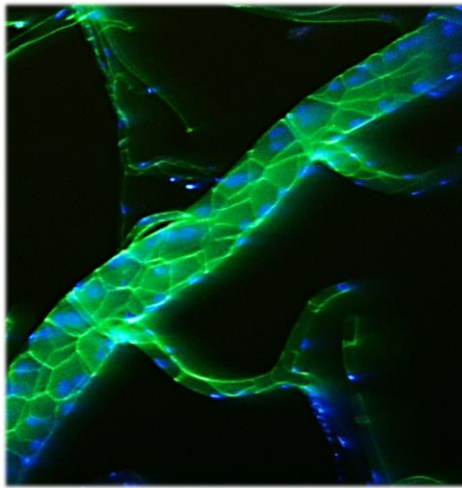


**Die funktionelle Relevanz
zweier Asthma-assoziiierter Serpine
in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster***



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Hanna Angstmann

Borstel, November 2019

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Holger Heine

Tag der mündlichen Prüfung:

15.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung.....	12
1.1 <i>Asthma bronchiale</i>	12
1.1.1 Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Pathogenese von <i>Asthma bronchiale</i>	12
1.1.2 Genetische Risikofaktoren.....	13
1.2 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>.....	16
1.2.1 Struktur der larvalen Atemwege	17
1.2.2 Entwicklung der larvalen Atemwegsverzweigungen.....	19
1.2.3 Serinproteaseinhibitoren in <i>Drosophila melanogaster</i>	23
1.2.4 Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem.....	25
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.2 Geräte	31
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.4 Kits	32
2.1.5 Enzyme.....	32
2.1.6 Primer	33
2.2 Puffer und Medien	35
2.2.1 Puffer	35
2.2.2 Fliegenstandardmedium.....	35

2.2.3	Grapefruit-Agar-Platten.....	35
2.3	Programme	36
2.4	<i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.4.1	<i>Drosophila</i> -Stämme	36
2.4.2	Aufzucht und Haltung der Fliegen	37
2.4.3	Kreuzungen der Treiber- und Effektor-Linien.....	37
2.4.4	Auswahl orthologer Gene in <i>Drosophila melanogaster</i> mittels <i>Flybase</i> und NCBI-BLAST	38
2.5	Präparation larvaler Tracheen	38
2.6	Isolierung der Gesamt-RNA.....	39
2.6.1	Isolierung der RNA aus ganzen Larven	39
2.6.2	Isolierung der RNA aus präparierten Tracheen	39
2.6.3	Konzentrationsbestimmung am Nanophotometer	39
2.7	cDNA-Synthese.....	40
2.8	Quantitative <i>Realtime</i>-PCR	41
2.9	Ansetzen zeitlich synchronisierter Fliegen.....	43
2.10	Hypoxieexposition.....	44
2.11	Rauchexposition.....	45
2.11.1	Rauchmaschine.....	45
2.11.2	Durchführung.....	46
2.12	Vermeidungsverhalten	47
2.13	Überlebensrate	47
2.14	Entwicklungszeit.....	48
2.15	Lebensdauer.....	48
2.16	Morphologie larvaler Tracheen	49
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Serinproteaseinhibitoren in <i>Drosophila melanogaster</i>	51

3.1.1	<i>Drosophila</i> -Gene <i>spn43Aa</i> und <i>CG14933</i> werden als Orthologe der humanen Serpingene SERPINB3 und SPINK5 ausgewählt	51
3.1.2	Die Expression der Serpingene <i>spn43Aa</i> und <i>CG14933</i> lässt sich mit Hilfe transgener Fliegenlinien in larvalen Atemwegen effektiv regulieren	53
3.2	Charakterisierung des Fliegenmodells zum Serpingen <i>spn43Aa</i>	56
3.2.1	Larven mit erhöhter Expression von <i>spn43Aa</i> in den Atemwegen bilden mehr sekundäre Atemwegsäste aus	56
3.2.2	Die Überlebensrate von Larven mit erhöhter <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen ist reduziert	58
3.2.3	Larven und Puppen mit modifizierter Expression von <i>spn43Aa</i> in den Atemwegen benötigen mehr Zeit für ihre Entwicklung	59
3.2.4	Imagines mit reduzierter <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen sterben früher	61
3.3	Charakterisierung des Fliegenmodells zum Serpingen <i>CG14933</i>	62
3.3.1	Larven mit modulierter <i>CG14933</i> -Expression bilden zusätzliche sekundäre Atemwegsäste aus	62
3.3.2	Die Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch eine veränderte Expression von <i>CG14933</i> nicht beeinträchtigt	64
3.3.3	Larven und Puppen mit erhöhter <i>CG14933</i> -Expression benötigen für ihre Entwicklung mehr Zeit	65
3.3.4	Imagines mit erhöhter Expression von <i>CG1933</i> in den Atemwegen sterben früher	66
3.4	Einfluss einer veränderten <i>spn43Aa</i>-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von <i>Drosophila melanogaster</i> nach Hypoxieexposition	68
3.4.1	Hypoxische Bedingungen reduzieren das Expressionslevel von <i>spn43Aa</i> in den larvalen Atemwegen	68
3.4.2	Modulation der <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen verstärkt das larvale Vermeidungsverhalten unter hypoxischen Bedingungen	69

3.4.3	Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch Hypoxieexposition nicht beeinflusst	71
3.4.4	Hypoxie verzögert die Entwicklung von Tieren mit einer reduzierten Expression von <i>spn43Aa</i> in den Atemwegen.....	72
3.4.5	Fliegen mit einer veränderten <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen leben nach einer Hypoxieexposition länger	74
3.5	Einfluss einer veränderten <i>CG14933</i>-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von <i>Drosophila melanogaster</i> nach Hypoxieexposition	75
3.5.1	Hypoxische Bedingungen induzieren ein erhöhtes <i>CG14933</i> -Expressionlevel in larvalen Atemwegen.....	76
3.5.2	Larven mit einer modifizierten Expression von <i>CG14933</i> in den Atemwegen reagieren mit einem verstärkten Vermeidungsverhalten auf hypoxische Bedingungen.....	77
3.5.3	Hypoxieexposition hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Larven und Puppen.....	79
3.5.4	Die Entwicklung von <i>Drosophila</i> ist unabhängig vom genetischen Hintergrund nach Hypoxieexposition verzögert	81
3.5.5	Die Lebenszeit von <i>Drosophila</i> -Imagines wird nicht durch die Hypoxieexposition beeinflusst	82
3.6	Einfluss einer veränderten Expression des Serpingens <i>spn43Aa</i> in den Atemwegen auf die Fitness von <i>Drosophila melanogaster</i> nach wiederholter Zigarettenrauchexposition.....	84
3.6.1	Die Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst	84
3.6.2	Zigarettenrauch verzögert die Entwicklung von Larven und Puppen unabhängig vom <i>spn43Aa</i> -Expressionslevel	86
3.6.3	Imagines mit einer modulierten <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen sterben durch Zigarettenrauch früher.....	87
4	Diskussion	89

4.1	Charakterisierung der fehlregulierten Expression des Serpins <i>spn43Aa</i> in den Atemwegen.....	90
4.1.1	Einfluss einer modifizierten <i>spn43Aa</i> -Expression auf die Tracheenmorphologie von <i>Drosophila melanogaster</i>	92
4.1.2	Einfluss einer veränderten <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen auf die Fitness von <i>Drosophila melanogaster</i>	95
4.2	Charakterisierung der fehlregulierten Expression des Serpins <i>CG14933</i> in den Atemwegen.....	106
4.2.1	Einfluss einer modifizierten <i>CG14933</i> -Expression auf die Tracheenmorphologie von <i>Drosophila melanogaster</i>	107
4.2.2	Einfluss einer veränderten <i>CG14933</i> -Expression in den Atemwegen auf die Fitness von <i>Drosophila melanogaster</i>	110
5	Zusammenfassung.....	116
6	Summary.....	118
7	Literatur.....	120
	Anhang.....	133
	Erklärung.....	136
	Danksagung.....	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Atemwegssystem der <i>Drosophila</i> -Larve.	18
Abb. 1.2: Morphogenese der embryonalen Tracheen in <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Abb. 1.3: Signalkaskaden der embryonalen und larvalen Atemwegsentwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Abb. 1.4: Serpine als Regulatoren der Immunantwort und Embryonalentwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Abb. 1.5: Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem von <i>Drosophila melanogaster</i> nach Brand und Perrimon.	26
Abb. 2.1: Darstellung des CP-Wertes.	42
Abb. 2.2: SICCO Mini 1 Exsikkator der Firma Bohlender GmbH.	44
Abb. 2.3: InExpose-Rauchmaschine der Firma SCIREQ®.	45
Abb. 2.4: Röhrchen für Rauchexposition.	46
Abb. 2.5: Röhrchen für Überlebensversuche.	48
Abb. 3.1: Expressionslevel ausgewählter Orthologe des humanen Serpingens SERPINB3 in <i>Drosophila melanogaster</i>	52
Abb. 3.2: Expressionslevel ausgewählter Orthologe des humanen Serpingens SPINK5 in <i>Drosophila melanogaster</i>	53
Abb. 3.3: Nachweis der reduzierten Expression (KD) und Überexpression (ÜE) von <i>spn43Aa</i> in isolierten Tracheen der jeweiligen Modelllinien.	54
Abb. 3.4: Nachweis der reduzierten Expression (KD) und Überexpression (ÜE) von <i>CG14933</i> in isolierten Tracheen der jeweiligen Modelllinien.	55
Abb. 3.5: Durchlichtmikroskopische Darstellung der sekundären Äste des dritten thorakalen Segments in Larven des 1. und 3. Stadiums mit modulierter <i>spn43Aa</i> -Expression.	56
Abb. 3.6: Morphologie sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit veränderter <i>spn43Aa</i> -Expression.	57
Abb. 3.7: Überlebensrate von <i>Drosophila</i> mit modifizierter <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen.	58
Abb. 3.8: Einfluss einer atemwegsspezifischen Modulation der <i>spn43Aa</i> -Expression auf die Entwicklungsdauer von <i>Drosophila</i>	60

Abb. 3.9: Überlebensdauer von <i>Drosophila</i> -Imagines mit modifizierter <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen.	61
Abb. 3.10: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen sekundärer Äste des dritten thorakalen Segments in Larven des 1. und 3. Stadiums mit veränderter <i>CG14933</i> -Expression.	62
Abb. 3.11: Morphologie sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit modulierter <i>CG14933</i> -Expression.	63
Abb. 3.12: Überlebensrate von <i>Drosophila</i> mit veränderter <i>CG14933</i> -Expression in den Atemwegen.	64
Abb. 3.13: Einfluss einer modulierten <i>CG14933</i> -Expression in den Atemwegen auf die Entwicklungsdauer von <i>Drosophila</i>	65
Abb. 3.14: Überlebensdauer von <i>Drosophila</i> -Imagines mit modifizierter <i>CG14933</i> -Expression in den Atemwegen.	66
Abb. 3.15: <i>Spn43Aa</i> -Expression in isolierten larvalen Tracheen nach Hypoxieexposition.	68
Abb. 3.16: Einfluss einer veränderten <i>spn43Aa</i> -Expression auf das Larvenverhalten unter hypoxischen Bedingungen.	70
Abb. 3.17 Überlebensrate von <i>Drosophila</i> mit veränderter <i>spn43Aa</i> -Expression in den Atemwegen nach akuter Hypoxieexposition (5 % O ₂ , 2h).	71
Abb. 3.18: Einfluss einer Hypoxieexposition (5 % O ₂ , 2h) auf die Entwicklungsdauer von <i>Drosophila</i> mit modulierter <i>spn43Aa</i> -Expression.	73
Abb. 3.19: Lebensdauer von <i>Drosophila</i> -Imagines mit veränderter <i>spn43Aa</i> -Expression nach Hypoxieexposition (5 % O ₂ , 2h).	75
Abb. 3.20: <i>CG14933</i> -Expression in isolierten larvalen Tracheen nach Hypoxieexposition.	76
Abb. 3.21: Einfluss der modulierten <i>CG14933</i> -Expression auf das Larvenverhalten während einer akuten Hypoxieexposition.	78
Abb. 3.22: Überlebensrate von <i>Drosophila</i> mit veränderter <i>CG14933</i> -Expression nach Hypoxieexposition (5 % O ₂ , 2h).	80
Abb. 3.23: Einfluss einer Hypoxie (5 % O ₂) bzw. Normoxieexposition (ca. 21 % O ₂) auf die Entwicklungsdauer von <i>Drosophila</i> mit veränderter <i>CG14933</i> -Expression.	81
Abb. 3.24: Lebensdauer von <i>Drosophila</i> -Imagines mit veränderter <i>CG14933</i> -Expression nach Hypoxieexposition (5 % O ₂ , 2h)	83
Abb. 3.25: Einfluss einer wiederholten Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h) auf die Überlebensrate von <i>Drosophila</i>	85

Abb. 3.26: Entwicklungsdauer von <i>Drosophila</i> nach wiederholter Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h).....	86
Abb. 3.27: Lebenszeit von <i>Drosophila</i> -Imagines nach wiederholter Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h).....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien und Hersteller	30
Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Hersteller	31
Tabelle 2.3: Chemikalien und Hersteller	32
Tabelle 2.4: Molekularbiologische Kits und Hersteller	32
Tabelle 2.5: Enzyme und Hersteller	32
Tabelle 2.6: Verwendete Primer	34
Tabelle 2.7: Verwendete Puffer	35
Tabelle 2.8: Verwendete Programme	36
Tabelle 2.9: Verwendete <i>Drosophila</i> -Stämme	37
Tabelle 2.10: Reaktionsansatz cDNA Synthese I	41
Tabelle 2.11: Reaktionsansatz cDNA Synthese II	41
Tabelle 2.12: Mastermix zum Einsatz in die qRT-PCR.	42
Tabelle 2.13: Reaktionsprogramm der qRT-PCR	43
Tabelle 3.1: Anzahl sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit reduzierter (<i>spn43Aa</i> -KD) oder erhöhter (<i>spn43Aa</i> -ÜE) <i>spn43Aa</i> -Expression	57
Tabelle 3.2: Anzahl sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit reduzierter (<i>CG14933</i> -KD) oder erhöhter (<i>CG14933</i> -ÜE) <i>CG14933</i> -Expression	63

Abkürzungsverzeichnis

Abb	-	Abbildung
Acp76A	-	<i>Accessory gland protein 76A</i>
ANOVA	-	<i>Analysis of Variance</i>
BLAST	-	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bnl	-	Branchless
Bp	-	Basenpaar
Btl	-	Breathless
cDNA	-	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CG	-	<i>computed gene</i>
CT	-	<i>cycle threshold</i>
DNA	-	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	-	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>et al.</i>	-	<i>et alii/et altera</i>
FoxO	-	Forkhead-Box-Protein O
g	-	<i>gravity</i> (Gravitation)
GFP	-	<i>green fluorescent protein</i>
h	-	<i>hour</i> (Stunde(n))
HCl	-	Salzsäure
HIF	-	<i>hypoxia inducible factor</i>
IgE	-	Immunglobulin E
IMD	-	<i>Immune deficiency</i>
KCl	-	Kaliumchlorid
KD	-	<i>Knockdown</i>
KH ₂ PO ₄	-	Kaliumdihydrogenphosphat
L1-Larven	-	Larven des ersten Stadiums
L3-Larven	-	Larven des dritten Stadiums
LEKTI	-	<i>Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor</i>
MW	-	Mittelwert
Na ₂ HPO	-	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	-	Natriumchlorid

NCBI	-	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nrf2	-	<i>NF-E2-related factor 2</i>
ORF	-	<i>open reading frame</i>
PAR	-	<i>protease activated receptor</i>
PBS	-	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Ppk4	-	Pickpocket 4
qRT-PCR	-	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RNA	-	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	-	<i>RNA interference</i>
ROS	-	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
Rpl32	-	<i>Ribosomal protein L32</i>
rpm	-	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	-	Reverse Transkriptase
SCCA1	-	<i>squamous carcinoma related antigen 1</i>
SEM	-	<i>standard error of the mean</i>
SERPINB3	-	<i>Serpin Family B Member 3</i>
shRNA	-	<i>small hairpin RNA</i>
SPINK5	-	<i>serine peptidase inhibitor kazal type 5</i>
Src	-	Sarcoma Onkogen 42A
Trh	-	trachealess
U	-	<i>Units</i> (Einheiten)
UAS	-	<i>upstream activating sequence</i>
ÜE	-	Überexpression
VALIUM	-	Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS

1 Einleitung

1.1 *Asthma bronchiale*

"Da bleibt mir glatt die Luft weg" ist für etwa 8 Millionen Patienten in Deutschland mit der Diagnose *Asthma bronchiale* nicht nur ein Spruch, sondern eine Herausforderung des alltäglichen Lebens.

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, welche in industriellen Ländern wie Deutschland nicht nur eine sehr hohe Prävalenz aufzeigt, sondern deren Inzidenz auch immer weiter zunimmt. Im Jahr 2016 lag die Anzahl der diagnostizierten Fälle bei 5,73 %. Von 2009 (4,3 %) bis 2016 (5,73 %) war damit eine deutliche Zunahme bei Erwachsenen zu beobachten [1].

Was bedeutet es, wenn der Arzt die Diagnose *Asthma bronchiale* stellt? Für die Betroffenen heißt dies, eine chronische Erkrankung zu haben, mit der man sich im alltäglichen Leben arrangieren muss. Bei Erkrankten reagieren die Atemwege hyperreagibel auf äußere Reize. Es kommt zu einer chronischen Entzündungsreaktion, vermehrter Sekretion von Mukus, Verkrampfung der Bronchialmuskulatur und einer Schwellung der Bronchialschleimhaut [2]. Dies führt zu einer akuten Verengung der Atemwege, der sogenannten Bronchialobstruktion. Ausgelöst durch eine Konfrontation mit Allergenen und Reizstoffen, Infektionen der Atemwege, physische Anstrengung oder die Inhalation kalter Luft kommt es zu anfallsartiger Atemnot. Vor allem die Ausatmung ist erschwert und wird oft von pfeifenden Atemgeräuschen, dem Giemen, begleitet.

1.1.1 Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Pathogenese von *Asthma bronchiale*

Bei dieser fehlgeleiteten Entzündungsreaktion auf Umweltreize, spielt das Atemwegsepithel eine zentrale Rolle. Das Epithel in unseren Atemwegen ist die Schnittstelle zwischen der Umwelt, inhalierten Schadstoffen und unserem Organismus. Bei gesunden Individuen bildet es eine, außer für Gase, nahezu undurchlässige physikalische und auch chemische Barriere [3]. Ist diese Barrierefunktion gestört, können gewebeschädigende und infektiöse Partikel in das Gewebe eindringen. Als Reaktion auf Verletzungen oder eindringende Pathogene scheiden respiratorische Epithelzellen zahlreiche Botenstoffe aus, die unter anderem Entzündungszellen rekrutieren und aktivieren. Zusätzlich reguliert es die Mukusproduktion, wodurch inhalierte Reizstoffe abgefangen und abtransportiert werden. Das Atemwegsepithel

stellt allerdings nicht nur eine wichtige Schutzbarriere gegen asthmaauslösende Risikofaktoren dar, es ist auch entscheidend an der Pathogenese von Asthma beteiligt.

