Hinblick auf den Ionentransport in den Atemwegen untersucht. Es ergaben sich dabei keinerlei Unterschiede zwischen KO- und den WT-Tieren. Weiterhin hatte der CLCA1-KO keinen Einfluss auf die Muzinzellhyperplasie und die Regulation respiratorischer Muzingene. Die Daten sprechen somit gegen die Rolle des murinen CLCA1-Proteins bei der Modulation einer Kalzium-abhängigen Chloridleitfähigkeit. Weiterhin unterstützen sie die Erkenntnis, dass in der Maus die Rolle von CLCA1 bei der Entstehung der respiratorischen Mukuszellmeta- und hyperplasie nicht erforscht werden kann.

Im nächsten Schritt wurde die Hypothese, dass es sich bei CLCA1 um ein Strukturprotein des Mukus handelt, im CLCA1-KO Modell unter naiven sowie unter Challenge-Bedingungen getestet (**P7**). Hierbei wurde der Mukus des Dickdarms als System gewählt, welches am besten untersucht ist und durch Dextran Natriumsulfat (engl. *dextran sulfate sodium*, DSS) -Gabe manipuliert werden kann. In keinem der durchgeführten Experimente ließen sich Unterschiede zwischen CLCA1-KO- und WT-Mäusen feststellen, somit sprechen die Ergebnisse gegen CLCA1 als funktionell essenziellen Bestandteil des Mukus.

Ein wesentliches strukturelles Element sämtlicher CLCA-Proteine ist eine konservierte Hydrolase-Domäne ähnlich denen der Metalloproteasen (Pawlowski *et al.*, 2006). Experimentell konnte durch gezielte Mutation des HEXXH-Motivs dieser Domäne gezeigt werden, dass die posttranslationale Spaltung des CLCA1-Proteins des Menschen verhindert wird (Pawlowski *et al.*, 2006). Auch dieser Aspekt wurde hier für den orthologen Vertreter der Maus und des Schweins untersucht (**P10**). Mutationen im HEXXH-Motiv dieser Spezies verhinderten ebenfalls die posttranslationale Spaltung. Erweitert konnte sogar gezeigt werden, dass das CLCA1-Protein der Maus eine Zink-abhängige Metalloprotease mit autokatalytischer Aktivität darstellt

(P10). Kürzlich zeigten auch *in vivo* Daten aus der Maus, dass CLCA1 eine Metalloproteaseaktivität besitzt und dadurch die Ausdehnung des Mukus beeinflusst (Nystrom *et al.*, 2018).

Zusätzlich wird CLCA1 als Regulator von Entzündungsmediatoren diskutiert. Das humane CLCA1 ist in der Lage, als Signalmolekül Makrophagen des Atmungstraktes zu aktivieren und eine proinflammatorische Antwort hervorzurufen (Ching *et al.*, 2013). Auch dieser Ansatz wurde im letzten Teil dieser Forschungsarbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Maus untersucht (**P11** – **P13**). Identisch zu seinem humanen Orthologen moduliert CLCA1 bei der Maus Alveolarmakrophagen und führt zur Expression von leukotaktischen Zytokinen (**P13**). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CLCA1 diese Wirkung nicht auf Knochenmarksmakrophagen ausübt. Eine Modulation von Zytokinen wurde auch *in vivo* gezeigt. Bei CLCA1-KO-Mäusen konnte sowohl im DSS-Colitis Modell (**P11**) als auch in einem Staphylokokken-Pneumonie Modell (**P12**) eine differentielle Regulation von leukotaktischen Zytokinen nachgewiesen werden. Im Lungenmodell wurde auch ein Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung aufgedeckt (**P11**). Die *in vitro* und die *in vivo* Daten zeigten somit, dass die mögliche Funktion einer Makrophagenaktivierung durch CLCA1 und deren Einfluss auf Entzündungsmediatoren in der Maus untersucht werden kann. Beim Menschen konnte inzwischen die vWA Domäne als verantwortlicher Teil des CLCA1-Proteins für die Makrophagenaktivierung identifiziert werden (Keith *et al.*, 2019).

Zusammenfassend zeigte sich, dass nur bestimmte, aber nicht alle postulierte Funktionen von CLCA1 in der Maus dargestellt werden können (Tabelle 4).

Postulierte Funktion für CLCA1	Mensch	Maus
Modulation einer Kalzium-aktivierbaren Chloridleitfähigkeit	Ja (Gruber <i>et al.</i> , 1998a; Hamann <i>et al.</i> , 2009; Yurtsever <i>et al.</i> , 2012)	Ja – <i>in vitro</i> (Winpenny <i>et al.</i> , 2002) Nein – <i>in vivo</i> (P9)
Mukuszellformation	Ja (Alevy <i>et al.</i> , 2012)	Nein – <i>in vivo</i> (P9, (Alevy <i>et al.</i> , 2012)
Struktureller Mukusbestandteil	n.u.	Nein- <i>in vivo</i> (P7)
Metalloprotease	Ja (Pawlowski <i>et al.</i> , 2006)	Ja – <i>in vitro</i> (P10)
Modulation der Zytokinexpression	Ja (Ching <i>et al.</i> , 2013)	Ja – <i>in vitro</i> (P13) Ja - <i>in vivo</i> (P11, P12)

Tabelle 4: Postulierte Funktionen von CLCA1 und deren Darstellbarkeit beim Mensch und bei der Maus (n.u. - nicht untersucht)

Unklar bleibt zunächst, ob die jeweilige Funktion in der Maus wirklich nicht existiert oder ob durch eine redundante Funktion zum Beispiel eines anderen CLCA-Mitglieds der Maus, diese Funktion im CLCA1-KO-Modell nicht offenbart wird. Unabhängig von der Antwort ist das *in vivo* Modell Maus in der jetzigen Form zwar nicht geeignet, postulierte Funktionen wie die Modulation einer Chloridleitfähigkeit, der Mukuszellformation oder eines strukturellen Bestandteils des Mukus zu untersuchen. Für die Analyse der Funktion von CLCA1 als Modulator der Zytokinexpression scheint die Maus jedoch geeignet zu sein.

5. Übergreifende Diskussion

Ein geeignetes Tiermodell für die Untersuchung der Funktion eines Genprodukts und dessen Bedeutung bei Erkrankungen müssen abhängig von der Fragestellung bestimmte Kriterien wie eine vergleichbare Funktion und Expression des Proteins und Einflussnahme auf den Pathomechanismus und Phänotyp erfüllen. Nur dadurch kann eine Translatierbarkeit auf den Menschen und der Nutzen für die biomedizinische Forschung gewährleistet werden. Die CLCA-Familie, deren Mitglieder eine bedeutsame, aber bislang noch nicht ganz aufgeklärte Rolle bei respiratorischen Erkrankungen wie Asthma, CF und COPD einzunehmen scheinen, wurde bislang beim Menschen und bei dem klassischen Modelltier Maus untersucht (Patel *et al.*, 2009). Teils erhebliche Unterschiede in vielen Aspekten der CLCA-Familie zwischen den beiden Spezies scheinen einen Einfluss auf die Eignung der Maus als Modelltier zu haben (Alevy *et al.*, 2012). Die hier vorliegende umfassende Forschungsarbeit zeigt, dass sowohl die Spezies Schwein und als auch die Spezies Katze, die beide ebenfalls als Modelltiere für humanmedizinische Atemwegserkrankungen eingesetzt und diskutiert werden, CLCA-Mitglieder in ihren Atemwegen exprimieren (**P1-P6, P8**). Das Familienmitglied CLCA1 weist dabei die meisten Gemeinsamkeiten zwischen den Spezies auf, während sich die anderen Mitglieder der Familie im Speziesvergleich als äußerst divers darstellen.