Die Literatur liefert zahlreiche Hinweise darauf, dass die Barriereintegrität, Reparaturmechanismen sowie die Immunreaktion im Atemwegsepithel von Asthmatikern beeinträchtigt ist [3–5]. Bei *Asthma bronchiale* sind diese strukturellen Veränderungen und verminderte Barriereintegrität des Atemwegsepithels unter anderem die Folge einer Ablösung der Epithelzellen von der Basalmembran. Ausgelöst wird dieser Prozess durch einen dauerhaften Kontakt mit äußeren Reizstoffen und der damit verbundenen Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren verschiedener Immunzellen. Zusätzlich ist die Barrierefunktion des Epithels häufig durch fehlerhafte interzelluläre Verbindungen beeinträchtigt, was die Anfälligkeit für Umweltschäden erhöht [3]. Durch die anhaltenden Entzündungsreaktion in den Atemwegen kommt es zur Schädigung und Verdickung der subepithelialen Basallamina sowie zu einer Schwellung und Verdickung der Atemwegsmuskulatur [3, 4]. Des Weiteren bilden sich vermehrt mukusproduzierende Becherzellen, wodurch überschüssiger Mukus freigesetzt wird, der die peripheren Atemwege zusätzlich blockiert [6].

1.1.2 Genetische Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren für Asthma gehören neben der Belastung durch Umweltreize, wie Allergene, Tabakrauch und Infektionen auch genetische Faktoren [7, 8]. In einer Reihe von epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer genetischen Prädisposition untersucht, wodurch einige Gene mit einem asthmatischen Phänotyp in Verbindung gebracht werden konnten. Eines der inzwischen am besten untersuchten Asthmasuszeptibilitätsgene ist SMAD3, das einen Transkriptionsfaktor kodiert. Es wirkt proinflammatorisch und ist an der Entstehung einer erhöhten Atemwegsreagibilität beteiligt [9, 10]. Auch ADAM33 wird als Suszeptibilitätsgen für die Entwicklung von Asthma eingestuft. Es wird in Zellen des bronchialen Muskelgewebes exprimiert und ist vermutlich ebenfalls an der Ausbildung einer Hyperreagibilität der Atemwege beteiligt [11–13]. Ein weiterer vielversprechender Kandidat ist ORMDL3. ORMDL3 ist ein Transmembranprotein, das sowohl am Umbau des Atemwegsepithels beteiligt ist, wodurch es wesentlich zur Barriereintegrität beiträgt, als auch durch seine Rolle in der Steuerung von Entzündungsprozessen ebenfalls eine Anfälligkeit für Asthma begünstigt [14–16].

Zu diesen genetischen Risikofaktoren für Asthma reihen sich auch Gene, die Serinproteaseinhibitoren (Serpine) kodieren. Analysen von Gewebeproben asthmatischer Patienten haben überdurchschnittlich häufige Mutationen dieser Gene aufgedeckt [12, 13, 17]. Darüber hinaus ist die Genexpression von Serpinen in bronchialen Epithelzellen von Erkrankten stark erhöht [18, 19]. Was sind Serpine und auf welche Weise können sie zu der Entwicklung von *Asthma bronchiale* beitragen?

In erster Linie hemmen Serpine natürlich Serinproteasen. Letztere können exogenen Ursprungs sein, zum Beispiel von Allergenen oder Mikroorganismen stammen, oder endogener Herkunft wie beispielsweise Elastasen oder Trypsasen. Endogene Serinproteasen haben bakterizide Eigenschaften und dienen so als direkte Abwehr gegen eindringende Krankheitserreger. Darüber hinaus sind sie über ihre Bindung an proteaseaktivierte Rezeptoren (PAR), welche die Membran von Epithelzellen durchspannen, an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt. Durch die Aktivierung des Rezeptors erhöhen die Epithelzellen die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren und induzieren dadurch verschiedene Signalwege der Immunantwort [20–22]. Zusätzlich sind Serinproteasen auch am Umbau des Atemwegsepithels sowie der Apoptose von Epithelzellen beteiligt und lösen epitheliale Zell-Zell-Verbindungen auf [20, 23].

Serpine hemmen Serinproteasen über einen irreversiblen Mechanismus. Dadurch inhibieren sie die proteaseinduzierte Immunantwort ebenso wie Umbauprozesse des Atemwegsepithels. Ein anhaltendes Ungleichgewicht zwischen Serinproteasen und den entsprechenden Inhibitoren in den Atemwegen kann zu chronischen Entzündungen, Hyperreaktivität der Atemwege und erhöhter Apoptose von Epithelzellen führen [24]. Vergleicht man die morphologischen und physiologischen Vorgänge in den Atemwegen eines Asthmapatienten mit den Funktionen, die von Serpinen gesteuert werden, ergeben sich einige Übereinstimmungen. Und tatsächlich wurde gezeigt, dass Träger von Mutationen in den Gensequenzen der Serpine SERPINB3 und SPINK5 ein erhöhtes Risiko besitzen, Asthma zu entwickeln [17, 18, 25].

SERPINB3 (oder SCCA1, *Squamous cell carcinoma antigen-1*) wurde ursprünglich als Marker für Gebärmutterhalskrebs beschrieben [26, 27] und wird allgemein in epithelialen Krebszellen stark exprimiert [28]. Spätere Publikationen zeigen darüber hinaus, dass SERPINB3 auch mit einer Asthmaerkrankung in Zusammenhang steht. Nicht nur ist das systemische Level von SERPINB3 bei Asthmapatienten erhöht, was sich während einer akuten Exazerbation sogar

noch verstärkt, auch in den bronchialen Epithelzellen von Asthmapatienten wurde eine erhöhte Expression dieses Serpins nachgewiesen [18, 19, 24].

Bei SERPINB3 handelt es sich um ein inhibitorisch-aktives Serpin [29, 30], das in den Atemwegsepithelzellen von der Luftröhre bis hin zu den Bronchiolen exprimiert wird [28, 31]. SERPINB3 stellt einen wichtigen Faktor für den Erhalt der epithelialen Barrierefunktion dar und ist in der Lage, die Barriereintegrität zu beeinflussen [32]. Mäuse, in den ein asthmaähnlicher Zustand induziert wurde, zeigten, dass eine erhöhte Expression von SERPINB3 zur Hyperreagibilität und zu einer erhöhten Mukusproduktion beiträgt [33]. Die Wege, wie das Serpin genau zur Entwicklung der Krankheit *Asthma bronchiale* beiträgt oder die Anfälligkeit für die Erkrankung fördert, sind bisher allerdings ungeklärt.

Neben SERPINB3 wird ein weiteres Gen aus der Gruppe der Serpine mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, Asthma zu entwickeln, assoziiert. Erste krankheitsrelevante Beschreibungen des SPINK5-Gens (Serin-Protease-Inhibitor Kazal Typ 5) brachten es mit dem Netherton-Syndrom in Verbindung [34], einer seltenen Form der Dermatitis, welche häufig in Kombination mit atopischen Erkrankungen wie Asthma auftritt [17, 35].

Das SPINK5-Gen kodiert den Serinproteaseinhibitor LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*). Das Protein LEKTI inhibiert diverse Serinproteasen wie Cathepsin G, neutrophile Elastasen und Tryptasen [36]. Gerade Tryptasen sind als wichtige Asthamediatoren bekannt. Diese werden von Mastzellen freigesetzt und induzieren eine Vielzahl von Reaktionen durch die Aktivierung des Rezeptors PAR-2 [37], wodurch sie zur Verstärkung der Entzündungsreaktion beitragen. Da LEKTI eine Tryptase-inhibierende Aktivität hat, ist anzunehmen, dass im Umkehrschluss eine unzureichende Hemmung der Mastzell-Tryptase infolge einer verminderten LEKTI-Aktivität zum asthmatischen Phänotyp beiträgt. Die inhibitorische Wirkung des Serpins beschränkt sich allerdings nicht nur auf endogene Proteasen, sondern auch auf Proteasen eindringender Pathogene oder Allergene. Diese sind ebenfalls dazu in der Lage, transmembrane proteaseaktivierte Rezeptoren auf der Oberfläche von Epithelzellen zu aktivieren und so die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren zu induzieren [23]. Zusätzlich sind exogene Proteasen auch an der Apoptose von Epithelzellen beteiligt, lösen epitheliale Zell-Zell-Verbindungen und beeinträchtigen dadurch die Barriereintegrität des Epithels [20, 23]. Die Expression des Serpins schützt das Epithel vor den Proteasen der Allergene oder Pathogene und reduziert dadurch sowohl die Zerstörung der Barrierefunktion als auch die verursachte Entzündungsreaktion [38].

Beide Gene, SERPINB3 und SPINK5, nehmen somit essentielle Funktionen im Atemwegsepithel ein und stehen mit dem Erhalt der Barriereintegrität des Epithels, sowie erhöhter Reagibilität in Verbindung. Angesichts dessen liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei beiden Serpinen um potentielle Asthma-assoziierte Suszeptibilitätsgene handelt. Auf welche Weise sie zu einer erhöhten Anfälligkeit für *Asthma bronchiale* beitragen und die Pathogenese der Krankheit fördern, ist allerdings noch weitestgehend ungeklärt.

1.2 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Um die Funktion der Serpine im Atemwegsepithel zu charakterisieren, benötigt man einen Modellorganismus mit einer kurzen Generationsdauer und einem Atmungsapparat, der in seiner Morphologie einfach, aber vergleichbar zur humanen Lunge ist. Nicht zuletzt müssen die zu den zu untersuchenden Serpinen orthologen Gene im Genom vorhanden sein. Kein Tier erfüllt diese Kriterien besser als die kleine schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster*, die aufgrund ihrer Karriere als Labortier heute zu den bestuntersuchten Tieren zählt. Erstmals 1830 von dem Entomologen Johann Wilhelm Meigen beschrieben, begann sie bereits im Jahr 1901 ihre Laufbahn als Modellorganismus, als der Vererbungsforscher William Ernest Castle an ihr den Einfluss von Inzucht untersuchte. Wenig später gelang es Thomas Hunt Morgan mit Hilfe der Taufliege, die Rolle der Chromosomen für die Vererbung zu entschlüsseln, wofür er 1933 den Nobelpreis erhielt. Diente sie zunächst vorwiegend zur Untersuchung grundlegender Mechanismen der Genetik, kommt *Drosophila* heutzutage in nahezu allen Forschungsbereichen der Biologie, der Lebenswissenschaften, und sogar der Medizin als Modellorganismus zum Einsatz.

Neben den bereits genannten Vorteilen, wie dem kurzen nur etwas zehn Tage dauernden Generationszyklus oder einer hohen Reproduktionsrate, hat *Drosophila* weitere, einzigartige Vorzüge. Nicht zuletzt durch ihre langjährige Verwendung als Labortier bietet die Taufliege eine große Bandbreite an „genetischen Werkzeugen“, wie beispielsweise das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem (siehe Kapitel 1.2.3). Solche Expressionssysteme ermöglichen eine gezielte Manipulation des zu untersuchenden Zielgens in spezifischen Geweben, individuellen Organen oder während bestimmter Entwicklungsstadien der Fliege. Dadurch können die Funktionen von Genen selektiv untersucht werden. Trotz der offensichtlichen äußerlichen Unterschiede, die die Taufliege vom Menschen trennen, verbindet beide eine höchst konservierte genetische Ausstattung und Übereinstimmung grundlegender

zellbiologischer Mechanismen. Genomanalysen haben beispielsweise offengelegt, dass etwa 75 % aller bis heute bekannten krankheitsassoziierten humanen Gene als orthologe Gene im Genom der Fliege vorhanden sind [39, 40].

Die chronische Entzündungsreaktion in der Pathogenese von *Asthma bronchiale* ist ein Zusammenspiel von Komponenten der adaptiven und angeborenen Immunantwort und wird von Th2-Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen, sowie der Freisetzung von IgE und Zytokinen dominiert [41]. *Drosophila* besitzt kein adaptives Immunsystem, sondern ausschließlich eine angeborene Immunantwort [42]. In den Atemwegsepithelzellen wird diese primär durch den IMD-Signalweg (*immune deficiency*) vertreten [43]. Das bedeutet, dass in der Fliege die Merkmale der allergischen Reaktion in Asthma wie Immunglobuline, T-Lymphozyten oder Interleukine nicht vorkommen. Dieser Umstand ermöglicht es in *Drosophila* andere Aspekte der Asthma-Pathogenese, wie etwa die Rolle der angeborenen Immunantwort, Veränderungen der Atemwegsstruktur oder Remodellingprozesse des Atemwegsepithels, zu untersuchen, ohne den Einfluss der adaptiven Immunantwort oder infiltrierender Immunzellen berücksichtigen zu müssen.

Aufgrund all dieser Aspekte ist *Drosophila melanogaster* heute aus der Welt der Wissenschaft nicht mehr wegzudenken und hat auch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

1.2.1 Struktur der larvalen Atemwege

Das Atemwegsepithel stellt eine Schlüsselkomponente in der Pathogenese von Asthma dar, die mit strukturellen Veränderungen und einem Verlust der Barriereintegrität des respiratorischen Epithels einhergeht.

Die Atemwege von *Drosophila melanogaster*, die sogenannten Tracheen, sind als ein hohles Röhrensystem aufgebaut, das aus einem Chitingerüst, umgeben von einem einschichtigen Epithel, besteht [44]. Sowohl die Funktion, als auch die Entwicklung der Tracheen entspricht weitestgehend derjenigen der Säuger-Lungen. In beiden Systemen werden die wichtigsten molekularen Mechanismen der Organentwicklung durch konservierte Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden vermittelt.

Ob genetische Faktoren die Entwicklung und Morphologie der Atemwege beeinträchtigen und so die Suszeptibilität für *Asthma bronchiale* oder die Pathogenese der Erkrankung beeinflussen, kann folglich mit Hilfe der *Drosophila*-Larve in einem vereinfachten Modell untersucht werden.

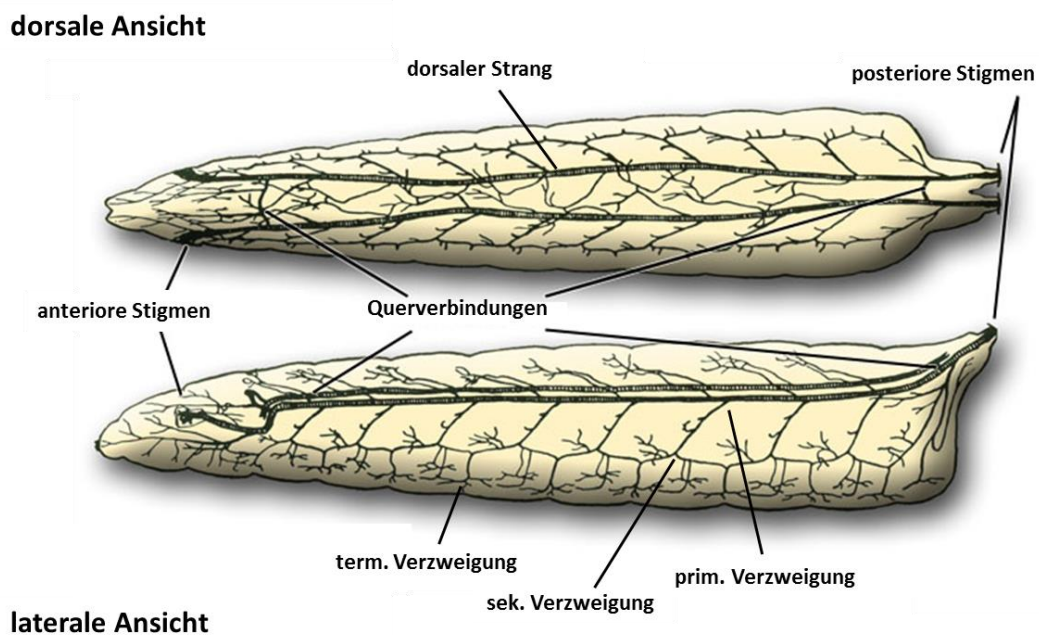


Abb. 1.1: Atemwegssystem der *Drosophila*-Larve. Im Larvenstadium besteht das Tracheensystem aus zwei dorsalen Strängen, die das Tier von kranial nach kaudal durchziehen. Sie weisen eine festgelegte Anzahl von primären Ästen auf, die sich wiederum in Sekundäre verzweigen und in dendritischen Terminalzellen enden. (nach [45])

Die Tracheen der Larve sind im dorsalen Drittel des Körpers lokalisiert und erstrecken sich vom anterioren bis zum posterioren Ende des Tieres in zwei parallel verlaufenden dorsalen Strängen (Abb. 1.1). An der posterioren Seite öffnen sich die dorsalen Stränge mit den paarig angelegten Stigmen zur Umwelt. Im späten Stadium der larvalen Entwicklung, bricht auf der anterioren Körperseite ein zweites Paar von Atemwegsöffnungen durch die äußere Kutikula. In jedem Körpersegment der Larve zweigen von den dorsalen Strängen jeweils zwei primäre Äste ab, ein innerer und ein äußerer. Die primären Äste verzweigen sich weiter in feine intersegmentale Äste. Die Bildung dieser Verzweigungen erfolgt während der Embryogenese nach einem determinierten genetischen Muster. Im Larvenstadium entstehen zusätzlich die terminalen Verzweigungen. Diese bilden sich aus den dendritischen Ausläufern einer einzelnen terminalen Zelle, die in Verbindung mit dem umliegenden Gewebe stehen und das Gewebe durch Diffusion mit Sauerstoff versorgen [46]. Die Anzahl dieser Äste wird durch den Sauerstoffbedarf der jeweiligen Gewebe bestimmt und ist variabel.

Die Aufnahme von Luft erfolgt je nach Entwicklungsstadium über eines oder zwei der vorliegenden Stigmenpaare. Der Luftaustausch zwischen Umwelt und Tracheenlumen erfolgt passiv durch Diffusion, unterstützt durch Muskelkontraktionen bei der Fortbewegung der

Larve [47]. Im Innern der Tracheen diffundiert der Sauerstoff entlang der primären und sekundären Äste, bis schließlich in die terminale Zelle, durch deren dendritischen Ausläufer er in das umgebende Gewebe gelangt [48, 49].

1.2.2 Entwicklung der larvalen Atemwegsverzweigungen

Das gesamte Tracheensystem entsteht während der Embryonalentwicklung aus zehn Paaren von Plakoden, die sich zwischen dem zweiten thorakalen und dem achten abdominalen Segment bilden. Dafür stülpt sich im Prozess der Invagination etwa fünf Stunden nach der Eiablage im elften Embryonalstadium ein Sack aus trachealen Vorläuferzellen aus dem Ektoderm, der mit dem Ektoderm über einen schmalen Steg verbunden bleibt [50]. Welche Zellen dabei zu den trachealen Vorläuferzellen werden, entscheidet die Expression des Transkriptionsfaktors *trachealess (trh)* [51]. In Stammzellen, die in der späteren Entwicklung zu Atemwegszellen differenzieren, aktiviert Trh den EGFR-Signalweg (*epidermal growth factor receptor*). Durch das EGFR-Signal wird der erste Schritt der Invagination eingeleitet. Die trachealen Vorläuferzellen gruppieren sich und setzen sich vom umgebenden Ektoderm ab [52, 53]. Parallel wird durch Trh auch die Expression des membranständigen Rezeptors *breathless (btl)* induziert. Zellen, die den trachealen Sack umgeben, sekretieren hingegen den Liganden Branchless (Bnl) [54]. Durch die Bindung von Bnl an den Btl-Rezeptor auf den trachealen Vorläuferzellen beginnen diese mit der Migration, entfernen sich weiter vom Ektoderm und bilden so den trachealen Sack [52, 53].