CLCA1 ist zwischen den untersuchten Spezies am stärksten konserviert.

Das *CLCA1*-Gen ist eins von zwei Genen dieser Familie, das in jeder bislang untersuchten Spezies als nur ein Homolog vorliegt (**P2**). Dies spricht für eine hohe Konservierung auf genomischer Ebene mit einer geringen evolutionären Dynamik. Diese Tatsache scheint auch auf die in den Spezies offenbar identische Proteinstruktur als komplett lösliches Molekül mit einer n-CLCA und einer vWA Domäne und größtenteils auf das Expressionsprofil zuzutreffen. Wie beim Menschen (Hoshino *et al.*, 2002) und bei der Maus (Leverkoehne and Gruber, 2002) konnte das CLCA1-Protein auch beim Schwein (**P1**) und bei der Katze (**P6**) in Becherzellen des Respirationstraktes und als Bestandteil des extrazellulären Mukus der Atemwege nachgewiesen werden. Die identische genomische Organisation und Proteinstruktur von CLCA1 sowie das nahezu deckungsgleiche Expressionsprofil im Respirationstrakt deuten auf eine identische Funktion des Proteins im Atmungstrakt von allen hier einbezogenen Spezies hin. Die Überexpression und massive Sekretion in den Atemwegen bei Erkrankungen wie Asthma sind beim Mensch (Gibson *et al.*, 2005), der Maus (Gibson *et al.*, 2005) und der Katze (**P6**) ebenfalls

ähnlich, was eine vergleichbare Rolle bei den Atemwegserkrankungen vermuten lässt. Jedoch deckte diese Studie auch deutliche Speziesunterschiede in der Expression auf: im Gegensatz zur Katze wird CLCA1 bei den anderen drei Spezies auch in muzinproduzierenden SMGs des Atmungstraktes exprimiert (**P6**). Somit gibt es in bestimmten Spezies trotz der hohen Übereinstimmung auf Genomebene und in der Proteinstruktur eine gewisse Variabilität in der zellulären Expression. Dieser Unterschied muss bei der Nutzung der Katze als Modell berücksichtigt werden. Insbesondere muss in Betracht gezogen werden, dass auch CLCA3 bei der Katze in diesen Zellen exprimiert wird (**P2**), und eine möglicherweise überlappende oder redundante Funktion beider Vertreter im Atmungstrakt einen Phänotyp bei der Katze anders als beim Menschen beeinflussen könnte (siehe auch unten: *CLCA3 und CLCA4 weisen eine hohe evolutionäre Dynamik mit speziesspezifischen abweichenden Expressionsmuster im Atmungstrakt auf.*).

CLCA2 ist zwar auf genomischer Ebene und in seiner Proteinstruktur zwischen den Tierarten ähnlich, zeigt aber abweichende Expressionsprofile im Atmungstrakt.

CLCA2 ist das zweite Gen in der Familie, welches bei allen untersuchten Spezies als nur ein Vertreter wie *CLCA1* vorhanden ist (**P2**). Auch die Proteinstruktur des Genproduktes scheint zwischen den Spezies identisch. Im Gegensatz zu *CLCA1* ist sie aber durch eine Transmembranomäne am carboxy-terminalen Teil gekennzeichnet. *CLCA2* wird hauptsächlich in Plattenepithelzellen der Haut beim Menschen und bei der Maus exprimiert (Braun *et al.*, 2010; Connon *et al.*, 2004). Dieses Expressionsmuster fand sich auch in den hier zugrundeliegenden Arbeiten bei Schwein (**P5**) und Katze (**P6**). Die offenbar identische Proteinstruktur und Expression in der Haut lassen zumindest in diesem Gewebe eine vergleichbare Funktion in den Spezies erwarten. Jedoch zeigte diese Arbeit deutliche Unterschiede in der Expression von *CLCA2* im Respirationstrakt, welches einen extremen Einfluss auf die Eignung der Spezies als Modell haben kann. In allen Spezies wurde *CLCA2* auf RNA-Ebene im Atmungstrakt nachgewiesen (**P5**, **P6**, **P8**). Jedoch konnte nur in den Spezies Mensch, Maus und Schwein (**P8**), aber nicht in der Katze (**P6**), die SMGs des Atmungstraktes als exprimierende Zelltypen bestimmt werden. Weiterhin wurde ausschließlich bei der Maus das Protein in respiratorischen Epithelzellen wie auch muzinproduzierenden Zellen an einer bestimmten Stelle der bronchialen Bifurkation gefunden (**P8**), nicht jedoch beim Menschen (**P8**), beim Schwein (**P8**) und bei der Katze (**P6**). Dieses soweit nur bei der Maus beobachtete Expressionsmuster könnte durchaus einen Einfluss auf die Ausprägung eines Phänotyps und damit den Nutzen der Spezies als Modell haben (siehe unten *Die Diversität der CLCA-Familie im Respirationstrakt hat wahrscheinlich Konsequenzen für die Wahl eines geeigneten Tiermodells für menschliche Erkrankungen.*).

CLCA3 und CLCA4 weisen eine hohe evolutionäre Dynamik mit speziesspezifischen abweichenden Expressionsmustern im Atmungstrakt auf.

Im Gegensatz zu *CLCA1* und *CLCA2* zeigt das *CLCA3*-Gen im Genom der einzelnen Spezies eine starke Variabilität: während es beim Menschen (Gruber and Pauli, 1999) und beim Schwein (**P1**) als abgeschaltetes Pseudogen ohne funktionelle Bedeutung des Genprodukts vorliegt, fand sich bei der Katze ein offenbar funktioneller Vertreter dieses Gens (**P2**). Bei der Maus wurde es sogar mehrfach dupliziert, so dass insgesamt drei Homologe im Genom vorhanden sind, die alle ein funktionelles Genprodukt zu haben scheinen (Patel *et al.*, 2009). Das feline *CLCA3* wurde in muzinproduzierenden SMGs des Atmungstraktes sowie vereinzelt in respiratorischen Epithelzellen in dieser Arbeit gefunden (**P2**). Bei der Maus sind ihre *CLCA3* Vertreter auch in diesen Zelltypen beschrieben worden (Gruber *et al.*, 1998b). Weiterhin war ein *CLCA3*-Homolog der Maus in glatten Muskelzellen des Atmungstraktes nachgewiesen worden (Elble *et al.*, 2002). Die unterschiedliche Anzahl an *CLCA3*-Homologen und der unterschiedliche Funktionsstatus sprechen somit für eine hohe Speziesdiversität, die sich auch in der Expression im Atmungstrakt widerspiegelt. Im Hinblick auf *CLCA3* ist das Schwein dem Menschen am ähnlichsten, wohingegen durch die Expression von ein oder sogar mehreren *CLCA3*-Homologen bei Katze und Maus wahrscheinlich ein erheblicher Einfluss auf den Phänotyp vorstellbar ist.