An jeder dieser Zellknospen entstehen anschließend sechs primäre Verzweigungen. Dieser Vorgang wird wiederum durch den Branchless/Breathless-Signalweg induziert. In Zellen, die sich zu Verzweigungen differenzieren (*tips cells*), aktivieren die Transkriptionsfaktoren Trachealess und Ventral veinless (Vvl) die Expression des Rezeptors *breathless* [55, 56]. Kurz vor Beginn der Trachealverzweigung exprimieren sechs Gruppen von epidermalen Zellen, die um den Trachealsack herum angeordnet sind, den Breathless-Liganden *branchless (bnl)* und sekretieren Bnl an den Stellen, an den sich die sechs primären Atemwegsäste ausbilden [54]. Die Anzahl der auf der Zelloberfläche präsentierten Breathless-Rezeptoren entscheidet hierbei, welche Zellen zu *tip cells* werden, die die Verzweigungen anführen, und welche Zellen zu sogenannten *stalk cells* werden, die proximal an die *tip cells* grenzen [57]. In den *tip cells* wird infolge der Bindung von Branchless an Breathless die Migration dieser Zellen und damit die Ausbildung der primären Verzweigung aktiviert.

Zusätzlich wird in den *tip cells* dieser primären Verzweigungen infolge der Bindung von Branchless an Breathless die Transkription von Genen, die die Entstehung der sekundären Tracheenverzweigungen einleiten, induziert. Zunächst wird das Gen *pointed* exprimiert. Das führt zur Chemotaxis der trachealen Zellen und sorgt somit für die Ausbildung der sekundären Verzweigungen [58]. Darüber hinaus führt die Aktivierung des Bnl/Btl-Signalweges zur Expression des Gens *sprouty*, das durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus das Bnl/Btl-Signal in den benachbarten *stalk cells* inhibiert und dort eine Verästelung unterbindet [59].

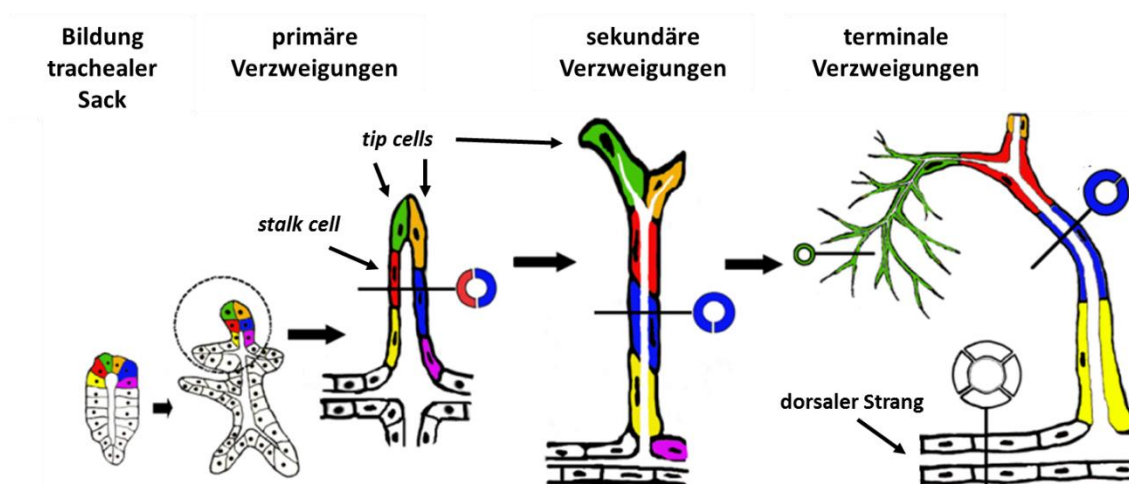


Abb. 1.2: Morphogenese der embryonalen Tracheen in *Drosophila melanogaster*. Von links nach rechts: In frühen Stadien der Embryogenese kommt es zunächst zur Einstülpung des trachealen Sack. Sechs Zellen sind farblich kodiert, um ihre Funktion im weiteren Verlauf verfolgen zu können. Anschließend bilden sich die primären Äste als Knospen aus. An den Spitzen dieser entstehen sekundäre Verzweigungen (in grün bzw. orange dargestellt). Zuletzt bildet die terminale Zelle jedes sekundären Astes terminale Verzweigungen, bestehend aus dendritischen Ausläufern (grün dargestellt). Die Querschnittsdarstellungen veranschaulichen die Röhrenstruktur und die Anordnung der Epithelzellen an beispielhaften Positionen der Tracheen. (nach [60])

Nun hat sich in jedem Hemisegment eine tracheale Knospe mit ersten primären und sekundären Verzweigungen gebildet, welche sich allerdings noch zu einem geschlossenen Netzwerk zusammenschließen und einen durchgängigen dorsalen Strang bilden müssen. Um dies zu erreichen, fusioniert jeweils die apikale Zelle einer Verzweigung, beispielsweise einer Knospe aus dem zweiten thorakalen Hemisegment mit der entsprechenden apikalen Zelle einer Verzweigung im dritten thorakalen Hemisegment. Die Fusion verläuft dabei symmetrisch, wobei die jeweilige apikale Zelle der beiden zu fusionierenden Verzweigungen dasselbe morphogenetische Programm durchläuft. Die zukünftigen Fusionszellen bilden einen

dendritischen Ausläufer aus und verlängern diesen, bis die Erweiterung des Fusionspartners erreicht wird. Durch den Kontakt der beiden Zellen wird die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen induziert. Anschließend verformen sich die Zellen ringförmig, sodass ein Lumen zwischen ihnen entsteht. Zuletzt verkürzen sich die Fusionszellen und ziehen dabei die benachbarten Zellen nach [61–63]. Die Entscheidung, welche Zellen zu den fusionierenden Zellen werden, wird durch ein Zusammenspiel des Bnl/Btl-Signals und des Notch-Signalwegs reguliert. Eine starke Aktivierung des Breathless-Rezeptors induziert die Expression von *delta* und *serrate*, beides Liganden des Notch-Rezeptors. Die sezernierten Liganden Delta und Serrate binden dann an den Notch-Rezeptor auf den benachbarten trachealen Zellen. Dadurch wird der Notch-Signalweg aktiviert und die Einleitung der Fusion in diesen Zellen wird inhibiert [64].

Bis zu diesem Punkt findet die gesamte Morphogenese der Atemwege während des Embryonalstadiums statt. Die zuvor bereits beschriebenen terminalen Verzweigungen der Atemwege bilden sich erst im Laufe des Larvenstadiums. Dabei wird die vorherige *tip cell* der sekundären Äste zur terminalen Endzelle. Jede Terminalzelle bildet eine stark verzweigte Neuron-ähnliche Struktur aus dendritischen Ausläufern, die mit dem umliegenden Gewebe in Verbindung stehen. In vielen Geweben kontaktieren die terminalen Verzweigungen so fast jede einzelne Zelle und versorgen diese mit Sauerstoff [46, 48].

Gesteuert wird dieser Prozess über den individuellen Sauerstoffbedarf der umliegenden Zellen, wobei auch hier die beiden Gene *branchless* und *breathless* eine zentrale Rolle spielen. Durch eine bestehende Hypoxie im Gewebe wird der Transkriptionsfaktor HIF (*hypoxia-inducible factor*), bestehend aus den Untereinheiten Sima und Tango, aktiviert. In den trachealen Endzellen induziert HIF die Expression des Rezeptors *Breathless*, wohingegen in den Zellen des umliegenden, sauerstoffarmen Gewebes *branchless* exprimiert wird [65, 66]. Durch die Bindung von Branchless an den Rezeptor Breathless wird die Expression von Genen induziert, die die Ausbildung der dendritischen Verzweigungen einleiten.

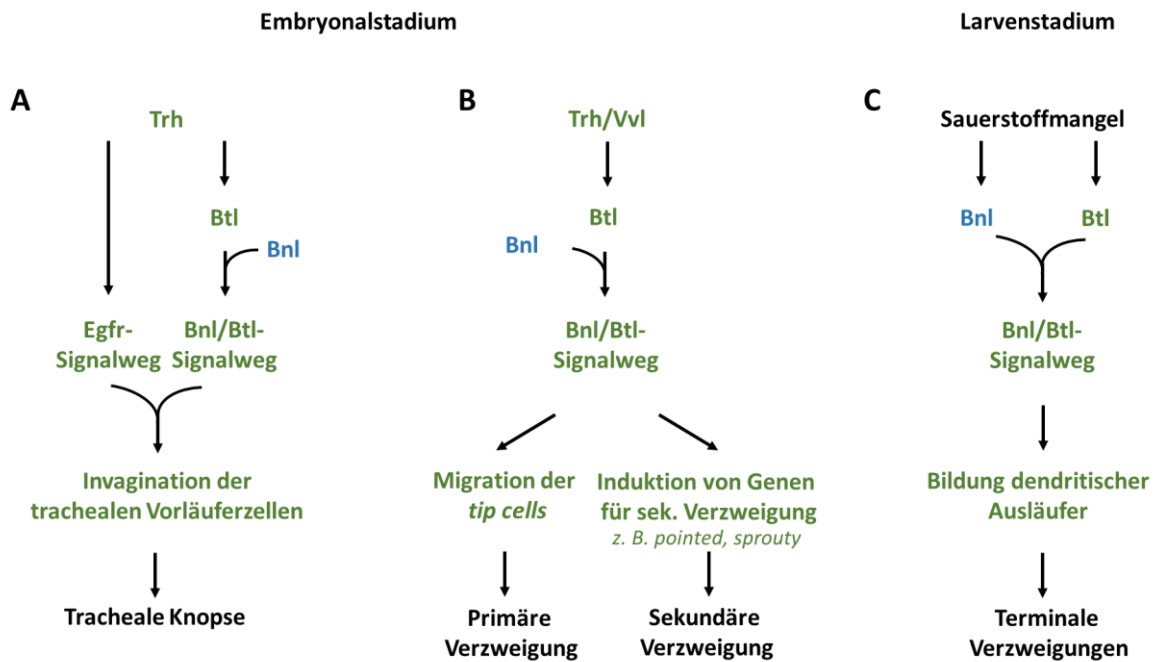


Abb. 1.3: Signalkaskaden der embryonalen und larvalen Atemwegsentwicklung in *Drosophila melanogaster*. **A:** Während des elften Embryonalstadiums aktiviert der Transkriptionsfaktor Trachealess (Trh) den Egfr-Signalweg (*epidermal growth factor receptor*). Durch das EGFR-Signal wird der erste Schritt der Invagination eingeleitet, in dem sich die trachealen Vorläuferzellen vom umgebenden Ektoderm absetzen [49, 50]. Parallel wird durch Trachealess auch die Expression des membranständigen Rezeptors *breathless* (*btl*) induziert. Zellen, die den trachealen Sack umgeben, sekretieren hingegen den Btl-Liganden Branchless [51]. Durch die Bindung von Bnl an den Btl-Rezeptor auf den trachealen Vorläuferzellen wandern diese vom Ektoderm weg und bilden eine Knospung aus Vorläuferzellen [49, 50]. **B:** In den trachealen Vorläuferzellen, die zu primären Verzweigungen differenzieren, wird durch die Transkriptionsfaktoren Trachealess (Trh) und Ventral veinless (Vvl) die Expression des Btl-Rezeptors induziert [55, 56]. Durch Bindung des Liganden Bnl an seinen Rezeptor Btl wird die Migration dieser Zellen und damit die Bildung der primären Verzweigung aktiviert. Zusätzlich wird in diesen apikalen Zellen dieser primären Verzweigungen die Transkription von Genen, die die Bildung sekundärer Tracheenäste einleiten, induziert [58]. **C:** Terminale Verzweigungen stellen die dendritischen Ausläufer einzelner terminaler Epithelzellen dar. Besteht Sauerstoffmangel induziert der Transkriptionsfaktor HIF (*hypoxia-inducible factor*) in den trachealen Endzellen die Expression des Rezeptors *btl*, wohingegen in den Zellen des umliegenden, sauerstoffarmen Gewebes *bnl* exprimiert wird [65, 66]. Durch die Bindung von Branchless an den Rezeptor Breathless wird die Ausbildung der dendritischen Verzweigungen eingeleitet. Prozesse in den trachealen Vorläuferzellen sind in Grün dargestellt, in den umgebenden Geweben in Blau.

Der strukturierte Aufbau und die Entwicklung der Atemwegsverzweigungen unterliegen in *Drosophila melanogaster* also einer Reihe genetischer Faktoren und sind streng kontrolliert (Abb. 1.3). Genmutationen, welche die Entwicklung und Morphologie der Atemwege beeinflussen, lassen sich mit Hilfe der *Drosophila*-Larve in einem simplen System detektieren. Daher eignet sich *Drosophila* hervorragend als Modellorganismus, um die Auswirkungen von Genen oder Umweltbedingungen auf die Atemwegsstruktur zu untersuchen.

1.2.3 Serinproteaseinhibitoren in *Drosophila melanogaster*

Die Bedeutung von Serinproteaseinhibitoren im Kontext der Asthmapathogenese wurde in Kapitel 1.1.2 ausführlich erläutert und wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei um eine höchst konservierte Gruppe von Genen. Darum ist es nicht verwunderlich, dass auch *Drosophila melanogaster* eine Vielzahl von Serinproteaseinhibitoren synthetisiert, die vielfältige Funktionen übernehmen und an essentiellen Zellmechanismen wie der Regulation der angeborenen Immunantwort oder der Embryonalentwicklung beteiligt sind (Abb. 1.4).

Das erste jemals im *Drosophila*-Genom annotierte Serpin war *acp76A* (*spn76A*), es kodiert ein Protein, das von der akzessorischen Drüse der männlichen Fliege produziert und während der Kopulation auf die Weibchen übertragen wird [67]. Seine Funktion ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, möglicherweise ist es allerdings an der Aufrechterhaltung der Proteinzusammensetzung und der Koagulation der Samenflüssigkeit beteiligt [68]. Mittlerweile wurden 28 weitere Serpine in *Drosophila* annotiert [69]. Davon besitzen 17 einen aktiven *reactive center loop* (RCL), der ihnen die Inhibitorfunktion verleiht [69].

In der Taufliege wurden bisher nur wenige der bekannten Serpine im Detail erforscht. Eines der am besten untersuchten Serpine ist *Spn43Ac* (Necrotic). Im Rahmen des *Danger Signalings* fungiert *Spn43Ac* als negativer Regulator des Toll-Signalweges. Liegt keine Infektion vor, inhibiert *Spn43Ac* das Zymogen Persephone. Dadurch wird eine proteolytische Aktivierung des Zytokins Spätzle unterbunden und die Aktivierung des Toll-Signalweges gehemmt [70–72]. An einer anderen Stelle der Toll-Signalkaskade ist ein weiteres Serpin, das *Spn42Dd* (*Spn1*), zu finden. *Spn42Dd* dient ebenfalls als Negativregulator der Immunantwort, indem es die Modulare Serinprotease (ModSP) hemmt und dadurch ebenso die Prozessierung von Spätzle verhindert [72, 73].

Nach einer Gewebsschädigung oder Infektion kann ein weiterer Abwehrmechanismus aktiviert werden, die Melanisierung. Hierfür wird durch eine Phenoloxidase die Oxidation von Phenolen zu Chinonen katalysiert, welche wiederum nicht-enzymatisch zu Melanin polymerisieren. Mit Hilfe dieses Melanins wird ein potentiell pathogenes Partikel eingeschlossen und immobilisiert, oder der Bereich um eine Verletzung verschlossen [74].

In der Hämolymphe und den Tracheen wird die Melanisierungsreaktion von den Serpinen *Spn28D* und *Spn77Ba* kontrolliert [75, 76]. Auch das Serpin *Spn27A* reguliert die Melanisierungsreaktion in der Hämolymphe von *Drosophila* [77, 78]. Die Serpine hemmen die Aktivität der Phenoloxidase und verhindern so eine spontane Oxidation von Phenolen und die

Bildung von Melanin ohne vorherige Verletzung. Zusätzlich wird ihre Expression infolge einer Infektion im Rahmen eines negativen *Feedbackloops* aktiviert, um die Melanisierungsreaktion zu begrenzen und den Tod des Tieres durch eine übermäßige Melanisierung zu verhindern [75, 78].

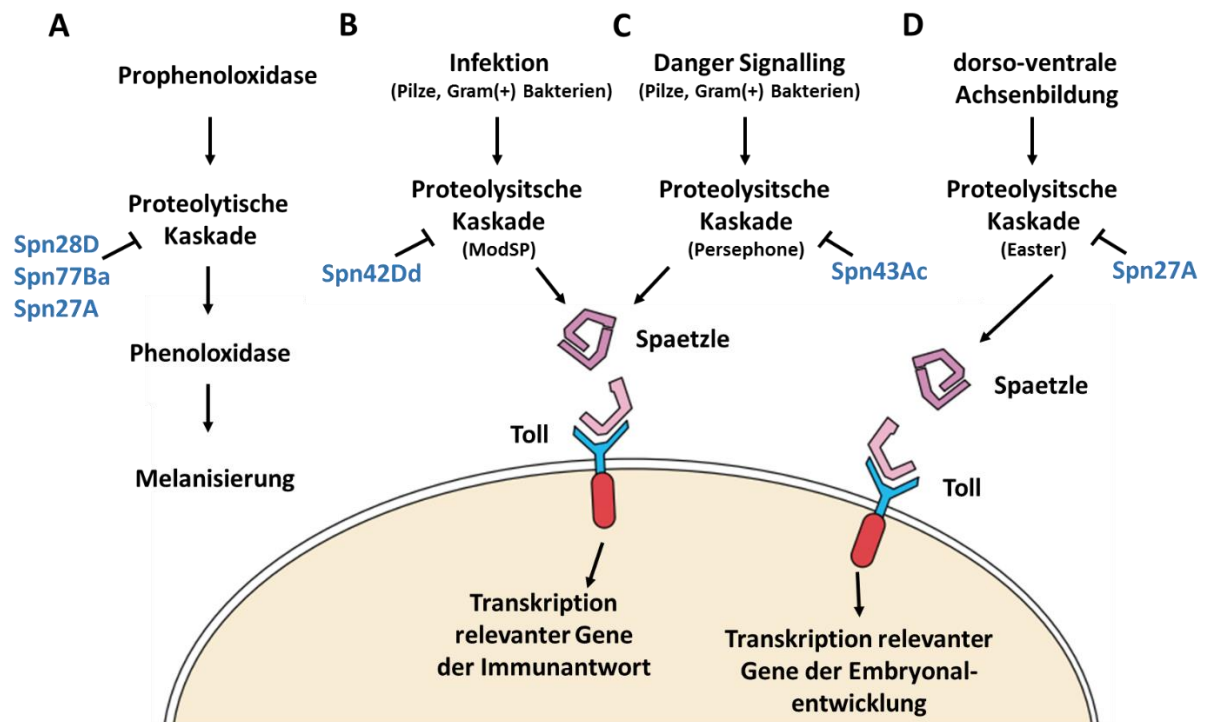


Abb. 1.4: Serpine als Regulatoren der Immunantwort und Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster*. **A:** Die Serpine Spn28D, Spn77Ba und Spn27A sind an der Regulation der Melanisierungsreaktion infolge einer Gewebsschädigung oder Infektion beteiligt, indem Sie die Aktivierung der Phenoloxidase inhibieren. **B:** Im Rahmen des *Danger Signalling* fungiert Spn43Ac als negativer Regulator des Toll-Signalweges. Liegt keine Infektion vor, inhibiert Spn43Ac die Aktivierung von Persephone, wodurch die Prozessierung des Zytokins Spätzle unterbunden und die Aktivierung des Toll-Signalweges gehemmt wird [70–72]. **C:** Spn42Dd ist ebenfalls an der Regulation der Immunantwort beteiligt, indem es die Modulare Serinprotease (ModSP) hemmt und infolgedessen die Prozessierung von Spätzle verhindert [72, 73]. **D:** In der frühen Embryogenese steuert das Serpin Spn27A die Bildung der dorso-ventralen Achse, indem es die proteolytische Aktivierung von Spaetzle durch Easter inhibiert [78]. (Nach [69])

Damit ist eine der wichtigsten Funktionen von Serinproteaseinhibitoren die Regulation von Immunreaktionen. Neben seiner Beteiligung an der Immunregulation spielt Spn27A allerdings auch in der frühen Embryogenese eine wichtige Rolle, während der es die dorso-ventrale Achsenbildung steuert [79]. Serinproteaseinhibitoren in *Drosophila* sind somit nicht nur an der Immunantwort, sondern auch an der Embryonalentwicklung beteiligt und übernehmen somit annähernd identische Funktionen wie ihre humanen Pendanten (siehe Kapitel 1.1.2).