Neben *CLCA3* wies diese Arbeit auch *CLCA4* als äußerst dynamisches Gen nach (**P2**). Mensch und Katze besitzen jeweils nur einen Vertreter, während diese Gene beim Schwein mit zwei Homologen und bei der Maus sogar mit drei Homologen dupliziert vorliegen. Eine Expression von *CLCA4* im Respirationstrakt wurde im Gegensatz zum Menschen bei der Katze nicht gefunden (**P6**). Auch wurde keine Expression von *CLCA4*-Vertretern bei der Maus im Atmungstrakt beschrieben (Bothe *et al.*, 2008), während beim Schwein nur ein *CLCA4*-Homolog in respiratorischen Epithelzellen nachgewiesen wurde (**P3**, **P4**). Wie *CLCA3* ist *CLCA4* durch eine hohe Diversität zwischen den Spezies gekennzeichnet. Obwohl die Katze wie der Mensch nur einen *CLCA4*-Vertreter aufweist, ist das Schwein im Hinblick auf die Expression im Atmungstrakt dem Menschen ähnlicher.

Die entdeckten Mutationen im *CLCA4b*-Gen in einem Teil der Schweinepopulation mit fehlender Proteinexpression scheint ebenfalls Ausdruck der hohen evolutionären Dynamik in diesem *CLCA*-Cluster mit bei anderen Tierarten nicht beobachtetem Effekt zu sein (**P4**). Welche evolutionären Kräfte zu der Abschaltung dieses Gens beim Schwein führten und mit welchem biologischen Nutzen und eventuell sogar Vorteil, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Diversität der CLCA-Familie im Respirationstrakt hat wahrscheinlich Konsequenzen für die Wahl eines geeigneten Tiermodells für menschliche Erkrankungen.

Somit ist keine der untersuchten Spezies im Hinblick auf das *CLCA*-Genom mit einer anderen identisch und die einzelnen Mitglieder des *CLCA*-Familie unterliegen einer unterschiedlichen evolutionären Dynamik. Dies hat einen erheblichen Einfluss auf die Expression innerhalb des Atmungstraktes der einzelnen *CLCA*-Mitglieder mit einer möglichen überlappenden und durchaus vorstellbaren, redundanten Funktion in den einzelnen Spezies. Eine überlappende Funktion der verschiedenen *CLCA*-Mitglieder ist denkbar, da neben der Expression im gleichen Gewebe zahlreiche funktionelle Strukturelemente wie die n-*CLCA* Domäne oder die vWA Domäne in allen *CLCA*-Vertretern, wie schon beim Menschen und bei der Maus gezeigt (Patel *et al.*, 2009), konserviert sind. Die funktionelle Bedeutung der n-*CLCA* Domäne für eine Aktivierung einer Chloridleitfähigkeit (Yurtsever *et al.*, 2012) bzw. der vWA Domäne für die Interaktion mit Makrophagen konnte *in vitro* gezeigt werden (Keith *et al.*, 2019). Experimentell konnte auch nachgewiesen werden, dass *CLCA2* wie *CLCA1* eine Mukuszellmetaplasie bei der Maus induzieren kann (Patel *et al.*, 2006). Somit kann möglicherweise *CLCA2* bei der Maus durch seine Expression in bronchialen Epithelzellen, einschließlich muzinproduzierenden Zellen im Gegensatz zu den anderen Spezies (**P8**), die Funktion von *CLCA1* im Atmungstrakt übernehmen, und die Maus als Modelltier für die Erforschung zumindest dieser Funktion einschränken.

Aber auch die Expression von *CLCA3*-Homologen kann zu einem ähnlichen Szenario führen. Dies muss insbesondere bei gentechnischen Strategien wie der Generierung von KO-Tieren berücksichtigt werden bzw. bei der Interpretation der Daten, die in solchen Modellen generiert werden. Solche Unterschiede müssen auch bei Vergleichen, die den Einfluss von *CLCA*-Proteinen auf spontan auftretende Erkrankungen wie dem felines Asthma und dem humanen Asthma untersuchen, berücksichtigt werden. Bei beiden Entitäten wird *CLCA1* zwar massiv im Mukus der Atemwege gefunden (**P6**, (Gibson *et al.*, 2005). Jedoch muss weiterhin die Expression von *CLCA3* bzw. die fehlende Expression von *CLCA4* in den Atemwegen der Katze im Vergleich zum Menschen bei der Interpretation von Ergebnissen und der Übertragbarkeit auf den Menschen beachtet werden.

Sowohl auf Genomebene wie auf Expressionsebene im Atmungstrakt zeigt zusammenfassend das Schwein die meisten Gemeinsamkeiten mit dem Menschen, so dass diese Spezies zunächst als das beste Modell erscheint. Einzig die Duplikation vom *CLCA4*-Gen unterscheidet das Schwein vom Menschen (**P1**). Bei gesunden Tieren wird zwar wie beim Menschen nur einer

der beiden *CLCA4*-Vertreter im Atmungstrakt exprimiert (**P3**, **P4**), aber gleichwohl kann eine *de novo* Proteinexpression des anderen *CLCA4*-Mitglieds unter stimulierten Bedingungen wie in pathologisch veränderten Atemwegen nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte einen Einfluss auf den Phänotyp und die Vergleichbarkeit mit dem Menschen haben. Zwar haben Katze und Mensch als einzige hier untersuchte Spezies die gleiche Anzahl an *CLCA*-Genen, jedoch stellen die Expression des *CLCA3*-Gens bzw. die fehlende Expression des *CLCA4*-Gens in den Atemwegen der Katze bedeutsame Unterschiede zum Menschen dar und könnten einen erheblichen Einfluss auf den Wert dieses Tiermodells haben. Die Maus weist mit Abstand die meisten Unterschiede in der *CLCA*-Familie zum Menschen auf. Diese Unterschiede könnten für die fehlende Reproduzierbarkeit einiger gezeigter *CLCA*-Funktionen beim Menschen bei der Maus verantwortlich sein (siehe auch *Die Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch CLCA1 kann im Gegensatz zu anderen postulierten Funktionen im Mausmodell untersucht werden.*).

Die Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch CLCA1 kann im Gegensatz zu anderen postulierten Funktionen im Mausmodell untersucht werden.

In der Literatur sind mehrere Ansätze beschrieben, welche Funktion *CLCA1* im Atmungstrakt übernehmen könnte. Die Stimulation von Alveolarmakrophagen durch *CLCA1 in vitro* mit nachfolgender Modulation der Zytokinexpression zeigte hier in der Maus (**P13**) deutliche Parallelen zum Menschen (Ching *et al.*, 2013). Diese Zytokinmodulation mit Beeinflussung der Extravasation von neutrophilen Granulozyten konnte ebenfalls *in vivo* im *CLCA1*-KO-Modell bestätigt werden (**P12**).

Des Weiteren kann *CLCA1 in vitro* sowohl beim Menschen als auch bei der Maus eine Kalzium-aktivierbare Chloridleitfähigkeit induzieren (Gruber *et al.*, 1998a; Hamann *et al.*, 2009; Winpenny *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte im *CLCA1*-KO-Modell eine Modulation dieser Leitfähigkeit jedoch nicht bestätigt werden (**P9**). Somit ist dieses Mausmodell für die Untersuchung dieser Funktion ungeeignet. Auch die postulierte Funktion der Mukuszellformation war *in vivo* im *CLCA1*-KO-Modell nicht nachweisbar (**P7**). Eine überlappende Funktion anderer *CLCA*-Mitglieder in der Maus, wie oben beschrieben, könnte hierfür verantwortlich sein und den Nutzen des Modells Maus für diese Funktionen erheblich einschränken.