1.2.4 Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem

Einer der wesentlichen Vorteile von *Drosophila melanogaster* gegenüber anderen Modelltieren ist das in Kapitel 1.2 bereits erwähnte GAL4/UAS-Expressionssystem, das neben einer Vielzahl weiterer gentechnischer Werkzeuge die Charakterisierung von Genen und ihren Funktionen vereinfacht. Das bereits 1993 entwickelte binäre GAL4/UAS-Expressionssystem ermöglicht die gezielte Manipulation der Expression eines Zielgens selektiv in einem Gewebe oder Organ von Interesse oder zu einem individuellen Entwicklungszeitpunkt [80–82].

Der Transkriptionsfaktor GAL4 stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dort bindet es an eine spezifische DNA-Sequenz, die *upstream activation sequence* (UAS), und induziert auf diese Weise die Transkription und Translation von Enzymen, die die Umwandlung von Galaktose in Glukose katalysieren. Der Wildtyp von *Drosophila* weist weder das *gal4*-Gen noch seine korrespondierende UAS-Bindesequenz in seinem Genom auf, wodurch es keine intrinsische Synthese des Transkriptionsfaktors GAL4 geben kann. Um sich das GAL4/UAS-Expressionssystem in *Drosophila* zunutze zu machen, wurden mit Hilfe gentechnischer Methoden Fliegen generiert, in deren Genom dem zu untersuchenden Gen die hefeeigene UAS-Sequenz als Promotor vorgeschaltet ist (Abb. 1.5). Diese Linie wird als Effektorstamm bezeichnet. In Tieren des Effektorstammes findet keine Manipulation der Zielgenexpression statt, dazu bedarf es das GAL4-Protein. Das *gal4*-Gen wird in einer separaten Fliegenlinie exprimiert, dem sogenannten Treiberstamm. Dort unterliegt *gal4* der transkriptionellen Kontrolle eines beliebigen Promotors. Die Wahl der Promotorregion ausgesuchter gewebes- oder entwicklungspezifischer Gene, kann die *gal4*-Expression gezielt in einem Organ, in bestimmten Zellen oder während einer bestimmten Entwicklungsphase dirigieren. In Tieren des Treiberstammes findet das GAL4 jedoch keine korrespondierende Bindestelle, so dass auch diese Tiere einen Wildtypphänotyp aufweisen. Erst wenn Tiere des Effektorstammes und des Treiberstammes miteinander gekreuzt werden, finden beide hefeeigene Komponenten zueinander. Denn in den unmittelbaren Nachkommen wird GAL4 gewebsspezifisch synthetisiert, bindet an die nun vorhandene UAS-Region und induziert so die Expression des Zielgens [82].

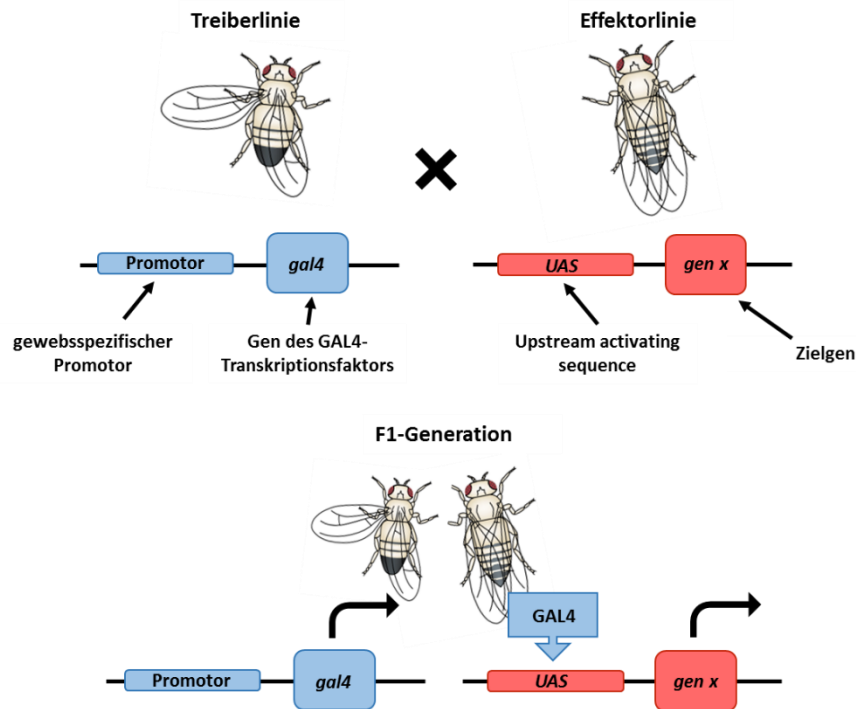


Abb. 1.5: Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem von *Drosophila melanogaster* nach Brand und Perrimon. Das GAL4/UAS-Expressionssystem ermöglicht ein gewebsspezifisches *Targeting* der Genexpression. Dies erfolgt durch die gezielte Kreuzung einer Treiberlinie, in der die Expression von GAL4 unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors steht, mit einer Effektorlinie, in welcher das zu untersuchende Zielgen unter der transkriptionellen Kontrolle der UAS-Sequenz steht. In der Folgegeneration wird GAL4 gewebsspezifisch synthetisiert und aktiviert durch seine Bindung an die UAS-Sequenz die Expression des Zielgens. (nach [82])

Diese Arbeit hat zum Ziel Serpine im Atemwegsepithel zu charakterisieren. Dies erfordert eine Treiberlinie, die eine gezielte Manipulation der Serpine im Tracheenepithel ermöglicht. Eine Vielzahl von Genen ist spezifisch und ausschließlich im respiratorischen Epithel aktiv, wie beispielsweise die bereits in Kapitel 1.2.2 mehrfach erwähnten Gene *breathless*, *branchless* oder *tracheless*. Die Promotorsequenzen dieser, an der embryonalen Entwicklung der Tracheen beteiligter Gene sind bestens geeignet für eine Zielgenmanipulation in den Tracheen früher, vorwiegend embryonaler Entwicklungsstadien. Um eine tracheenspezifische *gal4*-Expression in späteren Phasen der Entwicklung zu gewährleisten, sind Gene der *pickpocket*-Familie optimal geeignet. Ist *gal4* beispielsweise an die Promotorregion des *ppk4*-Gens (*pickpocket 4*) gekoppelt, wird es vom späten Embryonal- bis zum Imaginalstadium exprimiert. Ppk4 gehört zu der Familie der epithelialen Natriumkanalproteine. Es wird vermutet, dass es in den Atemwegen von *Drosophila* an der Aufnahme von Natriumionen und Flüssigkeit aus dem Lumen durch die Epithelzellen beteiligt ist [83]. Die Atemwege von *Drosophila* sind bis etwa zwei Stunden vor dem Schlüpfen der L1-Larven mit Flüssigkeit gefüllt. Um einen Wechsel von einem flüssigkeits- zu einem gasgefüllten Lumen zu erreichen, werden Salze und

Flüssigkeit durch Atemwegsepithelzellen aufgenommen [50]. Auch während des Larvenstadiums wird durch Ppk4 gewährleistet, dass eindringende Flüssigkeit von den Epithelzellen resorbiert und ein luftgefülltes Lumen erhalten wird [83].

Das GAL4/UAS-Expressionssystem ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Genmanipulationen. Zielgene können mit Markern wie einem FLAG-Tag, GFP oder Luciferase kombiniert werden um ihre Expression zu quantifizieren oder die Proteine zu lokalisieren. Um die Funktion von Genen zu analysieren, kann man ihre Expression gezielt aktivieren oder reduzieren. Eine Möglichkeit der Deaktivierung ist das sogenannte RNA-interference (RNAi). Hierbei bedient man sich eines natürlichen Mechanismus von Zellen, doppelsträngige RNA (dsRNA) zu erkennen und abzubauen. Kurze RNA-Fragmente mit einer Länge von 20 bis 30 Nukleotiden lagern sich an die komplementäre mRNA des Zielgens, induzieren dadurch deren Abbau und verhindern so die Translation. RNA-Interferenz verursacht somit eine Reduktion oder den Verlust der Proteinfunktion ohne die Gensequenz selbst zu verändern [84]. Bis heute wurden viele verschiedene Methoden für die Verwendung von RNAi entwickelt und optimiert. Für die Herstellung transgener *Drosophila*-Linien kommt hauptsächlich die „*small hairpin*“ RNA (shRNA) zum Einsatz. Über spezielle VALIUM-Vektoren (Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS) werden diese mit Hilfe der aus dem Phagen Φ C31 gewonnenen Integrase gezielt an definierte Stellen in das Genom der Fliege integriert [85, 86]. Der Vektor VALIUM20, der in den Fliegenlinien dieser Arbeit genutzt wurde, zählt zu der jüngsten Generation, die durch die Integration von shRNA einen starken *Knockdown* im Soma sowie in der weiblichen Keimbahn erzeugt [87].

Um eine gewebs- und/oder entwicklungspezifische Kontrolle über die Expression der shRNA zu haben, steht diese unter der transkriptionellen Kontrolle eines UAS-Elementes, wie zuvor beschrieben. Nach der Kreuzung mit einer GAL4-Treiberlinie wird die shRNA exprimiert. Anschließend inhibiert diese die Aktivität des Zielgens, indem sie zu einem spezifischen Abbau der mRNA des Zielgens führt. Im Rahmen des „Transgenic RNAi Project“ (TRiP), welches 2008 an der Universität Harvard begonnen wurde, wurden über 12.000 RNAi-Fliegenlinien generiert und der Forschungsgemeinschaft von *Drosophila* zur Verfügung gestellt [88, 89].

Ebenso wie die Stilllegung kann auch die gezielte Aktivierung eines zu charakterisierenden Gens durch das GAL4/UAS-Expressionssystem erreicht werden. Hierfür wird die vollständige Sequenz (open reading frame; ORF) eines Gens mit dem UAS-Element kombiniert. Nach einer Aktivierung durch GAL4 wird so das gesamte und funktionsfähige Zielgen exprimiert und führt

damit zu einer weitaus höheren Transkriptmenge im Vergleich zur endogenen Expression eines Wildtypieres [90].

Die Kombination aus UAS-Bindestelle und ORF des Zielgens wird ebenfalls mit Hilfe der aus dem Phagen Φ C31 gewonnenen Integrase im Genom platziert. Dies geschieht in einer definierten Landestelle auf dem 3. Chromosom und gewährleistet, dass alle so generierten Linien untereinander vergleichbar sind und keine funktionellen Gene zerstört werden [86, 91]. Derzeit existieren 3400 solcher UAS-ORF Fliegenlinien, welche etwa 2850 Gene umfassen und vom Züricher ORFeome Projekt bezogen werden können [90].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, deren Verbreitung in Deutschland nicht nur eine sehr hohe Prävalenz aufweist, sondern sogar stetig zunimmt. Gekennzeichnet ist die Pathogenese von Asthma durch eine chronische Entzündung der Atemwege, übermäßige Mukusekretion, Verkrampfung der Bronchialmuskulatur und einer Schwellung der Bronchialschleimhaut. Eine entscheidende Relevanz im Krankheitsverlauf hat das Atemwegsepithel. Bei Asthmatikern erfährt das Epithel nicht nur strukturelle Veränderungen, sondern auch einen Verlust der Barrierefunktion. Gleichzeitig reagieren die Atemwegsepithelzellen hypersensitiv auf äußere Reize, wie Allergene, Pathogene oder Tabakrauch, und eine gestörte interzelluläre Integrität des respiratorischen Epithels potenziert die Anfälligkeit für Umweltschadstoffe zusätzlich. Der dauerhafte Kontakt mit äußeren Reizstoffen und die damit verbundene Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hat letztlich eine Ablösung der Epithelzellen von der Basalmembran zur Folge.

Inzwischen ist bekannt, dass zu den Risikofaktoren für Asthma neben Umweltschadstoffen auch genetische Faktoren gehören. Eine ganze Reihe von Genen steht im Verdacht, die Anfälligkeit für Asthma zu begünstigen. Zu diesen Suszeptibilitätsgenen gehören auch Gene, die sogenannte Serinproteaseinhibitoren (Serpine) kodieren. Von besonderem Interesse sind hierbei die beiden Serpine SERPINB3 und SPINK5, die bei Asthmatikern überdurchschnittlich häufig Mutationen aufweisen und folglich auf eine Krankheitskorrelation hindeuten. Welche Funktion diese beiden Gene im respiratorischen Epithel der Atemwege übernehmen und ob beziehungsweise wie sie dabei zur Entwicklung von *Asthma bronchiale* beitragen, ist noch gänzlich ungeklärt. Daher war das primäre Ziel dieser Arbeit, die Funktion der Suszeptibilitätsgene SERPINB3 und SPINK5 in den Epithelzellen der Atemwege zu beleuchten.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden fehlregulierte Expressionen der Serpingene gezielt im Atemwegsepithel der Taufliege *Drosophila melanogaster* modelliert. Anhand dieser Modelle wurde nicht nur die Aktivität der Serpine im Atemwegsepithel ermittelt, darüber hinaus wurden die Folgen einer fehlerhaften Expression auf die Atemwegsentwicklung, Morphologie und Struktur untersucht. Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob eine atemwegsspezifische Expression Relevanz für die Physiologie und Fitness der Individuen hat. Abschließend stand die Ermittlung der Bedeutung der Serpingene im Kontext Asthma-relevanter Faktoren im Fokus dieser Arbeit. Hierbei wurde zum einen die Inhalation von Tabakrauch als Asthmarisikofaktor, und zum anderen die Hypoxie, die einen Zustand der akuten Exazerbation des *Asthma bronchiale* in den Atemwegen simuliert, betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Material	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
Deckgläschen	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen)	01-2440-01
<i>Drosophila</i> Röhrchen (5,5 cm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)	960177
<i>Drosophila</i> Röhrchen (3 cm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)	217101
<i>Drosophila</i> Röhrchen (1,5 cm)	nerbe plus GmbH (Winsen/Luhe)	11-881-0021
Dumont-Pinzette Nr. 5 Bio	Bioform (Nürnberg)	B40a
Edelstahlgewebe (Maschenweite 0,250 mm)	Pappert Direkt Vertrieb (Steinau)	V4A, 1.4401
Eiablagebehälter für <i>Drosophila</i>	Kisker (Steinfurt)	789092
Einmal-Pellet Kolben, 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	11849923
Light Cyclers 480 Multiwell Platten, 96-Well	Roche GmbH (Mannheim)	04729692001
LightCycler [®] 480 Sealing Foil;	Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)	04729757001
NucleoSpin [®] Bead Tubes Type B	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)	740812,50
Make-Up Korrektur Stäbchen	Ebelin dm (Karlsruhe)	
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen)	03-0003/C
Petrischalen o. Nocken, 94x16	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)	82.1473
Petrischalen (5,5 cm)	nerbe plus GmbH (Winsen/Luhe)	09-001-0010
Petrischalen (3,5 cm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)	627161
Stopfen (2 cm)	K-TK e.K. (Retzstadt)	3360
Tabakreferenzzigaretten	Kentucky Tobacco Research & Development Center (Lexington, US)	3R4F

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	DX-150	Systemec GmbH (Linden)
Heiz- und Wärmetische	13801	MEDAX GmbH & Co.KG (Neumünster)
Homogenisator	Pellet pestles, cordless motor	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Konstantklima-Kammer	HPP 750	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach)
Lovibond Thermostatschrank	ET 618-4, Typ 180	Tintometer GmbH (Dortmund)
Mikroskop	BX51	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)
Mikroskopkamera	DP25	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)
Nanophotometer	P330	Implen (München)
Rauchmaschine	InExpose	SCIREQ® (Montreal, CAN)
Real-Time PCR Instrument	Light-Cycler 480 II	Roche GmbH (Mannheim)
SICCO Mini 1 Exsikkator, Polycarbonat	V 1850-01	Bohlander GmbH (Grünfeld)
Stereomikroskop	M80	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Sterilwerkbank	ScanLaf Mars safety class 2	LaboGene A/S (Allerød, DK)
Thermoblock	Biometra TS1 ThermoShaker	Analytik Jena AG (Jena)
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	5415R	Eppendorf (Hamburg)
Tissue Lyser	LT	Qiagen (Hilden)
Vortex	neoVortex® 0-2500 UpM	neoLab Migge GmbH (Heidelberg)

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) in dem Reinheitsgrad p.A. bezogen. Im nachfolgenden Absatz sind in alphabetischer Reihenfolge alle Chemikalien von anderen Herstellern aufgeführt.