Erstaunlicherweise scheint das Tiermodell Maus trotz der offensichtlichen Unterschiede zum Menschen geeignet zu sein, zumindest in Ansätzen die Funktion der Modulation der Zytokin-

expression in den Atemwegen zu untersuchen. Somit können auch Tierarten mit großen Differenzen zum Menschen wie die Maus für Teilaspekte der CLCA-Forschung durchaus als Modell ihren Nutzen bei der Erforschung der CLCA-Familie haben, solange Unterschiede bekannt und berücksichtigt sind. Eine pauschale Ablehnung eines Modells aufgrund von offensichtlichen Speziesunterschieden in der CLCA-Familie ist daher nicht möglich.

Die evolutionäre Dynamik in der CLCA-Familie erlaubt Spekulationen über ihre Funktion.

Unterschiede in der Anzahl der Gene einer Familie sowie in der Expression und in der Funktionalität zwischen den Spezies sind insbesondere bei Molekülen bekannt, die eine immunologische Rolle spielen (Mestas and Hughes, 2004). Verschiedene Spezies haben sich in unterschiedlichen Umgebungen entwickelt und sich mit unterschiedlichen Erregern und Antigenen auseinandergesetzt. Dieser starke und variable evolutionäre Druck führt verständlicherweise zu einem anderen Repertoire an immunologischen Faktoren. Zum Beispiel weisen Defensine als Teil des angeborenen Immunsystems nennenswerte Unterschiede zwischen Mensch und Maus auf. Die neutrophilen Granulozyten des Menschen wie auch zum Beispiel des Kaninchens oder der Ratte, aber nicht die der Maus exprimieren α -Defensine (Eisenhauer and Lehrer, 1992; Mestas and Hughes, 2004; Risso, 2000). Paneth-Zellen der Krypten des Dünndarms exprimieren beim Menschen nur zwei unterschiedliche Defensine, während bei der Maus über 20 gefunden wurden (Mestas and Hughes, 2004; Ouellette and Selsted, 1996). Auffallende Gemeinsamkeiten finden sich auch zwischen der CLCA-Familie und der Familie der *bactericidal/permeability-increasing fold-containing* (BPIF)-Proteinen. Wie bei der CLCA-Familie liegen bei Mensch und Maus mit 11 bzw. 14 Genen eine unterschiedliche Anzahl von Mitgliedern vor, welche aber in jeder Spezies in einem konservierten Genlocus lokalisiert sind (Bingle *et al.*, 2011a; Bingle *et al.*, 2004). BPIFA4 fehlt bei der Maus, während es bei Primaten, der Katze und bei Rindern nachgewiesen wurde (Bingle *et al.*, 2011b). Beim Menschen finden sich aber Mutationen in dem Gen, die zu vorzeitigen Stopcodone ohne Bildung eines funktionellen Proteins führen. Mitglieder wie BPIFA2E, -5 und -6 werden nur bei Nagern exprimiert (Bingle *et al.*, 2011b). Auch werden die BPIF-Proteine unter anderem im Respirationstrakt exprimiert und scheinen eine Rolle bei der angeborenen Immunität zu spielen (Bingle and Bingle, 2011). Die auffallenden Gemeinsamkeiten in den Speziesunterschieden zwischen der CLCA-Familie und bekannten Proteinen der angeborenen Immunität lassen Spekulationen zu, dass die CLCA-Pro-

teine auch eine ähnliche Funktion haben könnten (**P13**). Diese Annahme konnte durch experimentelle Daten der Aktivierung von Makrophagen durch CLCA1 beim Menschen (Ching *et al.*, 2013; Keith *et al.*, 2019) und in dieser Studie auch bei der Maus bestätigt werden (**P12**, **P13**). Weitere Untersuchungen müssen diese Spekulationen überprüfen.

6. Ausblick

Da Erkrankungen oder andere Stimuli der Atemwege die Expression der Gene verändern können, müssen die *CLCA*-Proteine auch unter solchen Bedingungen speziesübergreifend untersucht und miteinander verglichen werden. Folgende Fragen sollten anschließend an diese Arbeit beantwortet werden: Wie verändert sich das Expressionsprofil der *CLCA*-Gene in den Krankheitsmodellen? Welche Gemeinsamkeiten und welche Unterschiede treten im Vergleich zum Menschen zu Tage? Welchen Einfluss könnte ein verändertes Expressionsprofil auf den Phänotyp im jeweiligen Modell haben? Welche Auswirkungen hätte dies für die Translation der Ergebnisse auf den Menschen? Und ist sogar die Prüfung therapeutischer Ansätze denkbar?

Im Hinblick auf ein mögliches überlappendes Funktionsmuster und daraus resultierende kompensatorische Effekte der *CLCA*-Mitglieder, müssen die Funktionen der einzelnen homologen Vertreter miteinander verglichen werden. Aktivieren andere *CLCA* Mitglieder, die in den Atemwegen exprimiert werden, in ähnlicher Weise wie *CLCA1* Makrophagen? Oder vermitteln sie andere Funktionen, die für die *CLCA*-Familie diskutiert werden?

Neben der Makrophagenaktivierung ist die Induktion einer Mukuszellmetaplasie eine postulierte Funktion von *CLCA1* mit besonderer Bedeutung für die Lungenerkrankungen mit Dyskrinie. Da von den untersuchten Spezies das Schwein dem Menschen im Hinblick auf die *CLCA*-Familie und ihrer Expression im Atmungstrakt am ähnlichsten ist, sollte künftig in diesem Modell *in vivo* untersucht werden, ob *CLCA1*, wie für den Menschen postuliert, eine entscheidende Rolle bei der Mukuszelltransformation in den Atemwegen spielt. Dies kann in einem porzinen *CLCA1*-KO-Modell belegt werden. Sollte eine identische Funktion im Schweinmodell reproduziert werden, kann das Modell für die Testung von Therapeutika, die in eine mögliche *CLCA1* vermittelte Becherzellmetaplasie eingreifen, genutzt werden.

Neben der Erforschung der *CLCA*-Familie im Modell für den Menschen sollte die Bedeutung von *CLCA1* bei spontan auftretenden Erkrankungen, die für die Tiermedizin relevant sind, näher ergründet werden. So sollte geklärt werden, ob genetische Variationen im *CLCA1*-Gen einen Einfluss auf den Phänotyp des felinen Asthmas haben, und ob *CLCA1* als Biomarker oder sogar therapeutisches Ziel bei felinem Asthma oder anderen Tierkrankheiten wie der RAO der Pferde genutzt werden kann.

7. Zusammenfassung

Diversität der *CLCA*-Genfamilie zwischen ausgewählten Säugerspezies und Auswirkungen auf die Wahl eines Tiermodells

Dr. Lars Mundhenk

Tiermodelle sind bei der Aufklärung von Krankheiten sowie der Entwicklung von Therapien ein oft noch unerlässlicher Teil biomedizinischer Forschung, sowohl zum Wohl von Menschen, als auch von Tieren. Jedoch ist eine Übertragbarkeit tier-basierter Ergebnisse auf den Menschen sowie auch von einer Tierart auf die andere oft nur eingeschränkt möglich, vor allem aufgrund spezies-spezifischer genetischer Unterschiede. Die Evolution hat eine komplexe Diversität zwischen den Arten hervorgebracht, die auch einen maßgeblichen Einfluss auf den möglichen Nutzen eines Tiermodells für spezifische Fragestellungen beim Menschen nehmen kann. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Spezies wurden traditionell durch die vergleichende Pathologie als eine Teildisziplin der Tierpathologie auf makroskopischer und histologischer Ebene analysiert und bewertet. Diese Ebenen können in der postgenomischen Ära mit der zunehmenden Entschlüsselung der Genome zahlreicher Spezies und der Molekularisierung der Pathologie wesentlich ergänzt werden. Neue, umfassende genetische und molekulare Analyse-möglichkeiten erlauben es, im Vorfeld Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Spezies zu identifizieren und für die jeweilige Fragestellung abzuwägen, was wesentlich zur Auswahl eines möglichst passenden Modelltiers beiträgt. Unterschiede lassen sich zwar so nicht vollständig ausräumen, jedoch besser vorhersagen und verstehen. Dies trägt im Sinne des 3R (Replace, Reduce, Refine; engl. für ersetzen, reduzieren, verbessern) -Prinzips auch dazu bei, eine frühzeitige Auswahl des bestgeeigneten Modells zu treffen.