Tabelle 2.3: Chemikalien und Hersteller

Chemikalie	Hersteller	Artikelnr.
Agarose	7Bioscience GmbH (Rheinau)	A641-050
AniForte® reine Bierhefe	Görges Naturprodukte GmbH (Brüggen)	HTF345
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	10297018
Ethidiumbromid	Invitrogen (Carlsbad, US)	15588011
Grapefruitsaft	Rewe Eigenmarke	
Hexamer random Primer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	SO142
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche (Basel, CH)	04707516001
Maismehl	Huber-Mühle GmbH (Hohberg)	19202
Oligo dTs	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	AM5730G
Rübenmelasse	Königshofer Futtermittel (Ebergassing)	ASS-054951
Trockenhefe	RUF	
Wasser (steril)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)	0082479E

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Molekularbiologische Kits und Hersteller

Kit	Hersteller	Artikelnr.
NukleoSpin® RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel (Düren)	740955
Turbo DNA-free® Kit	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	AM1907

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.5: Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller/Lieferant	Artikelnr.
RNase Out	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	10777019
SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)	18080085

2.1.6 Primer

Die verwendeten Expressionsprimer wurden von Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert. Generiert wurden die Sequenzen für die einzelnen Gene anhand der Datenbank Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>; Stand: Oktober 2016) und des Primer Designprogramms des *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> Stand: Oktober 2016). In den folgenden Tabellen sind die Primer aller für diese Arbeit untersuchten Gene aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer

CG Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Serpine		
CG8137	Spn28F	sense: GCGTTCATCGAGGTTAATG antisense: GCATACTATAGCGCACGAAAAG
CG9334	Spn38F	sense: GCGATGGGCATACAAGATGC antisense: AACGACGCCTCCCACATGAG
CG9453	Spn42Da	sense: AGTCAACGAGGAGGGAACG antisense: TGGTTGGCAATGAAGTGTTT
CG9454	Spn42Db	sense: CCAGCAAGAACTATCCCAGGT antisense: GCTCTGCCTGACCACTGAAT
CG9455	Spn42Dc	sense: CGACGTAAATGAGGCAGGA antisense: TGTTGAGCATCATGGGTACTATCT
CG9456	Spn42Dd	sense: TCGTGATGAACTCAAAGAGACC antisense: CTGACTTGTCGGTGAATAGCTC
CG9460	Spn42De	sense: GTTTTCCAATCATGTCACTCA antisense: CCATGGCCAGATTCAAGC
CG10913	Spn55B	sense: GAATTGGCCGAGAACTGAA antisense: TTCCAGCAGATTGCTAAACTCA
CG11331	Spn27A	sense: CCACGCTGAAACACTTCTACG antisense: CCTCGGGATTGGTGAAGTC
CG12172	Spn43Aa	sense: CCTTCATCGATGTGAACGAG antisense: GGAACTCCGGCAGCATAA
CG14933	CG14933	sense: CATCCACACGTATAGAAAACATGAA antisense: AAAGAGGGCGATCAAAAAGG
CG31704	CG31704	sense: CGCTTTCTGTCTGTCTGCTCT antisense: CGGGCAGGAGTACTGGAATA
CG32354	CG32354	sense: TTGGCCATGTTACGTTG antisense: TCTTGATGGGTGAGTCTGTCA
CG42486	CG42486	sense: TGCACTCAGCGGAATATAGA antisense: CGATTAGCTTGACAAGATCCCATT
CG44008	CG44008	sense: TCACCATATCGCCATTAGC antisense: GTTCCTGGGACAGGGACAGA
CG45011	CG45011	sense: CCTCCTGGCATTGTGTCGTC antisense: AAGTAGATTCTTGGGCACGG
Haushaltsgen für Real-time qPCR		
CG7939	RpL32	sense: CCAGTCGGATCGATATGCTAA antisense: GTTCGATCCGTAACCGATGT

2.2 Puffer und Medien

Verwendete Medien und Puffer wurden vor der Verwendung stets für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

2.2.1 Puffer

Tabelle 2.7: Verwendete Puffer

Puffer	Chemikalie
10x PBS	137 mM NaCl 27 mM KCl 43 mM KH ₂ PO ₄ 14 mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O Ad. 1 l pH 7,4 eingestellt mit HCl

2.2.2 Fliegenstandardmedium

Für 2 L Standardmedium wurden 93,75 g Maismehl, 93,75 g Bierhefe, 30 g Glukose, 45 g Zuckerrübenmelasse und 5 g Agar in Wasser gelöst, auf 2 L aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren kühlte das Medium auf ca. 60 °C herunter, bevor 15 ml Propionsäure (10%ig in Wasser) und 45 ml Methylparaben (10%ig in 70%igem Ethanol) als Konservierungsmittel zugesetzt wurden. Anschließend wurde das Medium unter einer Sterilwerkbank in *Drosophila*-Kulturgefäße gegossen. Diese wurden nach dem Abkühlen mit Stopfen verschlossen und bei 6 °C gelagert.

2.2.3 Grapefruit-Agar-Platten

Für 1 L Grapefruit-Agar wurden 30 g Agar in 700 ml Wasser gelöst und autoklaviert. Währenddessen wurden 0,5 g Methylparaben in 10 ml Ethanol gelöst und mit 300 ml Grapefruitsaft vermischt. Das Gemisch aus Agar und Wasser wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 60 °C heruntergekühlt, und der mit Konservierungsmittel versetzte Grapefruitsaft unter Rühren zugesetzt. Anschließend wurde das Medium unter einer Sterilwerkbank in Petrischalen (9,5 mm Durchmesser) gegossen. Nach dem Trocknen wurden diese verschlossen und bei 6 °C gelagert.

2.3 Programme

Tabelle 2.8: Verwendete Programme

Programm	Version	Hersteller
GraphPad Prism	7.0	GraphPad Software
ImageJ	2.1.4.7	Wayne Rasband National Institutes of Health, USA
Microsoft Office	2010	Microsoft

2.4 *Drosophila melanogaster*

2.4.1 *Drosophila*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche transgene *Drosophila*-Stämme eingesetzt. Die Auflistung aller Fliegenstämme erfolgt nach Verwendungszweck in Tabelle 9. Aufgeführt sind für die einzelnen Stämme die Bezeichnung, der Genotyp und die Herkunft. Als Bezugsquelle kamen einzelne Labore oder so genannte *Drosophila*-Stammsammlungen in Frage.

Tabelle 2.9: Verwendete *Drosophila*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Quelle/Herkunft
Wildtypstämme		
CantonS	Wildtyp	Thomas Roeder; Zoophysiologie Kiel
GAL4-Expressionsstämme		
ppk4-GAL4	yw67c23;ppk4-gal4;+/-	Thomas Roeder; Zoophysiologie Kiel
UAS-RNAi Stämme		
spn43Aa-RNAi	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02370}attP2	Bloomington Stock Center (Bloomington, US)
CG14933-RNAi	y1 v1; P{TRiP.HMJ23160}attP40	Bloomington Stock Center(Bloomington, US)
genetische Kontrolle	y[1] v[1]; P{y[+t7.7]=CaryP}attP2	Bloomington Stock Center
UAS-ORF Stämme		
UAS-CG14933	M{UAS-CG14933.ORF.3xHA.GW}ZH-86Fb	FlyORF (Zürich, CH)
UAS-sp43Aa	M{UAS-Spn43Aa.ORF.3xHA.GW}ZH-86Fb	FlyORF (Zürich, CH)

2.4.2 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die Aufzucht und Haltung der Fliegenstämme fand in Kulturröhrchen mit Stopfen bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 % statt. Als Futtermedium diente das *Drosophila*-Standardmedium (2.2.2). Das Umsetzen der adulten Tiere in neue Kulturröhrchen erfolgte zweimal wöchentlich. In der Regel wurden dazu die adulten Tiere mit CO₂ betäubt und mindestens 20 bis 30 adulte Tiere in neue Kulturröhrchen überführt.

2.4.3 Kreuzungen der Treiber- und Effektor-Linien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Kreuzungen mit verschiedenen transgenen Fliegenstämmen durchgeführt. Der Kreuzungsansatz bestand grundsätzlich aus fünf bis sechs Tage alten Männchen des Treiberstamms (ppk4-GAL4) und aus fünf bis sechs Tage alten, jungfräulichen Weibchen des jeweiligen UAS-Effektorstamms. Die Haltung der adulten Tiere zur Eiablage und die Anzucht der F1-Generation erfolgten auf *Drosophila*-Standardmedium in Kulturröhrchen bei 25 °C (2.2.2).

2.4.4 Auswahl orthologer Gene in *Drosophila melanogaster* mittels Flybase und NCBI-BLAST

Zu Beginn der Arbeit wurden die orthologen Gene von SERPINB3 und SPINK5 in *Drosophila melanogaster* bestimmt.

Erste Kandidaten für die beiden Gene wurden mittels des Homologie-Tools der Datenbank Flybase ermittelt (<http://flybase.org/cgi-bin/orthosearch.pl>; Stand: August 2016). Anschließend wurden alle Kandidaten ohne Inhibitorregion oder Kazal-Domäne und somit auch ohne Inhibitoraktivität aussortiert.

Zu den verbliebenen Kandidatengen wurde anhand der Aminosäuresequenz eine Analyse des Homologiewertes zu SERPINB3, bzw. SPINK5 mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) der Datenbank NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Stand: August 2016) durchgeführt. Ausschließlich Kandidaten mit einem Identitätswert über 30 % wurden für die weitere Analyse in Betracht gezogen. Zuletzt wurde das Expressionslevel der möglichen Kandidatengene in ganzen Larven und isolierten larvalen Atemwegen mittels qRT-PCR gemessen.

Das Kandidatengen von SERPINB3 und SPINK5 mit dem jeweils niedrigsten CP-Wert, im Umkehrschluss folglich dem höchsten relativen Expressionslevel in isolierten Atemwegen wurde für die Versuche in dieser Arbeit ausgewählt.

2.5 Präparation larvaler Tracheen

Für die Präparation von Tracheen wurden L3-Larven des Kontroll- bzw. Versuchsansatzes einzeln auf Blockschälchen mit ca. 150 µl 1x PBS überführt. Die Präparation der Tiere erfolgte bei einer 25- bis 50-fachen Vergrößerung unter dem Stereomikroskop.

Zuerst wurde mit Hilfe zweier Dumont-Pinzetten der Kopf von der Larve vollständig entfernt. Anschließend wurde die Larve mit einer Pinzette fixiert und mit Hilfe einer weiteren Pinzette wurden die Stigmen sowie die mit ihnen verbundenen Haupt- und Nebenäste aus dem restlichen Tier herausgezogen. Sämtliches nicht-tracheales Gewebe wurde entfernt und die Tracheen in ein Eppendorf-Röhrchen mit 150 µl Lysispuffer (RA1-Puffer, MN NucleoSpin RNA II Kit) auf Eis überführt. Zuletzt wurden die Tracheen (etwa 40 Paare) mit Hilfe eines Homogenisators (Pellet pestles, cordless motor; Sigma Aldrich) homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.6 Isolierung der Gesamt-RNA

2.6.1 Isolierung der RNA aus ganzen Larven

Ganze Larven (etwa 10 Stück) wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 150 µl Lysispuffer (RA1-Puffer, MN NucleoSpin RNA II Kit) überführt und mit Hilfe eines Homogenisators (Pellet pestles, cordless motor; Sigma Aldrich) homogenisiert. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren und gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung und Reinigung der RNA aus ganzen Larven erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel. Das vorgeschriebene Protokoll des Herstellers wurde eingehalten. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte in 60 ml H₂O (RNasefrei).

An die Isolation der Gesamt-RNA schloss sich ein DNA-Zusatzverdau mit Hilfe des Turbo DNA-free® Kits (Ambion) an. 40 µl RNA wurden in je ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt.

Jedem Ansatz wurden 10 µl Turbo DNase Puffer (10 x), 1 µl Turbo DNase und 5 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Der Reaktionsmix wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Inaktivierungspuffer zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Reaktionsröhrchen regelmäßig gevortext. Nach der anschließenden Zentrifugation bei RT und 10.000 x g für 1,5 min wurden 40 µl Überstand in einem neuen Röhrchen zusammengeführt und die Konzentration der gereinigten RNA bestimmt (2.6.3).

2.6.2 Isolierung der RNA aus präparierten Tracheen

Die Isolierung und Reinigung der RNA aus Tracheen (2.5) erfolgte ebenfalls mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel. Das vorgeschriebene Protokoll wurde eingehalten. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte in 40 µl H₂O (RNasefrei). Aufgrund der geringen RNA-Konzentration wurde kein zusätzlicher DNA-Verdau durchgeführt.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung am Nanophotometer

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Nanophotometer der Firma Implen (P330) verwendet. Für Konzentrationsbestimmungen der Gesamt-RNA aus ganzen Larven wurde aufgrund der hohen zu erwartenden RNA-Menge der Faktor 50 für die Messung verwendet.

Da aus isolierten Tracheen weniger Gesamt-RNA erwartet wurde, wurde hier der Faktor 10 eingestellt.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Absorption von Nucleinsäuren gemessen. Zusätzlich bestimmt das Gerät die Absorption bei 230 nm, 280 nm und 320 nm. Das Verhältnis A_{260}/A_{230} sollte größer als 2.0 sein. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Puffer hin. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Davon abweichende Werte deuten ebenfalls auf Verunreinigungen der Probe hin. Auch eine zu niedrige Konzentration der Probe kann den A_{260}/A_{280} -Wert beeinträchtigen. Vor allem Proben aus isolierten Tracheen wiesen meist eine RNA Konzentration von $< 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ auf und lagen damit an der unteren Messgrenze des Nanophotometers.

2.7 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA aus der Gesamt-RNA wurde die SuperScript® III Reverse Transkriptase verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurden für die Reaktion 250 ng RNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 μl eingesetzt. Für alle Primer, welche nicht Exon-übergreifend gestaltet werden konnten, wurde in der cDNA Synthese zusätzlich eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (RT-) angesetzt. Dies ermöglicht es, eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA (gDNA) in den gemessenen Proben zu detektieren. Bei sogenannten „Exon-spanning“ Primern wurde auf diese Kontrolle verzichtet. Die Durchführung erfolgte dem Protokoll des Herstellers entsprechend in folgender Zusammensetzung:

Tabelle 2.10: Reaktionsansatz cDNA Synthese I

Reagenz	Menge	
	RT+	RT-
Oligo(dT) (100 mM)	1,0 µl	1,0 µl
dNTP mix (10 mM)	1,0 µl	1,0 µl
RNA	250 ng	250 ng
RNase-freies H ₂ O	ad. 13 µl	ad. 13 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 65 °C in einem Thermoblock erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Im nächsten Schritt wurde folgender Mastermix hinzugegeben:

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz cDNA Synthese II

Reagenz	Menge	
	RT+	RT-
5x First-Strand Buffer	4,0 µl	4,0 µl
DTT (0,1 M)	1,0 µl	1,0 µl
RNase Out (40 U/µL)	1,0 µl	---
SuperScript III (200 U/µL)	1,0 µl	---
RNase-freies H ₂ O	---	2,0 µl

Die Proben wurden im Thermocycler für eine Stunde bei 50 °C inkubiert und die Reaktion bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Vor dem Einsatz in der *Realtime*-PCR wurden die cDNA-Proben 1:1 mit H₂O (RNase-frei) verdünnt.

2.8 Quantitative *Realtime*-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) kann die Produktmenge des Zielgens durch die Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I) quantifiziert werden. Der Farbstoff interkaliert zwischen doppelsträngige DNA, und wird nach jedem Syntheseschritt detektiert. Nimmt die Produktmenge mit jedem Syntheseschritt zu, nimmt auch das Fluoreszenzsignal zu. Als Quantifizierungswert dient der sogenannte CP-Wert (Crossing Point). Er beschreibt die Zykluszahl, bei welcher die Fluoreszenz einen Grenzwert überschreitet (Abb. 2.1). Je mehr Transkriptkopien vorhanden sind, desto niedriger ist der CP-Wert.

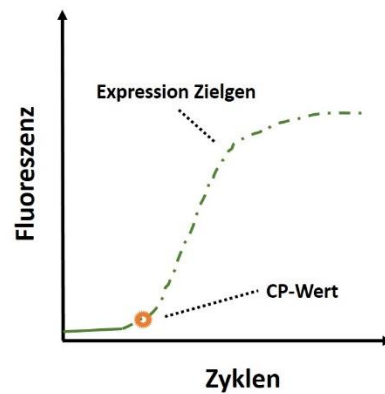


Abb. 2.1: Darstellung des CP-Wertes.

Die Genexpression wird relativ zur Expression eines Haushaltsgenes berechnet. Dieses zeichnet sich durch einen gleichbleibenden Expressionslevel in allen Geweben und Entwicklungsstadien von *Drosophila* aus. Für diese Arbeit wurde *RpL32* als Haushaltsgen verwendet.

Bei der Verwendung von DNA-Farbstoffen ist die Detektion allerdings nicht produktspezifisch. Daher wird durch eine Analyse der Schmelzkurven überprüft, ob ein oder mehrere Produkte in der eingesetzten Probe vorliegen. Hierfür werden die doppelsträngigen Produkte geschmolzen, was zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes und damit zur Änderung der Intensität führt.

Für die qRT-PCR wurde zunächst ein Mastermix für jedes Primerpaar angesetzt. In einer qPCR-Platte wurden je Well 2 μL cDNA (2.7) vorgelegt und 8 μL des Mastermixes hinzugegeben.

Tabelle 2.12: Mastermix zum Einsatz in die qRT-PCR. Das Volumen ist ausreichend für ein Well.

Substanz	Volumen (1x)
RNase-freies H ₂ O	2,0 μl
Primer sense (10 pmol/ μL)	0,5 μl
Primer antisense (10 pmol/ μL)	0,5 μl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5,0 μl

Die qRT-PCR wurde im Lightcycler 480 (Roche) durchgeführt. Aufgrund der sehr ähnlich gewählten Schmelztemperaturen der Primer und der geringen Größe der PCR-Produkte konnte ein einheitliches Reaktionsprogramm gewählt werden.

Tabelle 2.13: Reaktionsprogramm der qRT-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]
Denaturierung	1	95	10:00
Amplifikation	45	95	00:10
		63	00:10
		72	00:10
		78	00:01
Schmelzkurve	1	95	00:10
		65	00:10
		95	00:10
Kühlen	1	40	∞

2.9 Ansetzen zeitlich synchronisierter Fliegen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zeitlich synchronisierte Tiere eingesetzt. Hierfür wurde sich am Protokoll von Linford *et al.* (2013) orientiert [92]. Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurde Hefepaste (6 ml Wasser, 3 g Trockenhefe) kreisförmig mit einem Durchmesser von etwa 2 cm auf einer Grapefruit-Agar-Platte verteilt. Dann wurden 300 bis 500 Fliegenpaare in einen Eiablagekäfig überführt und dieser mit der Grapefruit-Agar-Platte verschlossen. Für die erste Eiablage blieben die Fliegen für 24 Stunden bei 25 °C im Brutschrank. Die Agar-Platte dieser ersten Eiablage wurde verworfen und eine neue aufgesetzt. Anschließend wurde eine weitere Eiablage für 2 oder 4 h durchgeführt.

Um die erhaltenen Eier zu sammeln, wurden etwa 2 ml 1x PBS auf die Platte gegeben und die Eier mit einem Wattestäbchen gelöst. Mit Hilfe einer 1 ml Pipette wurden die Eier in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Eier sich am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen, verworfen und mit frischem PBS ersetzt, um die Eier zu waschen und Hefereste zu entfernen. Dies wurde so oft wiederholt, bis das PBS im Reaktionsgefäß klar und ohne Hefereste verblieb. Zuletzt wurden in etwa 0,5 ml PBS im Röhrchen behalten. Mit Hilfe einer, bis zur 10 µl-Markierung gekürzten, 200 µl Pipettenspitze wurden 20 µl Eier aufgenommen und in ein kleines Fliegen-Kulturröhrchen überführt. Für alle Versuchsansätze wurden die so synchronisierten Ansätze verwendet.

2.10 Hypoxieexposition

Zeitlich synchronisierte Larven wurden im dritten Stadium an Tag 5 nach der Eiablage für zwei Stunden einer Hypoxie (5 % O₂) ausgesetzt. Zusätzlich wurden Kontrolltiere unter normoxischen Bedingungen (ca. 20 - 21 % O₂) gehalten.

Für die Exposition wurde ein SICCO Mini 1 Exsikkator von Bohlender GmbH verwendet. Die Kammer kann luftdicht verschlossen werden. Über zwei Ventile kann gasförmiger Stickstoff zu- und verbliebener Restsauerstoff abgeführt werden.



Abb. 2.2: SICCO Mini 1 Exsikkator der Firma Bohlender GmbH. Über die beiden Ventile (links) kann gasförmiger Stickstoff eingeleitet und Raumluft abgeleitet werden. Die Kammer wird über die grünen Bügel luftdicht verschlossen. Das Sauerstoff-Messgerät im Inneren gibt die aktuelle O₂-Konzentration in der Kammer an.

Für jeden Ansatz wurden jeweils 50 Larven in ein Kulturröhrchen (Standardmedium) gesetzt und dieses in der Expositionskammer, bzw. bei Luftkontrolltieren neben der Kammer, positioniert. Zusätzlich wurde ein Sauerstoffmessgerät in der Kammer platziert. Dann wurde die Kammer verschlossen und über ein Ventil mit Stickstoff gefüllt bis eine Konzentration von etwa 5 % Sauerstoff erreicht wurde. Nach zwei Stunden wurde die Kammer geöffnet und zur Kontrolle nochmals die Sauerstoffkonzentration abgelesen. Die so behandelten Tiere wurden zur Analyse verschiedener Fitnessparameter verwendet. Als *Readout* für den entstandenen Stresslevel der Tiere wurde während der Exposition das Vermeidungsverhalten anhand der Anzahl an kriechenden Larven außerhalb des Futtermediums ermittelt. Im Anschluss an die Hypoxieexposition wurde die Überlebensrate anhand der Anzahl an lebenden Tieren, die

Entwicklungszeit bis zur Verpuppung und Schlüpfen der adulten Fliegen, sowie die Lebensdauer bis zum natürlichen Tod der Imagines bestimmt. Zusätzlich wurden die Tracheen von exponierten Tieren und Kontrolltieren isoliert und die Genexpression des jeweiligen Serpins mittels *Realtime* PCR gemessen.

2.11 Rauchexposition

2.11.1 Rauchmaschine

Für alle Versuche mit Exposition gegenüber Zigarettenrauch wurde das InExpose-Rauchmaschinensystem der Firma SCIREQ® verwendet. Dieses besteht aus einem Rauchroboter, der den Raucher darstellt, mit integrierten Zigarettenkarussell (Aufnahmekapazität von maximal 24 Zigaretten), drei Pumpen, einer runden Rauchexpositions-kammer und einer runden Luftkammer (Kammervolumen je 10 l; vgl. Abb. 2.3).

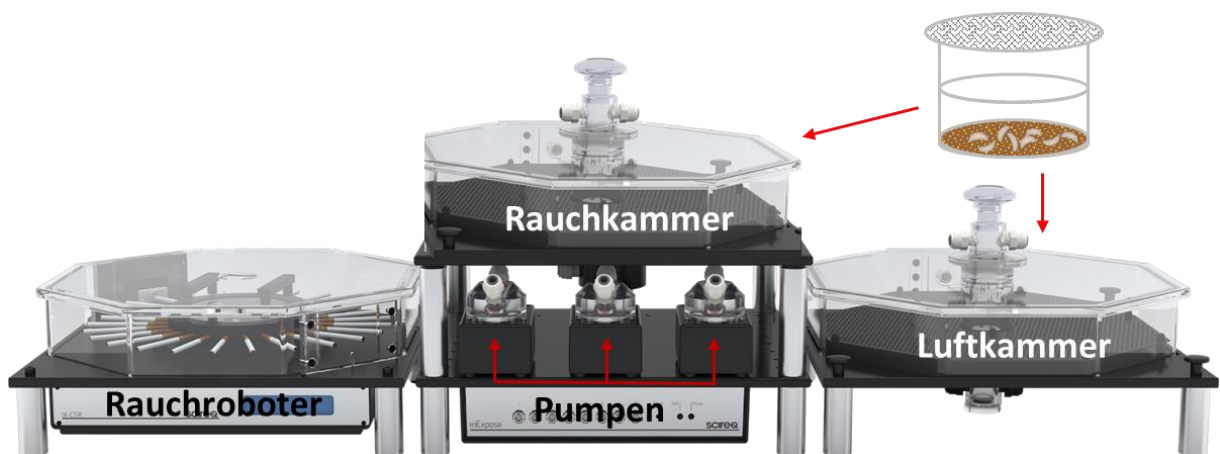


Abb. 2.3: InExpose-Rauchmaschine der Firma SCIREQ®. Links befindet sich das Zigarettenkarussell, mittig und rechts jeweils eine der beiden Expositions-kammern, in welchen sich während der Exposition die zu berauchenden Larven befinden. (nach [93])

Je Zigarette werden neun Züge getätigt, wobei jeder einem Standard-Zug nach der Norm ISO 3308 entspricht (35 ml Rauch/min über eine Länge von 2 s). Im System können verschiedene Konzentrationen eingestellt werden. Dabei entspricht 1 Zug/min einem Verbrauch von 6 Zigaretten/56 min, 2 Züge/min stellt einen Bedarf von 12 Zigaretten/56 min und 3 Züge/min einen Verbrauch von 18 Zigaretten/56 min dar. Bei einer Rate von 2 Züge/min und 3 Züge/min werden im Gegensatz zur Rate 1 Zug/min 2, bzw. 3 Zigaretten simultan abgeraucht.

Pumpe 1 saugt mit 1,5 l/min Zigaretten-Aktivrauch an, der Rauch wird mit Umgebungsluft vermischt und anschließend in die Rauchkammer gepumpt. In die Luftkammer wird ausschließlich Umgebungsluft mit der gleichen Flussrate durch Pumpe 3 transportiert. Pumpe 2 befördert Luft bzw. Rauch mit 2 l/min wieder aus den Kammern hinaus.

Als Tabakreferenzzigaretten wurden 3R4F verwendet. Diese wurden verschweißt bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Vor Verwendung wurden diese mindestens 24 h zuvor bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % auf Raumtemperatur gebracht (ISO 3402:1999).

2.11.2 Durchführung

Zeitlich synchronisierte Larven wurden an Tag zwei, drei und vier nach der Eiablage Zigarettenrauch ausgesetzt und somit alle Larvenstadien (L1, L2, L3) abgegriffen. Für eine einmalige Exposition der Larven wurden in dieser Arbeit 18 Zigaretten in 56 min verbraucht, wobei jeweils drei Zigaretten mit einer Rate von 3 Zügen/min simultan abgeraucht wurden.

Die Berauchung wurde an Tag zwei nach Eiablage begonnen. Hierfür wurden jeweils 50 Larven pro Ansatz mit Hilfe einer Federstahlpinzette in einen Rauchkäfig mit wenig Fliegenmedium gesetzt (Abb. 2.4 A) und dieser in die Rauch-, bzw. Luftkammer der Rauchmaschine gestellt.

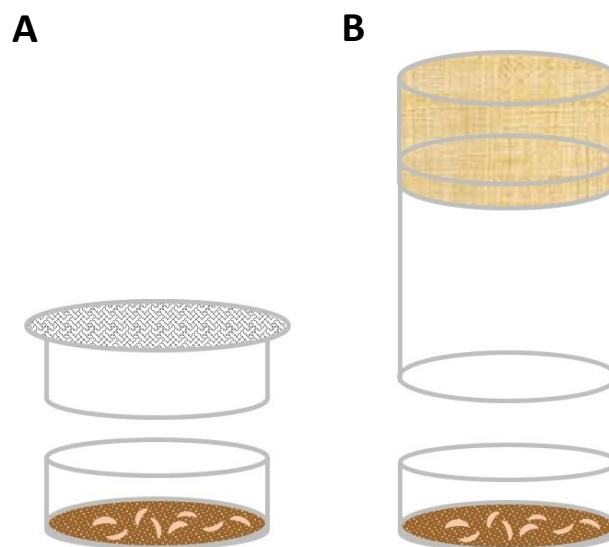


Abb. 2.4: Röhrcen für Rauchexposition. Die Abbildungen zeigen die verwendeten Gefäße für die durchgeführten Rauchversuche. **A:** Käfig für die Berauchung. Die Larven befinden sich in der unteren Petrischale, welche 1 ml Medium, angefeuchtet mit 400 µl PBS, enthält. Verschluss wird die Schale mit einem Deckel, bestehend aus einem Plastikring mit angeklebtem Drahtnetz (Maschenweite 250 µm). **B:** Röhrcen für die Übernachtlagerung der verwendeten Larven. Die Petrischalen sind mit 6 ml Standardmedium gefüllt und mit einem mittleren Röhrcen ohne Boden, sowie einem Stopfen verschlossen.

Anschließend wurde die Berauchung für 56 Minuten (18 Zigaretten; 3 Züge/min) gestartet. Nach der Berauchung wurden die Tiere in frisches Medium gesetzt. Dafür wurden Petrischalen mit Standardmedium verwendet, diese mit einem mittleren Röhrchen ohne Boden und einem Stopfen verschlossen und mit Parafilm versiegelt (Abb. 2.4 B). Bis zur zweiten Berauchung wurden die Tiere so im Inkubator auf 25 °C gehalten. An Tag 3 nach Eiablage wurden die Tiere für die zweite Berauchung wieder in die Rauchkäfige gesetzt und die Berauchung für 56 Minuten gestartet. Nach der Berauchung wurden die Tiere wie nach der ersten Berauchung in frisches Medium gesetzt, dabei gezählt und über Nacht auf 25 °C gestellt. Für die dritte Berauchung (Tag 4) wurden die Tiere wieder in die Rauchkäfige gesetzt und die Berauchung für 56 Minuten (3 Züge pro Minute) gestartet. Nach der Berauchung wurden die Tiere erneut in frisches Medium gesetzt und zur Analyse verschiedener Fitnessparameter verwendet. Als Parameter wurden hierfür die Überlebensrate, Entwicklungs- und Lebensdauer bestimmt.

2.12 Vermeidungsverhalten

Drosophila-Larven, welche unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) leiden, verändern ihr Verhalten verglichen mit Tieren unter normaler Raumluft. Sie beginnen an der Wand des Kulturröhrchens empor zu krabbeln um den schädlichen, sauerstoffarmen Bedingungen zu entkommen [94, 95]. Dieses Vermeidungsverhalten der Tiere, gemessen als Anzahl an Larven, welche an der Wand des Röhrchens emporkrabbeln, liefert damit ein Messwert für den jeweiligen Stresslevel der Tiere. Die Larvenaktivität der jeweiligen Normoxiegruppe wurde dabei als Grundwert verwendet.

Um das Vermeidungsverhalten von *Drosophila*-Larven zu quantifizieren, wurde zu definierten Zeitpunkten (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min) während der Hypoxieexposition die Anzahl an Larven außerhalb des Nährmediums bestimmt.

2.13 Überlebensrate

Um den Einfluss einer Behandlung oder veränderten Expression der Gene SERPINB3 bzw. SPINK5 auf die Überlebensrate von *Drosophila melanogaster* zu bestimmen wurde die Gesamtanzahl an Larven, der daraus gebildeten Puppen und geschlüpften Imagines bestimmt. Zunächst wurde die Anzahl an lebenden Larven direkt im Anschluss an die Behandlung dokumentiert. Bezogen auf die ursprüngliche Anzahl eingesetzter Tiere entspricht die

tatsächlich gezählte Menge an Larven der Überlebensrate von *Drosophila* während der Behandlung.

Zusätzlich wurde die Gesamtanzahl an gebildeten Puppen und geschlüpften adulten Fliegen ermittelt. Bezogen auf die ursprüngliche Anzahl eingesetzter Tiere ergeben diese beiden Werte die Anzahl an gestorbenen Tieren vor Eintritt in die Metamorphose bzw. im Puppenstadium.

2.14 Entwicklungszeit

Um die Entwicklungszeit von *Drosophila* zu bestimmen wurde sich am Protokoll aus *Rosen et al.* orientiert [96]. Hierfür wurde die Anzahl an gebildeten Puppen zu definierten Zeitpunkten nach der Eiablage bzw. nach einer Behandlung bestimmt. Die mittlere Entwicklungsdauer der Larven ist dann der Zeitpunkt, zu welchem 50 % der eingesetzten Tiere in das Puppenstadium übergegangen sind. Entsprechend wurde für die Entwicklungsdauer der Puppen die Anzahl der geschlüpften Imagines zu definierten Zeitpunkten nach der Eiablage oder Behandlung notiert. Die mittlere Entwicklungsdauer der Puppen ist dann der Zeitpunkt, zu welchem 50 % der eingesetzten Tiere als Imagines geschlüpft sind.

2.15 Lebensdauer

Für das Ansetzen der Überlebensversuche wurde sich am Protokoll aus Lindfort *et al.* orientiert [92]. Jeweils 20 bzw. 50 Männchen oder 20 bzw. 50 Jungfrauen wurden in ein Versuchsröhrchen gesetzt.

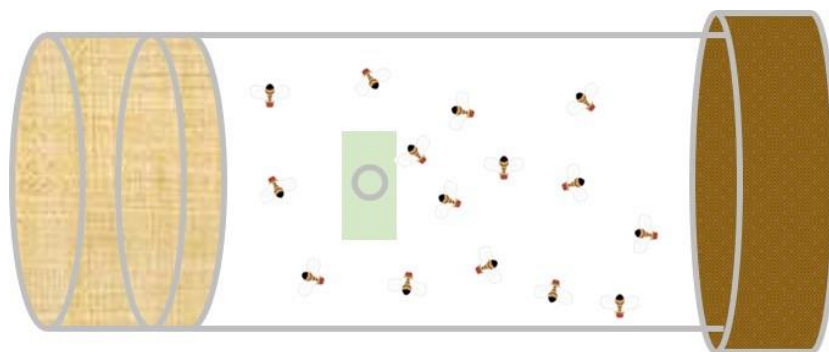


Abb. 2.5: Röhrchen für Überlebensversuche. Auf der linken Seite ist das Röhrchen mit einem Stopfen verschlossen, auf der rechten Seite befindet sich eine Petrischale mit Standardfliegenmedium. Ein kleines, abgeklebtes Loch in der Seite ermöglicht das Entfernen toter Fliegen während des Experimentes.

Die Anzahl der toten Fliegen wurde dreimal wöchentlich notiert. Tote Tiere wurden über das Loch im Röhrchen entfernt. Zusätzlich wurde an diesen Tagen das Medium gewechselt, wobei auf eine Behandlung mit CO₂ verzichtet wurde. Stattdessen wurden die Röhrchen mit dem Stopfen wiederholt auf einen Tisch geklopft, um die Fliegen unten zu halten, und die Petrischale gegen eine neue mit frischem Medium getauscht. Die Versuche endeten mit dem Tod des letzten Tieres.

2.16 Morphologie larvaler Tracheen

Um herauszufinden, ob die zu SERPINB3 bzw. SPINK5 orthologen Gene an der Trachealentwicklung von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind und ob ihre Dysregulation die Atemwegsmorphologie beeinflusst, wurden die Anzahl und Länge der Sekundärverzweigungen im dritten thorakalen Segment von L1 und L3 Larven ermittelt. Hierfür wurde sich am Protokoll von Jones und Metzstein (2013) orientiert [97].

Dafür wurden 10 Larven vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Medium geholt, in 1x PBS gewaschen und auf einem Objektträger in einen Tropfen Glycerin gelegt. Anschließend wurde der Objektträger für 15 Sekunden auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 70 °C positioniert und die Larven dadurch getötet.

Die hohe Temperatur sorgt dafür, dass sich die Larven strecken und dadurch begradigen. Zusätzlich kommt es durch die kurze Zeit der Hitze einwirkung nur zu geringen Gewebeschädigungen. So kann die physiologische Struktur der Atemwege im ganzen Tier, ohne Präparation betrachtet werden.

Im Anschluss wurden die Larven auf dem Objektträger parallel zueinander, mit der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet. Nachdem die Larven mit einem Deckgläschen bedeckt wurden, konnten die Präparate mikroskopiert (Olympus Deutschland GmbH) werden. Hierfür wurde das dritte thorakale Segment der Larven bei einer 40-fachen (L1-Larven), bzw. 20-fachen (L3-Larven) Vergrößerung fokussiert und dokumentiert. Alle Bilder wurden mit einer Skalierung versehen und als Tiff-Datei abgespeichert.

Die so entstandenen Mikroskopiebilder wurden für eine Auswertung der Anzahl und Länge der sekundären Verzweigungen verwendet. Dafür wurden die Software ImageJ mit dem Plugin NeuronJ verwendet und die Bilder wie folgt bearbeitet.

Zunächst wurden die Bilder in ImageJ geöffnet, in eine 8-bit-Version umgewandelt und der Kontrast soweit erhöht, bis die sekundären Äste gut vom Hintergrund unterscheidbar waren

(ca. 1,5 - 2 %). Alle bearbeiteten Bilder wurden erneut als Tiff-Datei abgespeichert und konnten so in NeuronJ verarbeitet werden.

Hierfür wurde das Plugin NeuronJ gestartet und die Bilder geöffnet. Über die Funktion „*Tracking*“ konnten die sekundären Äste erfasst und vermessen werden. Die zuvor verwendete Skalierung der Bilder wurde hierbei als Grundlage für die Messung verwendet. Zusätzlich wurde für alle entstandenen Mikroskopiebilder die Gesamtzahl an sekundären Ästen notiert.

3 Ergebnisse

3.1 Serinproteaseinhibitoren in *Drosophila melanogaster*

3.1.1 *Drosophila*-Gene *spn43Aa* und *CG14933* werden als Orthologe der humanen Serpingene SERPINB3 und SPINK5 ausgewählt

Zu Beginn der Arbeit wurden die zu den humanen Genen SERPINB3 und SPINK5 orthologen Gene in *Drosophila melanogaster* ermittelt. Erste Kandidaten für die beiden Gene wurden mittels der Datenbank Flybase bestimmt, welche 27 mögliche Orthologe für SERPINB3 und 17 für SPINK5 in *Drosophila* auflistet. Da beide humanen Serpine eine Inhibitor-Aktivität besitzen, wurden bereits 10 (SERPINB3) bzw. 7 (SPINK5) Kandidaten anhand der fehlenden Inhibitorfunktion aussortiert. Von den Übrigen wurden anhand der Aminosäuresequenz ausschließlich Kandidaten mit einem Identitätswert über 30 % (Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) der Datenbank NCBI) für die weitere Auswertung in Betracht gezogen.