In dieser Habilitationsschrift, die auf 13 Einzelzeitschriftenbeiträgen basiert, erfolgte eine beispielhafte, tierartenübergreifende Charakterisierung der *CLCA*-Genfamilie, welche unter anderem eine wichtige Rolle bei chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma und Mukoviszidose zu spielen scheint. Ihre Diversität wurde in den ausgewählten Spezies Maus, Schwein, Katze und Mensch auf genomischer und molekularer Ebene untersucht und zwischen diesen verglichen. Das Ziel der Arbeit bestand darin, tierartige Unterschiede aufzuklären, die für eine Übertragung von Erkenntnissen zwischen den Arten relevant sein könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf vielfach überraschende Weise, dass die Maus als das am häufigsten genutzte Modelltier die größten Unterschiede zum Menschen aufweist im Hin-

blick auf Anzahl, Expressionsmuster und viele andere versuchsentscheidende Aspekte der analysierten Gene im Atmungstrakt. Dagegen zeigte das Schwein die größten Übereinstimmungen mit dem Menschen, wenn auch nicht in allen Aspekten. So zeigte das Schwein als einzige der hier untersuchten Spezies eine Duplikatur des *CLCA4*-Gens mit zwei separaten Genprodukten. Zusätzlich zu den genomischen Analysen und den molekularen Expressionsdaten wurde das CLCA1-Protein, welches innerhalb der Familie die wichtigste Modulatorrolle bei Atemwegserkrankungen einzunehmen scheint, funktionell bei der Maus untersucht und mit bekannten Funktionen beim Menschen verglichen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Maus ungeeignet ist, die mutmaßliche Funktion von CLCA1 als Aktivator einer Chloridleitfähigkeit, bei der Mukuszellformation oder als struktureller Bestandteil des Mukus beim Menschen zu modellieren. Einzig die Funktion von CLCA1 im Rahmen der unspezifischen Immunität könnte anscheinend in der Maus abgebildet werden.

Die Arbeit konnte somit in zahlreichen Details zeigen, dass erst das Schwein, dann die Katze und erst danach die Maus viele Aspekte der *CLCA*-Genfamilie im Menschen spiegelt. Die Ergebnisse werden dazu beitragen, bei Modellstudien für Atemwegserkrankungen die Unterschiede zwischen den Arten besser zu verstehen und bei Anwendung zu respektieren.

8. Summary

Interspecies Diversity of the *CLCA* Gene Family and its Effects on the Choice of an Animal Model

Dr. Lars Mundhenk

Animal models are still indispensable in elucidating the pathogenesis of diseases and in the development of new therapeutic approaches, both for the benefits of humans and animals. However, the translatability of results from animal models to humans or other species is often limited, mainly due to species-specific, genetic differences. Evolution has promoted a complex diversity between species, which can also have an impact on the possible relevance of an animal model for specific questions in humans. Similarities and differences between species have traditionally been analyzed and evaluated at a macroscopic and histological level in comparative pathology as a sub-discipline of veterinary pathology. In the post-genomic era, these levels can be supplemented and augmented in value by decoding genomes of numerous species and by the molecularization of pathology. State of the art comprehensive genetic as well as molecular analyses enable the identification of similarities and differences between species in advance and to balance them for the respective scientific question. This can also contribute significantly to the selection of the most suitable model. Although species-specific differences cannot be entirely eliminated, they can, however, be predicted more precisely and understood more comprehensively. In accordance with the 3R (Replace, Reduce, Refine) principle, this also allows for the selection of the most suitable model at an early stage.

In this habilitation thesis, based on 13 contributions to peer reviewed journals, the *CLCA* gene family, which seems to play an important role in chronic respiratory diseases such as asthma and cystic fibrosis, was exemplarily characterized in different species. Their diversity was investigated and compared at genomic and molecular levels in the species mouse, pig, cat, and human. This work aimed at elucidating species-specific differences possibly relevant in translating findings between species.

Surprisingly, the results show that the mouse, as the most commonly used animal model, differs most from humans – in terms of number of *CLCA* homologs, expression patterns, and many other experimentally critical aspects of the genes analyzed in the respiratory tract. In contrast, pigs showed the greatest similarities to humans, albeit not in all aspects. For example, it was the only species showing a duplication of the *CLCA4* gene with two separate gene products. In addition to genomic analyses and molecular expression data, the *CLCA1* protein, which appears

to play the most important modulator role in respiratory diseases within the *CLCA* family, was functionally investigated in mice and compared to known functions in humans. The results confirm that the mouse is not suitable in modeling the function of *CLCA1* as an activator of chloride conductivity, in mucus cell formation, or as a structural component of the mucus in humans. Solely the function of *CLCA1* in non-specific immunity may be modeled in mice.

This work demonstrates in numerous details that primarily the pig, then the cat and lastly the mouse mirror many aspects of the *CLCA* gene family in humans. These results will facilitate a more in-depth understanding of and adherence to species-specific differences in the implementation of respiratory model studies.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tierartvergleichende Betrachtung des <i>CLCA</i> -Genoms	27
Tabelle 2: Tierartvergleichende Betrachtung der <i>CLCA</i> -Proteine	29
Tabelle 3: Tierartvergleichende Betrachtung der <i>CLCA</i> -Expression im Respirationstrakt	32
Tabelle 4: Postulierte Funktionen von <i>CLCA1</i> und deren Darstellbarkeit beim Mensch und bei der Maus	35

10. Literatur

- Agnel, M., Vermat, T. and Culouscou, J. M. (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.
- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A. and Wolf, E. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, **88**, 653-664.
- Aitken, M. L. (1995). Cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, **1**, 425-434.
- Al-Jumaily, M., Kozlenkov, A., Mechaly, I., Fichard, A., Matha, V., Scamps, F., Valmier, J. and Carroll, P. (2007). Expression of three distinct families of calcium-activated chloride channel genes in the mouse dorsal root ganglion. *Neurosci Bull*, **23**, 293-299.
- Alevy, Y. G., Patel, A. C., Romero, A. G., Patel, D. A., Tucker, J., Roswit, W. T., Miller, C. A., Heier, R. F., Byers, D. E., Brett, T. J. and Holtzman, M. J. (2012). IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. *J Clin Invest*, **122**, 4555-4568.
- Aun, M. V., Bonamichi-Santos, R., Arantes-Costa, F. M., Kalil, J. and Giavina-Bianchi, P. (2017). Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy*, **10**, 293-301.
- Bingle, C. D., Bingle, L. and Craven, C. J. (2011a). Distant cousins: genomic and sequence diversity within the BPI fold-containing (BPIF)/PLUNC protein family. *Biochem Soc Trans*, **39**, 961-965.
- Bingle, C. D., LeClair, E. E., Havard, S., Bingle, L., Gillingham, P. and Craven, C. J. (2004). Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci*, **13**, 422-430.
- Bingle, C. D., Seal, R. L. and Craven, C. J. (2011b). Systematic nomenclature for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as a subfamily of the BPI fold-containing superfamily. *Biochem Soc Trans*, **39**, 977-983.
- Bingle, L. and Bingle, C. D. (2011). Distribution of human PLUNC/BPI fold-containing (BPIF) proteins. *Biochem Soc Trans*, **39**, 1023-1027.
- Bond, S., Leguillette, R., Richard, E. A., Couetil, L., Lavoie, J. P., Martin, J. G. and Pirie, R. S. (2018). Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med*, **32**, 2088-2098.