Nach diesem Auswahlverfahren wurden als mögliche Kandidaten für SERPINB3 die *Drosophila*-Gene *spn27A*, *spn28F*, *spn38F*, *spn42Da*, *spn42Db*, *spn42Dc*, *spn42Dd*, *spn42De*, *spn43Aa*, *spn55B* identifiziert (Abb. 3.1). *CG14933*, *CG13704*, *CG32354*, *CG44008* und *CG45011* wurden als orthologe Gene von SPINK5 festgelegt (Abb. 3.2). Von den so identifizierten Kandidatengenen wurde das Expressionsniveau in isolierten Atemwegen aus L3-Larven des Laborwildtyps CantonS mittels quantitativer *Realtime*-PCR (qRT-PCR) bestimmt. In den Abbildungen 3.1 und 3.2 ist das Expressionsniveau der Orthologe für SERPINB3 bzw. SPINK5 als mittlerer CP-Wert in ganzen Larven und isolierten larvalen Tracheen sowie der Wert der Aminosäure-Sequenzhomologie dargestellt. Je niedriger der ermittelte Wert des CPs ist, desto höher ist die Expression des jeweiligen Gens.

Anschließend wurden die Kandidatengene mit dem höchsten Expressionsniveau in den larvalen Atemwegen ausgewählt - das SERPINB3-Ortholog *spn43Aa* (mittlerer CP-Wert in isolierten Tracheen: 21,15) und das SPINK5-Ortholog *CG14933* (mittlerer CP-Wert in isolierten Tracheen: 23,45). Diese Orthologe wurden im weiteren Verlauf der Arbeit hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Atemwegsentwicklung und Fitness von *Drosophila* untersucht. Zu diesem Zweck wurden Fliegenlinien zur ektopischen Expression (RNAi/ Überexpression) von *spn43Aa* und *CG14933* eingesetzt.

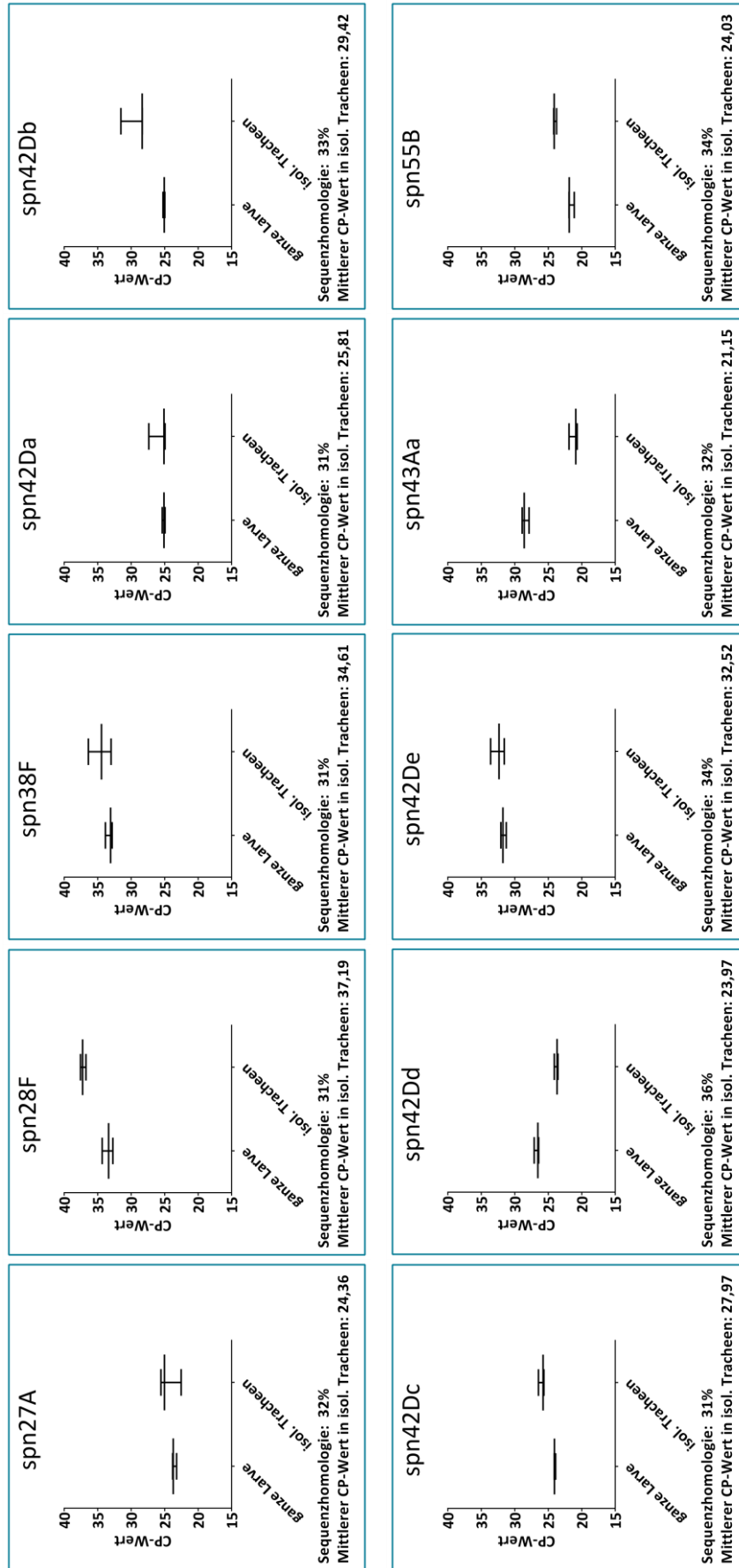


Abb. 3.1: Expressionslevel ausgewählter Orthologe des humanen Serpingens SERPINB3 in *Drosophila melanogaster*. Kandidatengene wurden aufgrund ihrer Inhibitor-Aktivität und eines Sequenzhomologiewertes > 30 % (NCBI-BLAST) ausgewählt. Dargestellt ist der mittlere CP-Wert in ganzen L3-Larven und isolierten Tracheen des Labortyps Cantons, gemessen mittels qRT-PCR, sowie der prozentuale Sequenzhomologiewert zum humanen SPINK5. N = 3 biologische Replikate, aus je 10 ganzen Larven bzw. 40 Tracheen pro Replikat. Median ± Min/Max, *ratio-paired t-test*.

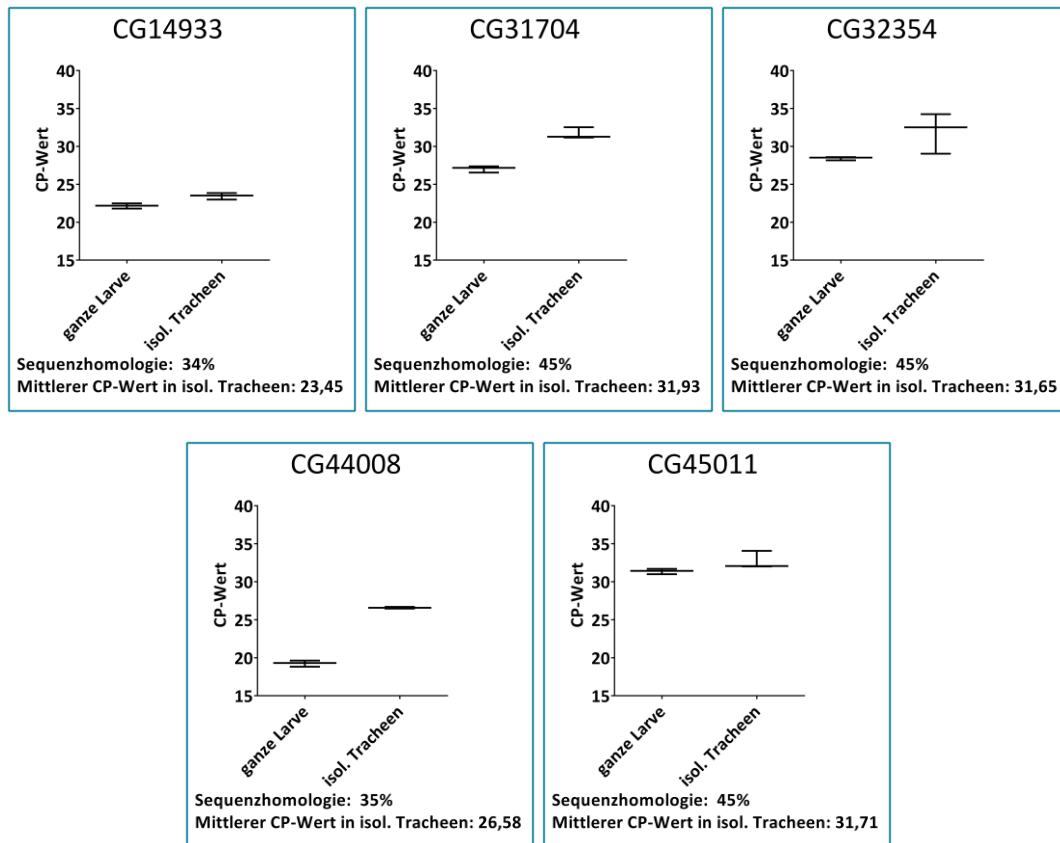


Abb. 3.2: Expressionslevel ausgewählter Orthologe des humanen Serpingens SPINK5 in *Drosophila melanogaster*. Kandidatengene wurden aufgrund ihrer Inhibitor-Aktivität und eines Sequenzhomologiewertes > 30 % (NCBI-BLAST) ausgewählt. Dargestellt ist der mittlere CP-Wert in ganzen L3-Larven und isolierten Tracheen des Laborwildtyps CantonS, gemessen mittels qRT-PCR sowie der prozentuale Sequenzhomologiewert zum humanen SPINK5. N = 3 biologische Replikate, aus je 10 ganzen Larven bzw. 40 Tracheen pro Replikat. Median \pm Min/Max, *ratio-paired t-test*.

3.1.2 Die Expression der Serpingene *spn43Aa* und *CG14933* lässt sich mit Hilfe transgener Fliegenlinien in larvalen Atemwegen effektiv regulieren

Jungfräuliche Weibchen der RNAi-UAS- und UAS-ORF-Linien von *spn43Aa* (SERPINB3-Ortholog) und *CG14933* (SPINK5-Ortholog) sowie eine genetische Kontrolllinie wurden zur gezielten Modulation des Expressionslevels in Atemwegen mit Männchen einer atemwegsspezifischen GAL4-Treiberlinie (*ppk4-GAL4*) verpaart. In den Nachkommen dieser Kreuzungen ist die Expression des jeweiligen Zielgens spezifisch in den Atemwegen entweder herunterreguliert (engl.: *knockdown*; RNAi-UAS) oder verstärkt (UAS-ORF). In der entsprechenden Kontrolllinie ist das Expressionslevel nicht verändert und gleicht dem von Wildtyp-Fliegen.

Um die Effizienz des *Knockdowns* (KD) und der Überexpression (ÜE) zu bestimmen, wurden die Expressionsniveaus von *spn43Aa* und *CG14933* in präparierten Tracheen aus frühen (Tag 4 nach Eiablage) und späten L3-Larven (Tag 5 nach Eiablage) mittels qRT-PCR gemessen.

An Tag 4 besitzt die *spn43Aa*-KD-Linie eine *Knockdown*-Effizienz von 90 % (Abb. 3.3 A) im Vergleich zur genetischen Kontrolle, an Tag 5 von 50 % (Abb. 3.3 C). In den Tracheen der *spn43Aa*-überexprimierenden Linie ist die Expression an Tag 4 nach der Eiablage um 330000 % erhöht (Abb. 3.3 B), wohingegen an Tag 5 nach der Eiablage keine Überexpression vorhanden ist (Abb. 3.3 D). Stattdessen ist die Expression von *spn43Aa* um 25 % reduziert.

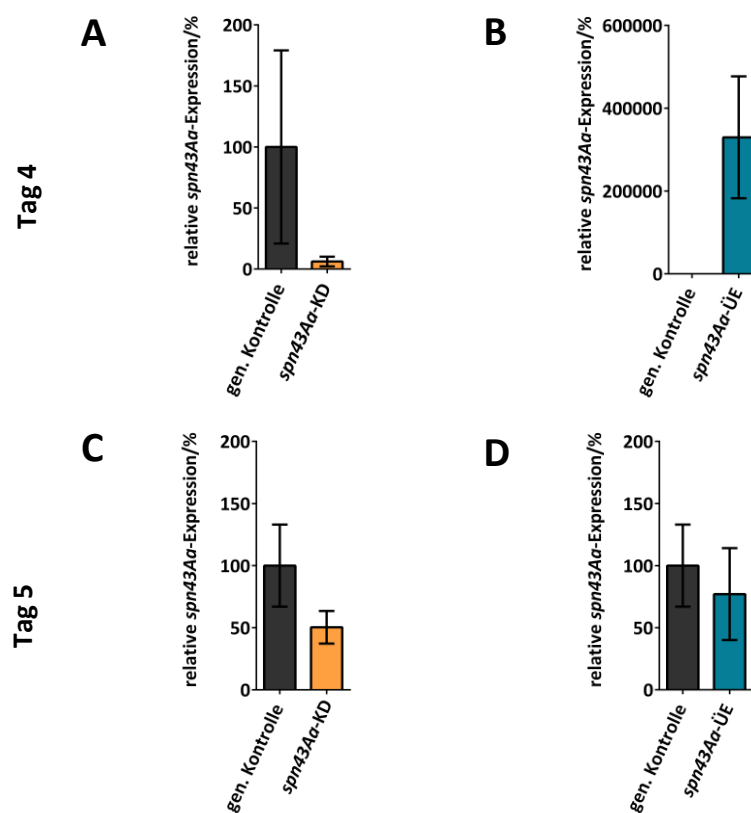


Abb. 3.3: Nachweis der reduzierten Expression (KD) und Überexpression (ÜE) von *spn43Aa* in isolierten Tracheen der jeweiligen Modelllinien. Gezeigt ist die zum Haushaltsgen *RpL32* relative Expression von *spn43Aa* an Tag 4 (A, B) und Tag 5 (C, D) nach der Eiablage in isolierten larvalen Tracheen der *Knockdown*-Linie (A, C) und Überexpressionslinie (B, D) verglichen mit der genetischen Kontrolle in Prozent. N = 3 biologische Replikate, 40 Tracheen pro Replikate. Mittelwert \pm SEM, *ratio-paired t-test*.

Für das SPINK5-Ortholog *CG14933* ist die atemwegspezifische Expression in der RNAi-*Knockdown*-Linie an Tag 4 um 30 % (Abb. 3.4 A), an Tag 5 um 60 % im Vergleich zur genetischen Kontrolle reduziert (Abb. 3.4 C). Die Überexpressionslinie weist an Tag 4 und Tag 5 nach der Eiablage eine 1,4-fach erhöhte Expression auf (Abb. 3.4 B, D).

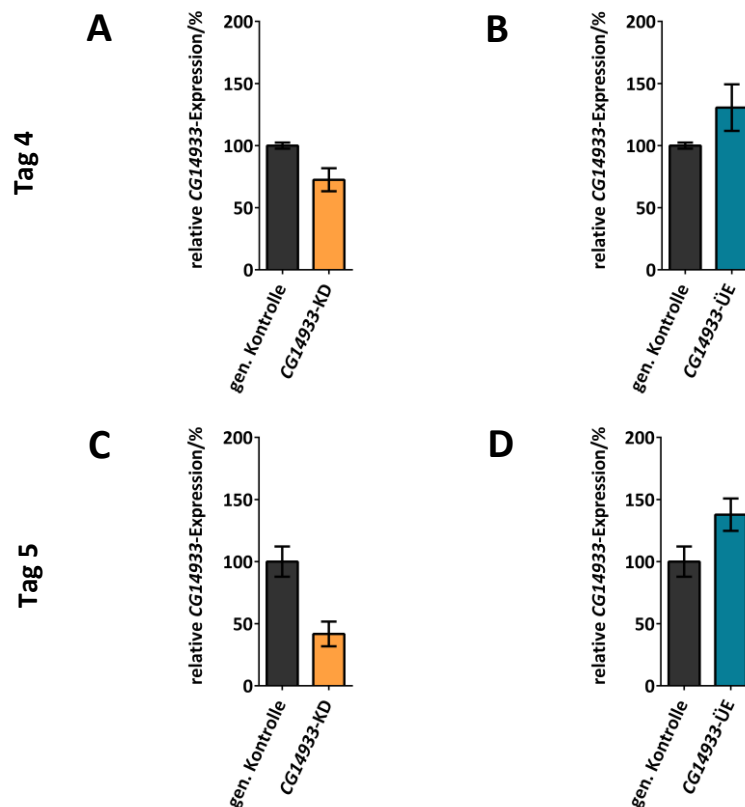


Abb. 3.4: Nachweis der reduzierten Expression (KD) und Überexpression (ÜE) von *CG14933* in isolierten Tracheen der jeweiligen Modelllinien. Gezeigt ist die zum Haushaltsgen *RpL32* relative Expression von *CG14933* an Tag 4 (A, B) und Tag 5 (C, D) nach der Eiablage in isolierten larvalen Tracheen der *Knockdown*-Linie (A, C) und Überexpressionslinie (B, D) verglichen mit der genetischen Kontrolle in Prozent. N = 3 biologische Replikate, 40 Tracheen pro Replikate. Mittelwert \pm SEM. *ratio-paired t-test*.

3.2 Charakterisierung des Fliegenmodells zum Serpingen *spn43Aa*

Zunächst wurde der Einfluss einer Modulation der Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster* anhand Tracheenmorphologie, sowie Überlebensrate, Entwicklungs- und Überlebenszeit unter Standardbedingungen (Standardmedium, 25 °C, Luftfeuchtigkeit 65 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12:12) charakterisiert.

3.2.1 Larven mit erhöhter Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen bilden mehr sekundäre Atemwegsäste aus

Um herauszufinden, ob *spn43Aa* an der Trachealentwicklung in *Drosophila*-Larven beteiligt ist und wie seine modifizierte Expression die Atemwegsmorphologie beeinflusst, wurden die Anzahl und Länge der Sekundäräste im dritten thorakalen Segment von Larven des 1. und 3. Larvenstadiums gemessen (24 Stunden bzw. 5 Tage nach Eiablage; Abb. 3.5).