- Bonilla, E., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L. M., Hoffman, E. P. and Rowland, L. P. (1988). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, **54**, 447-452.
- Bothe, M. K., Braun, J., Mundhenk, L. and Gruber, A. D. (2008). Murine mCLCA6 is an integral apical membrane protein of non-goblet cell enterocytes and co-localizes with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Histochem Cytochem*, **56**, 495-509.
- Braun, J., Bothe, M. K., Mundhenk, L., Beck, C. L. and Gruber, A. D. (2010). Murine mCLCA5 is expressed in granular layer keratinocytes of stratified epithelia. *Histochem Cell Biol*, **133**, 285-299.
- Ching, J. C., Lobanova, L. and Loewen, M. E. (2013). Secreted hCLCA1 is a signaling molecule that activates airway macrophages. *PLoS One*, **8**, e83130.
- Clarke, L. L., Grubb, B. R., Yankaskas, J. R., Cotton, C. U., McKenzie, A. and Boucher, R. C. (1994). Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in Cftr(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 479-483.
- Connon, C. J., Yamasaki, K., Kawasaki, S., Quantock, A. J., Koizumi, N. and Kinoshita, S. (2004). Calcium-activated chloride channel-2 in human epithelia. *J Histochem Cytochem*, **52**, 415-418.
- Cunningham, S. A., Awayda, M. S., Bubien, J. K., Ismailov, II, Arrate, M. P., Berdiev, B. K., Benos, D. J. and Fuller, C. M. (1995). Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem*, **270**, 31016-31026.
- Dharmage, S. C., Perret, J. L. and Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr*, **7**, 246.
- Diaz-Guzman, E. and Mannino, D. M. (2014). Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, **35**, 7-16.
- Eisenhauer, P. B. and Lehrer, R. I. (1992). Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun*, **60**, 3446-3447.
- Elble, R. C., Ji, G., Nehrke, K., DeBiasio, J., Kingsley, P. D., Kotlikoff, M. I. and Pauli, B. U. (2002). Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J Biol Chem*, **277**, 18586-18591.
- Elble, R. C., Walia, V., Cheng, H. C., Connon, C. J., Mundhenk, L., Gruber, A. D. and Pauli, B. U. (2006). The putative chloride channel hCLCA2 has a single C-terminal transmembrane segment. *J Biol Chem*, **281**, 29448-29454.

- Elble, R. C., Widom, J., Gruber, A. D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H. C. and Pauli, B. U. (1997). Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J Biol Chem*, **272**, 27853-27861.
- Evans, S. R., Thoreson, W. B. and Beck, C. L. (2004). Molecular and functional analyses of two new calcium-activated chloride channel family members from mouse eye and intestine. *J Biol Chem*, **279**, 41792-41800.
- Gaschen, F. P., Hoffman, E. P., Gorospe, J. R., Uhl, E. W., Senior, D. F., Cardinet, G. H., 3rd and Pearce, L. K. (1992). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci*, **110**, 149-159.
- Gaspar, K. J., Racette, K. J., Gordon, J. R., Loewen, M. E. and Forsyth, G. W. (2000). Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. *Physiol Genomics*, **3**, 101-111.
- Gentsch, M. and Mall, M. A. (2018). Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest*, **154**, 383-393.
- Ghorani, V., Boskabady, M. H., Khazdair, M. R. and Kianmeher, M. (2017). Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis*, **15**, 25.
- Gibson, A., Lewis, A. P., Affleck, K., Aitken, A. J., Meldrum, E. and Thompson, N. (2005). hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J Biol Chem*, **280**, 27205-27212.
- Gray, M. A., Winpenny, J. P., Verdon, B., McAlroy, H. and Argent, B. E. (1995). Chloride channels and cystic fibrosis of the pancreas. *Biosci Rep*, **15**, 531-541.
- Gruber, A. D., Elble, R. C., Ji, H. L., Schreur, K. D., Fuller, C. M. and Pauli, B. U. (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**, 200-214.
- Gruber, A. D., Fuller, C. M., Elble, R. C., Benos, D. J. and Pauli, B. U. (2000). The CLCA Gene Family: A Novel Family of Putative Chloride Channels. *Current Genomics*, **1**, 201 -2222.
- Gruber, A. D., Gandhi, R. and Pauli, B. U. (1998b). The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochem Cell Biol*, **110**, 43-49.

- Gruber, A. D. and Pauli, B. U. (1999). Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Biochim Biophys Acta*, **1444**, 418-423.
- Hamann, M., Gibson, A., Davies, N., Jowett, A., Walhin, J. P., Partington, L., Affleck, K., Trezise, D. and Main, M. (2009). Human ClCa1 modulates anionic conduction of calcium-dependent chloride currents. *J Physiol*, **587**, 2255-2274.
- Hauber, H. P., Bergeron, C., Tscopoulos, A., Wallaert, B., Olivenstein, R., Holroyd, K. J., Levitt, R. C. and Hamid, Q. (2005). Increased expression of the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in airways of patients with obstructive chronic bronchitis. *Can Respir J*, **12**, 143-146.
- Hauber, H. P., Manoukian, J. J., Nguyen, L. H., Sobol, S. E., Levitt, R. C., Holroyd, K. J., McElvaney, N. G., Griffin, S. and Hamid, Q. (2003). Increased expression of interleukin-9, interleukin-9 receptor, and the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in the upper airways of patients with cystic fibrosis. *Laryngoscope*, **113**, 1037-1042.
- Hegab, A. E., Sakamoto, T., Uchida, Y., Nomura, A., Ishii, Y., Morishima, Y., Mochizuki, M., Kimura, T., Saitoh, W., Massoud, H. H., Massoud, H. M., Hassanein, K. M. and Sekizawa, K. (2004). CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet*, **41**, e27.
- Holgate, S. T. (2008). Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*, **38**, 872-897.
- Horrobin, D. F. (2003). Modern biomedical research: an internally self-consistent universe with little contact with medical reality? *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 151-154.
- Hoshino, M., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Nagi, T., Nakanishi, A., Ashida, Y., Nishimura, O., Fujisawa, Y. and Fujino, M. (2002). Increased expression of the human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*, **165**, 1132-1136.
- Kamada, F., Suzuki, Y., Shao, C., Tamari, M., Hasegawa, K., Hirota, T., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X. Q., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Chiba, Y., Aoki, Y., Kure, S., Tamura, G., Shirakawa, T. and Matsubara, Y. (2004). Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun*, **5**, 540-547.
- Keith, B. A., Ching, J. C. H. and Loewen, M. E. (2019). Von Willebrand Factor Type A domain of hCLCA1 is sufficient for U-937 macrophage activation. *Biochem Biophys Rep*, **18**, 100630.

- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H., Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M. C. and Wolf, E. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet*, **22**, 4368-4382.
- Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M. C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., Richter, A., Kessler, B., Kurome, M., Eddicks, M., Nagashima, H., Heinritzi, K., Gruber, A. D. and Wolf, E. (2012). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)*, **90**, 597-608.
- Kolbe, E. W., Tamm, S., Hedtfeld, S., Becker, T., Tummler, B. and Stanke, F. (2013). CLCA4 variants determine the manifestation of the cystic fibrosis basic defect in the intestine. *Eur J Hum Genet*, **21**, 691-694.
- Leverkoehne, I. and Gruber, A. D. (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**, 829-838.
- Leverkoehne, I., Holle, H., Anton, F. and Gruber, A. D. (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**, 239-250.
- Leverkoehne, I., Horstmeier, B. A., von Samson-Himmelstjerna, G., Scholte, B. J. and Gruber, A. D. (2002). Real-time RT-PCR quantitation of mCLCA1 and mCLCA2 reveals differentially regulated expression in pre- and postnatal murine tissues. *Histochem Cell Biol*, **118**, 11-17.
- Loewen, M. E., Bekar, L. K., Gabriel, S. E., Walz, W. and Forsyth, G. W. (2002a). pCLCA1 becomes a cAMP-dependent chloride conductance mediator in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**, 531-536.
- Loewen, M. E., Bekar, L. K., Walz, W., Forsyth, G. W. and Gabriel, S. E. (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., Gabriel, S. E. and Forsyth, G. W. (2002b). The calcium-dependent chloride conductance mediator pCLCA1. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C412-421.

- Makalowski, W., Zhang, J. and Boguski, M. S. (1996). Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequences. *Genome Res*, **6**, 846-857.
- Mall, M., Gonska, T., Thomas, J., Schreiber, R., Seydewitz, H. H., Kuehr, J., Brandis, M. and Kunzelmann, K. (2003). Modulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ secretion by basolateral K⁺ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res*, **53**, 608-618.
- Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K. and Boucher, R. C. (2004). Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nature Medicine*, **10**, 487-493.
- Martinez, M. N. (2011). Factors influencing the use and interpretation of animal models in the development of parenteral drug delivery systems. *AAPS J*, **13**, 632-649.
- McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A. and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*, **8**, 195-213.
- Mestas, J. and Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, **172**, 2731-2738.
- Meyerholz, D. K., Stoltz, D. A., Namati, E., Ramachandran, S., Pezzulo, A. A., Smith, A. R., Rector, M. V., Suter, M. J., Kao, S., McLennan, G., Tearney, G. J., Zabner, J., McCray, P. B., Jr. and Welsh, M. J. (2010a). Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am J Respir Crit Care Med*, **182**, 1251-1261.
- Meyerholz, D. K., Stoltz, D. A., Pezzulo, A. A. and Welsh, M. J. (2010b). Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis. *Am J Pathol*, **176**, 1377-1389.
- Mundhenk, L., Alfalah, M., Elble, R. C., Pauli, B. U., Naim, H. Y. and Gruber, A. D. (2006). Both cleavage products of the mCLCA3 protein are secreted soluble proteins. *J Biol Chem*, **281**, 30072-30080.
- Nakanishi, A., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Ashida, Y., Shirafuji, H., Fujisawa, Y., Nishimura, O. and Fujino, M. (2001). Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5175-5180.
- Norris Reinero, C. R., Decile, K. C., Berghaus, R. D., Williams, K. J., Leutenegger, C. M., Walby, W. F., Schelegle, E. S., Hyde, D. M. and Gershwin, L. J. (2004). An

- experimental model of allergic asthma in cats sensitized to house dust mite or bermuda grass allergen. *Int Arch Allergy Immunol*, **135**, 117-131.
- Nystrom, E. E. L., Birchenough, G. M. H., van der Post, S., Arike, L., Gruber, A. D., Hansson, G. C. and Johansson, M. E. V. (2018). Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine*.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monroe, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B. and Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*, **32**, 56-67.
- Ostedgaard, L. S., Meyerholz, D. K., Chen, J. H., Pezzulo, A. A., Karp, P. H., Rokhlina, T., Ernst, S. E., Hanfland, R. A., Reznikov, L. R., Ludwig, P. S., Rogan, M. P., Davis, G. J., Dohrn, C. L., Wohlford-Lenane, C., Taft, P. J., Rector, M. V., Hornick, E., Nassar, B. S., Samuel, M., Zhang, Y., Richter, S. S., Uc, A., Shilyansky, J., Prather, R. S., McCray, P. B., Jr., Zabner, J., Welsh, M. J. and Stoltz, D. A. (2011). The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci Transl Med*, **3**, 74ra24.
- Ouellette, A. J. and Selsted, M. E. (1996). Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J*, **10**, 1280-1289.
- Palmer, L. J., Celedon, J. C., Chapman, H. A., Speizer, F. E., Weiss, S. T. and Silverman, E. K. (2003). Genome-wide linkage analysis of bronchodilator responsiveness and post-bronchodilator spirometric phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet*, **12**, 1199-1210.
- Patel, A. C., Brett, T. J. and Holtzman, M. J. (2009). The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu Rev Physiol*, **71**, 425-449.
- Patel, A. C., Morton, J. D., Kim, E. Y., Alevy, Y., Swanson, S., Tucker, J., Huang, G., Agapov, E., Phillips, T. E., Fuentes, M. E., Iglesias, A., Aud, D., Allard, J. D., Dabbagh, K., Peltz, G. and Holtzman, M. J. (2006). Genetic segregation of airway disease traits despite redundancy of calcium-activated chloride channel family members. *Physiol Genomics*, **25**, 502-513.
- Pawlowski, K., Lepisto, M., Meinander, N., Sivars, U., Varga, M. and Wieslander, E. (2006). Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels. *Proteins*, **63**, 424-439.

- Reinero, C. R. (2011). Advances in the understanding of pathogenesis, and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Vet J*, **190**, 28-33.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-1073.
- Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol*, **68**, 785-792.
- Ritzka, M., Stanke, F., Jansen, S., Gruber, A. D., Pusch, L., Woelfl, S., Veeze, H. J., Halley, D. J. and Tummler, B. (2004). The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. *Hum Genet*, **115**, 483-491.
- Rodriguez-Pineiro, A. M., Bergstrom, J. H., Ermund, A., Gustafsson, J. K., Schutte, A., Johansson, M. E. and Hansson, G. C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **305**, G348-356.
- Rogers, C. S., Abraham, W. M., Brogden, K. A., Engelhardt, J. F., Fisher, J. T., McCray, P. B., Jr., McLennan, G., Meyerholz, D. K., Namati, E., Ostedgaard, L. S., Prather, R. S., Sabater, J. R., Stoltz, D. A., Zabner, J. and Welsh, M. J. (2008a). The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **295**, L240-263.
- Rogers, C. S., Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Ostedgaard, L. S., Rokhlina, T., Taft, P. J., Rogan, M. P., Pezzulo, A. A., Karp, P. H., Itani, O. A., Kabel, A. C., Wohlford-Lenane, C. L., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Smith, T. L., Samuel, M., Wax, D., Murphy, C. N., Rieke, A., Whitworth, K., Uc, A., Starner, T. D., Brogden, K. A., Shilyansky, J., McCray, P. B., Jr., Zabner, J., Prather, R. S. and Welsh, M. J. (2008b). Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, **321**, 1837-1841.
- Rosenberg, H. F. and Druey, K. M. (2018). Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead. *J Leukoc Biol*, **104**, 41-48.
- Roussa, E., Wittschen, P., Wolff, N. A., Torchalski, B., Gruber, A. D. and Thevenod, F. (2010). Cellular distribution and subcellular localization of mCLCA1/2 in murine gastrointestinal epithelia. *J Histochem Cytochem*, **58**, 653-668.

- Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Nichols, C. G. and Brett, T. J. (2015). Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca(2+)-dependent chloride currents in human cells. *Elife*, **4**.
- Scholte, B. J., Davidson, D. J., Wilke, M. and De Jonge, H. R. (2004). Animal models of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, **3 Suppl 2**, 183-190.
- Semaniakou, A., Croll, R. P. and Chappe, V. (2018). Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*, **9**, 1475.
- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C. C., Lopez, C. M., Honari, S., Moore, E. E., Minei, J. P., Cuschieri, J., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Jeschke, M. G., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Brownstein, B. H., Miller-Graziano, C., Calvano, S. E., Mason, P. H., Cobb, J. P., Rahme, L. G., Lowry, S. F., Maier, R. V., Moldawer, L. L., Herndon, D. N., Davis, R. W., Xiao, W., Tompkins, R. G., Inflammation and Host Response to Injury, L. S. C. R. P. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 3507-3512.
- Shanks, N., Greek, R. and Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med*, **4**, 2.
- Shibly, S., Klang, A., Galler, A., Schwendenwein, I., Christian, M., Guija, A., Tichy, A. and Hirt, R. A. (2014). Architecture and inflammatory cell composition of the feline lung with special consideration of eosinophil counts. *J Comp Pathol*, **150**, 408-415.
- Silverman, E. K., Palmer, L. J., Mosley, J. D., Barth, M., Senter, J. M., Brown, A., Drazen, J. M., Kwiatkowski, D. J., Chapman, H. A., Campbell, E. J., Province, M. A., Rao, D. C., Reilly, J. J., Ginns, L. C., Speizer, F. E. and Weiss, S. T. (2002). Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet*, **70**, 1229-1239.
- Song, L., Liu, D., Wu, C., Wu, S., Yang, J., Ren, F. and Li, Y. (2013). Antibody to mCLCA3 suppresses symptoms in a mouse model of asthma. *PLoS One*, **8**, e82367.
- Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Pezzulo, A. A., Ramachandran, S., Rogan, M. P., Davis, G. J., Hanfland, R. A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C. L., Bartlett, J. A., Nelson, G. A. t., Chang, E. H., Taft, P. J., Ludwig, P. S., Estin, M., Hornick, E. E., Launspach, J. L., Samuel, M., Rokhlina, T., Karp, P. H., Ostedgaard, L. S., Uc, A., Starner, T. D., Horswill, A. R., Brogden, K. A., Prather, R. S., Richter, S. S., Shilyansky, J., McCray,

- P. B., Jr., Zabner, J. and Welsh, M. J. (2010). Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med*, **2**, 29ra31.
- Toda, M., Tulic, M. K., Levitt, R. C. and Hamid, Q. (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**, 246-250.
- Tuggle, K. L., Birket, S. E., Cui, X., Hong, J., Warren, J., Reid, L., Chambers, A., Ji, D., Gamber, K., Chu, K. K., Tearney, G., Tang, L. P., Fortenberry, J. A., Du, M., Cadillac, J. M., Bedwell, D. M., Rowe, S. M., Sorscher, E. J. and Fanucchi, M. V. (2014). Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-knockout rats. *PLoS One*, **9**, e91253.
- Tummler, B. and Kiewitz, C. (1999). Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today*, **5**, 351-358.
- Uhl, E. W. and Warner, N. J. (2015). Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep*, **3**, 219-223.
- Wall, R. J. and Shani, M. (2008). Are animal models as good as we think? *Theriogenology*, **69**, 2-9.
- Wang, K., Feng, Y. L., Wen, F. Q., Chen, X. R., Ou, X. M., Xu, D., Yang, J. and Deng, Z. P. (2007a). Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 is correlated with mucus overproduction in the airways of Chinese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)*, **120**, 1051-1057.
- Wang, K., Wen, F. Q., Feng, Y. L., Ou, X. M., Xu, D., Yang, J. and Deng, Z. P. (2007b). Increased expression of human calcium-activated chloride channel 1 gene is correlated with mucus overproduction in Chinese asthmatic airway. *Cell Biol Int*, **31**, 1388-1395.
- Williams, K. and Roman, J. (2016). Studying human respiratory disease in animals--role of induced and naturally occurring models. *J Pathol*, **238**, 220-232.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, **282**, 2258-2261.
- Winpenny, J. P., Lavery, W. L., Watson, N. and Chazot, P. L. (2002). Biochemical and electrophysiological characterisation of the GOB5 (mCLCA3) chloride ion channel protein after expression in HEK293 cells. *Journal of Physiology-London*, **539**, 2p-2p.
- Yurtsever, Z., Sala-Rabanal, M., Randolph, D. T., Scheaffer, S. M., Roswit, W. T., Alevy, Y. G., Patel, A. C., Heier, R. F., Romero, A. G., Nichols, C. G., Holtzman, M. J. and Brett, T. J. (2012). Self-cleavage of human CLCA1 protein by a novel internal

- metalloprotease domain controls calcium-activated chloride channel activation. *J Biol Chem*, **287**, 42138-42149.
- Zhou-Suckow, Z., Duerr, J., Hagner, M., Agrawal, R. and Mall, M. A. (2017). Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res*, **367**, 537-550.
- Zhou, Y., Dong, Q., Louahed, J., Dragwa, C., Savio, D., Huang, M., Weiss, C., Tomer, Y., McLane, M. P., Nicolaides, N. C. and Levitt, R. C. (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**, 486-491.

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., Leiter des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, danke ich für die langjährige, uneingeschränkte Unterstützung, die Motivation, das Lob, die Kritik, das Vertrauen und die Freiheiten, die diese und meine weiteren Arbeiten erst ermöglichten.

Allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die stets konstruktive, vertrauensvolle, professionelle und respektvolle Zusammenarbeit. Ich möchte hier insbesondere Stephanie Plog, Ph.D., Melanie Bothe, Ph.D., Kristina Dietert, Ph.D., Nancy Ann Erickson, Ph.D., Jana Enders, Monika Schärig, Nicole Huth und Simon Dökel nennen, die maßgeblich zum Erfolg der jahrelangen Arbeit an der CLCA-Genfamilie beigetragen haben. Die wertvollen Diskussionen und zwischenmenschlichen Gespräche werde ich immer mit Freude in Erinnerung behalten.

Allen, auch den ehemaligen Mitarbeitenden des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, möchte ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Möglichkeit des flexiblen Arbeitens danken. Es hat mir stets den Rücken freigehalten.

Weiterhin danke ich allen nationalen und internationalen Kooperationspartnern, die ihre Expertisen in die CLCA-Forschung einbrachten. Dazu gehören Malin Johannsson, Ph.D. aus der *Mucin Biology Group* von Professor Dr. Gunnar Hansson, Gothenburg - Schweden, Professor Dr. Wallace B. Thoreson, Nebraska - USA, und Dr. Rainer Glauben, Berlin. Der interdisziplinäre Austausch beflügelt die Freude an der Wissenschaft und belebt das Denken über Grenzen hinaus. Insbesondere möchte ich Professor Dr. Nikolai Klymiuk, München, erwähnen, der wichtige Impulse setzte. Ich hoffe, dass wir weiterhin diskutieren und erfolgreich zusammen Projekte bearbeiten werden.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeiten mit ermöglicht haben (MU 3015/1-1).

Mein besonderer Dank gilt Christiane Bonk und meinen Kindern Johan, Ewa und Isa, die mir immer den nötigen Rückhalt, die Liebe, den Zuspruch und den Mut gegeben haben, meine Arbeit zu dieser Schrift zusammenzufassen.