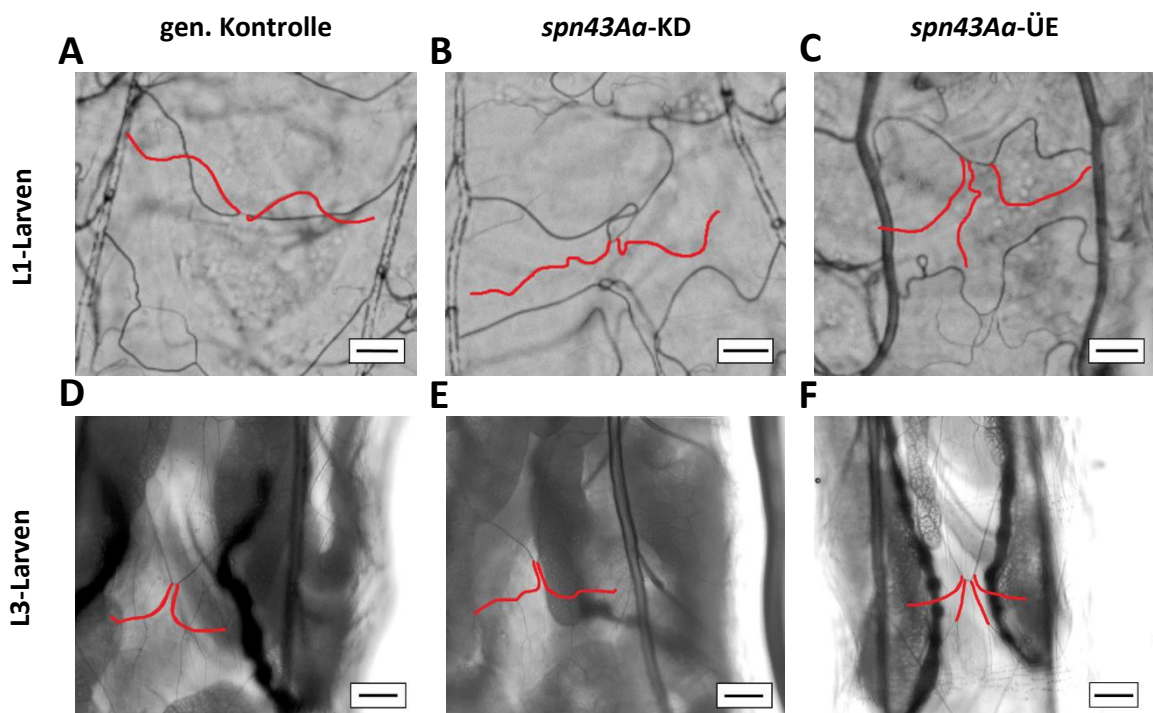


Abb. 3.5: Durchlichtmikroskopische Darstellung der sekundären Äste des dritten thorakalen Segments in Larven des 1. und 3. Stadiums mit modulierter *spn43Aa*-Expression. Dargestellt sind die sekundären Äste (rot) in L1- (A - C) und L3-Larven (D - F) der genetischen Kontrolle (A, D), der *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (B, E) und der Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (C, F). Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 20 μm (A - C) bzw. 100 μm (D - F).

In Larven der genetischen Kontrolllinie verzweigen sich die primären Atemwegsstränge in jeweils zwei sekundäre Äste. Die atemwegspezifische Überexpression von *spn43Aa* führt zu

einer signifikant erhöhten Anzahl von Sekundärästen in Tieren des 1. und 3. Larvenstadiums (Abb. 3.6 A, C).

Tabelle 3.1: Anzahl sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit reduzierter (*spn43Aa*-KD) oder erhöhter (*spn43Aa*-ÜE) *spn43Aa*-Expression

Larvenstadium	Fliegenlinie	Anteil der Larven mit x sekundären Ästen/%		
		x=2	x=3	x=4
L1	gen. Kontrolle	100	0	0
	<i>spn43Aa</i> -KD	100	0	0
	<i>spn43Aa</i> -ÜE	60	40	0
L3	gen. Kontrolle	100	0	0
	<i>spn43Aa</i> -KD	100	0	0
	<i>spn43Aa</i> -ÜE	44,2	43,3	12,5

Der gemessene der Effekt ist stärker in L3-Larven. In diesem Stadium besitzen 43,3 % der Tiere drei, 12,5 % der Tiere sogar vier sekundäre Äste.

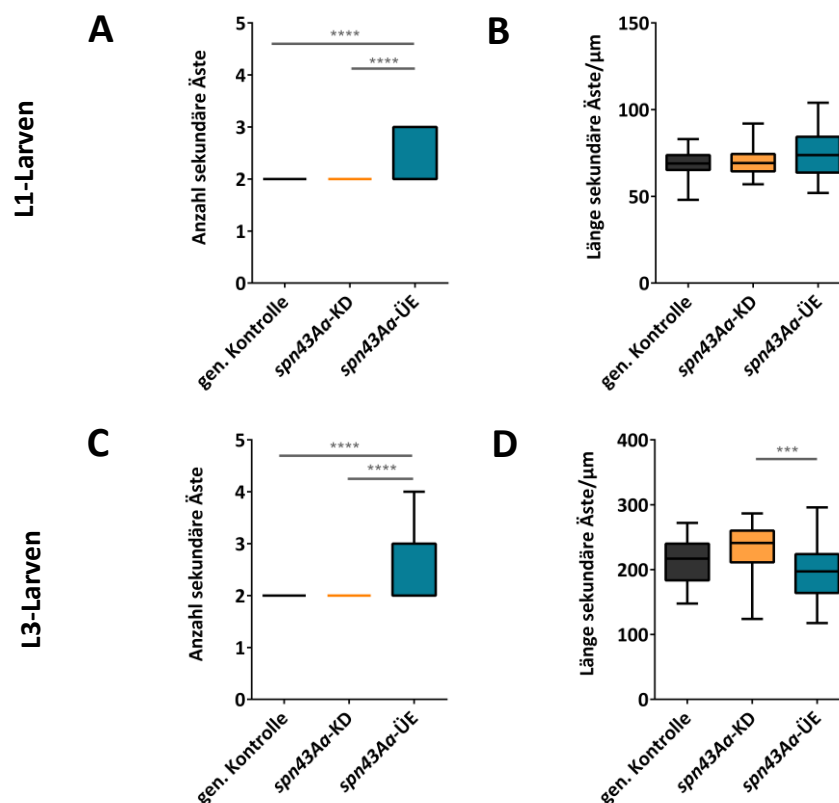


Abb. 3.6: Morphologie sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit veränderter *spn43Aa*-Expression. Dargestellt sind die Anzahl (A, C) und Länge (B, D) der sekundären Äste des 3. thorakalen Segments in L1- (A - B) und L3-Larven (C - D) der genetischen Kontrolle, *spn43Aa*-KD und *spn43Aa*-ÜE. N = 3 biologische Replikate, 10 mikroskopierte Larven pro Replikat. Median ± Min/Max, one-way-ANOVA, *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

Darüber hinaus verringert die Überexpression von *spn43Aa* die Länge der sekundären Zweige in Larven des dritten Stadiums, die gemessene Differenz ist jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 3.6 D; gen. Kontrolle: MW 212,4 μm ; *spn43Aa*-ÜE: MW 193,5 μm). Wohingegen in L3-Larven, bei welchen die Expression von *spn43Aa* in den Epithelzellen der Atemwege reduziert wurde, die Länge der Äste zunimmt (Abb. 3.6 D; gen. Kontrolle: MW 212,4 μm ; *spn43Aa*-KD: MW 234,0 μm). Hier ist die gemessene Differenz ebenfalls nicht statistisch signifikant. In Larven des ersten Stadiums haben weder der *Knockdown* noch die Überexpression von *spn43Aa* einen messbaren Einfluss auf die Länge der sekundären Äste (Abb. 3.6 B; gen. Kontrolle: MW 69,18 μm ; *spn43Aa*-KD: MW 70,21 μm ; *spn43Aa*-ÜE: MW 74,15 μm).

3.2.2 Die Überlebensrate von Larven mit erhöhter *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen ist reduziert

Der Einfluss einer veränderten Expression von *spn43Aa* auf die Überlebensrate von *Drosophila* vor Beginn und während der Metamorphose wurde anhand der Anzahl an gebildeten Puppen (Abb. 3.7 A) und geschlüpften Imagines (Abb. 3.7 B) ermittelt. Bezogen auf die ursprüngliche Anzahl eingesetzter Larven ergeben diese beiden Werte die Anzahl an gestorbenen Tieren vor Eintritt in die Metamorphose bzw. während des Puppenstadiums.

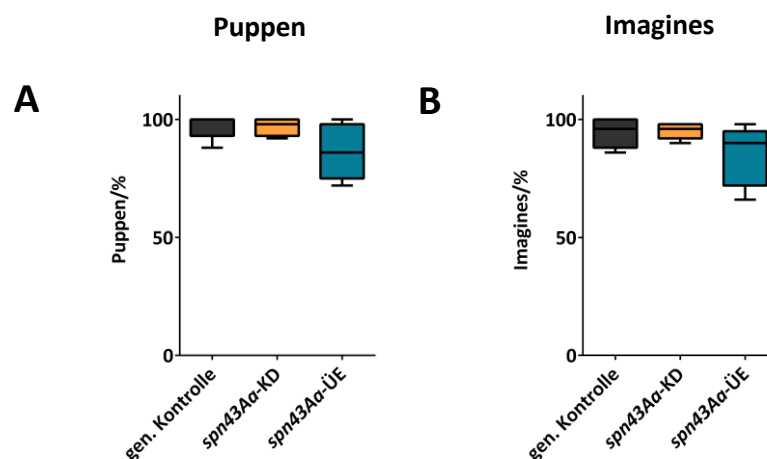


Abb. 3.7: Überlebensrate von *Drosophila* mit modifizierter *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Puppen (A) und Imagines (B) der genetischen Kontrolle, der *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE, bezogen auf die Anzahl ursprünglich eingesetzter Tiere. N = 5 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Median \pm Min/Max, one-way-ANOVA.

Während ein reduzierter Expressionslevel von *spn43Aa* keinen Einfluss auf die Anzahl an gebildeten Puppen hat (gen. Kontrolle: MW 97,2 %; *spn43Aa*-KD: MW 96,80 %), führt eine

Überexpression von *spn43Aa* zu einer statistisch nicht signifikanten, reduzierten Anzahl an Larven, welche erfolgreich in das Puppenstadium übergegangen sind (Abb. 3.7 A; gen. Kontrolle: MW 97,20 %; *spn43Aa*-ÜE: MW 86,40 %). Dabei ist die errechnete Varianz in diese Gruppe mit einer Standardabweichung von 11,78 % im Vergleich zur genetischen Kontrolle (SD: 5,215 %) zweifach so hoch. Für die Überlebensrate der Puppen, d. h. die Anzahl an tatsächlich geschlüpften Imagines (Abb. 3.7 B), verringert sich dieser Wert nur geringfügig (gen. Kontrolle: MW 94,40 %; *spn43Aa*-ÜE: MW 84,80 %). Eine reduzierte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen hat auf die Anzahl an geschlüpften Imagines ebenfalls keinen Effekt (gen. Kontrolle: MW 94,40 %; *spn43Aa*-KD: MW 95,20 %).

3.2.3 Larven und Puppen mit modifizierter Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen benötigen mehr Zeit für ihre Entwicklung

Um den potentiellen Einfluss des *Knockdowns* bzw. der Überexpression von *spn43Aa* in den Atemwegen auf die Entwicklungszeit von *Drosophila* zu untersuchen, wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Eiablage die Dauer der Larvenentwicklung anhand der Anzahl gebildeter brauner Puppen und die Dauer der Metamorphose anhand der Anzahl geschlüpfter Imagines bestimmt.

Tiere mit einer modulierten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen weisen allgemein eine Entwicklungsverzögerung sowohl von Larven als auch von Puppen auf. In der genetischen Kontrollgruppe haben sich 5,25 Tage nach der Eiablage bereits aus 40 % der eingesetzten Larven Puppen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt sind 16 % der Larven mit einer reduzierten *spn43Aa*-Expression (Abb. 3.8 A) sowie 14 % der Larven mit einer erhöhten *spn43Aa*-Expression (Abb. 3.8 C) in das Puppenstadium übergegangen.

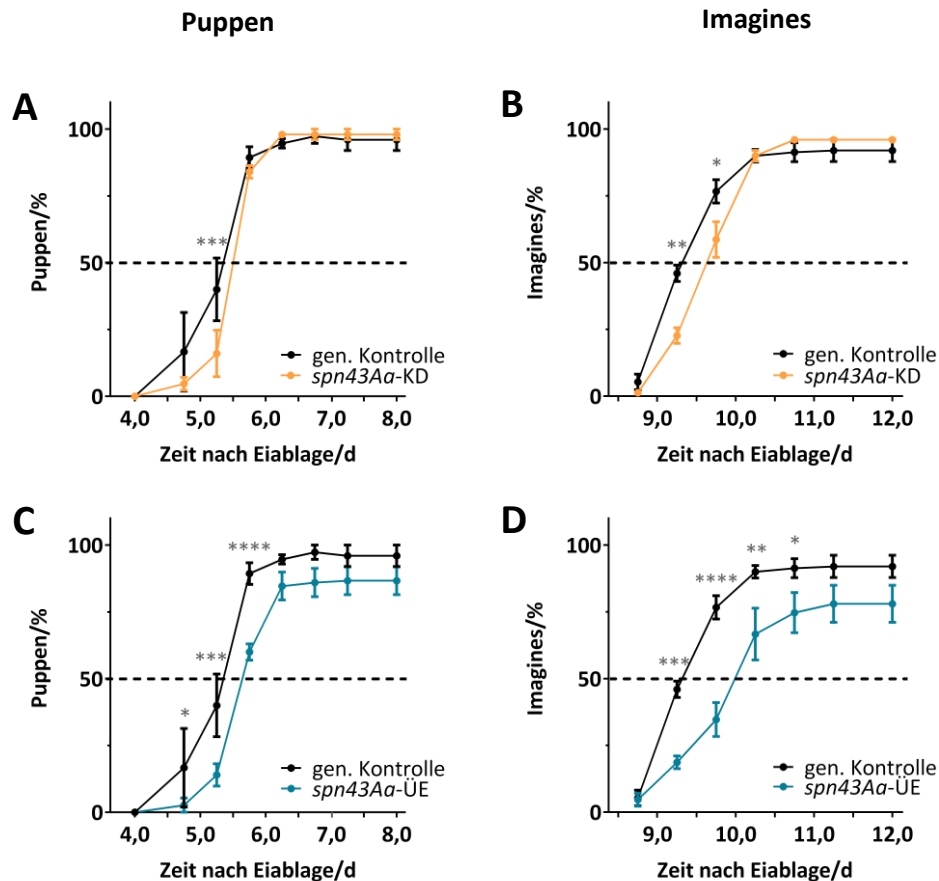


Abb. 3.8: Einfluss einer atemwegsspezifischen Modulation der *spn43Aa*-Expression auf die Entwicklungsdauer von *Drosophila*. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Puppen (A, C) und geschlüpfter Imagines (B, D) der *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (A - B) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (B - D) zu definierten Zeitpunkten nach der Eiablage verglichen mit der genetischen Kontrolle. N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert \pm SEM, *two-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

Das Schlüpfen der adulten Fliegen, das heißt die Dauer der Metamorphose, ist für beide transgenen Linien ebenfalls zeitlich verzögert. Aus den Puppen der genetischen Kontrollgruppe sind 9,25 Tage nach der Eiablage bereits 46 % der adulten Fliegen geschlüpft, einen halben Tag später (9,75 Tage) bereits 77 %. Für die *spn43Aa*-*Knockdown*-Linie sind die Werte zu beiden Zeitpunkten signifikant geringer. In der Gruppe mit reduzierter *spn43Aa*-Expression haben sich nach 9,25 Tagen 23 %, nach 9,75 Tage 59 % der Puppen zu adulten Fliegen entwickelt (Abb. 3.8 B, B). Der Effekt ist bei Tieren mit einer erhöhten *spn43Aa*-Expression noch verstärkt. Zu diesen beiden Zeitpunkten sind aus den gebildeten Puppen 19 % bzw. 35 % der adulten Fliegen geschlüpft (Abb. 3.8 B, D).

3.2.4 Imagines mit reduzierter *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen sterben früher

Schließlich wurde die Lebenszeit der adulten Fliegen ermittelt. Hierfür wurde die Anzahl an toten Fliegen über einen Zeitraum von 100 Tagen notiert. Tiere der genetischen Kontrollgruppe haben eine Lebenszeit von bis zu 70 (Männchen) bzw. 80 (Weibchen) Tagen. Eine veränderte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen führt in Weibchen sowohl bei *Knockdown* als auch Überexpression des Gens zu einer signifikant reduzierten maximalen Überlebenszeit (Abb. 3.9 B; gen. Kontrolle: 80 Tage, *spn43Aa*-KD: 72 Tage, *spn43Aa*-ÜE: 74 Tage).

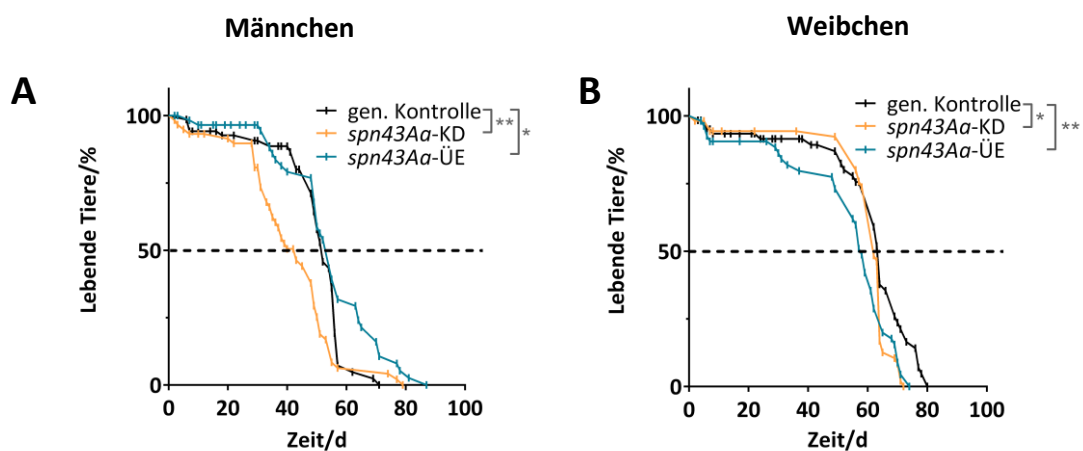


Abb. 3.9: Überlebensdauer von *Drosophila*-Imagines mit modifizierter *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen. Anzahl lebender Männchen (A) und Weibchen (B) über die Zeit für die genetische Kontrolllinie (schwarz), die *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (orange) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (blau). N = 3 biologische Replikate, 20 Tiere pro Replikat. Kaplan-Meier-Kurve, Log-rank mit Mantel-Cox Test, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001.

Bei männlichen Fliegen tritt durch Modulation der *spn43Aa*-Expression ein differenzierterer Effekt auf die Überlebensdauer auf (Abb. 3.9 A). Eine Überexpression von *spn43Aa* in den Atemwegen verlängert die maximale Gesamtlebensdauer der Männchen (gen. Kontrolle: 71 Tage, *spn43Aa*-ÜE: 87 Tage). Bei einer reduzierten Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen ist die mittlere Überlebensdauer, definiert als Zeitpunkt zu welchem 50 % der Tiere gestorben sind, jedoch verkürzt (gen. Kontrolle: 52 Tage, *spn43Aa*-KD: 43 Tage).

3.3 Charakterisierung des Fliegenmodells zum Serpingen *CG14933*

Wie zuvor für das Serpingen *spn43Aa* wird gleichermaßen für das SPINK5-Ortholog *CG14933* der Einfluss eines veränderten Expressionslevels in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster* anhand der Atemwegsmorphologie sowie den Fitnessparametern Überlebensrate, Entwicklungs- und Überlebenszeit unter Standardbedingungen (Standardmedium, 25 °C, Luftfeuchtigkeit 65 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12:12) charakterisiert.

3.3.1 Larven mit modulierter *CG14933*-Expression bilden zusätzliche sekundäre Atemwegsäste aus

Um herauszufinden, ob das Serpingen *CG14933* an der Trachealentwicklung in *Drosophila* beteiligt ist, wurden auch für dieses Fliegenmodell die Anzahl und Länge der Sekundäräste im dritten thorakalen Segment von Larven des 1. und 3. Stadiums bestimmt (24 h bzw. 5 Tage nach Eiablage; Abb. 3.10).

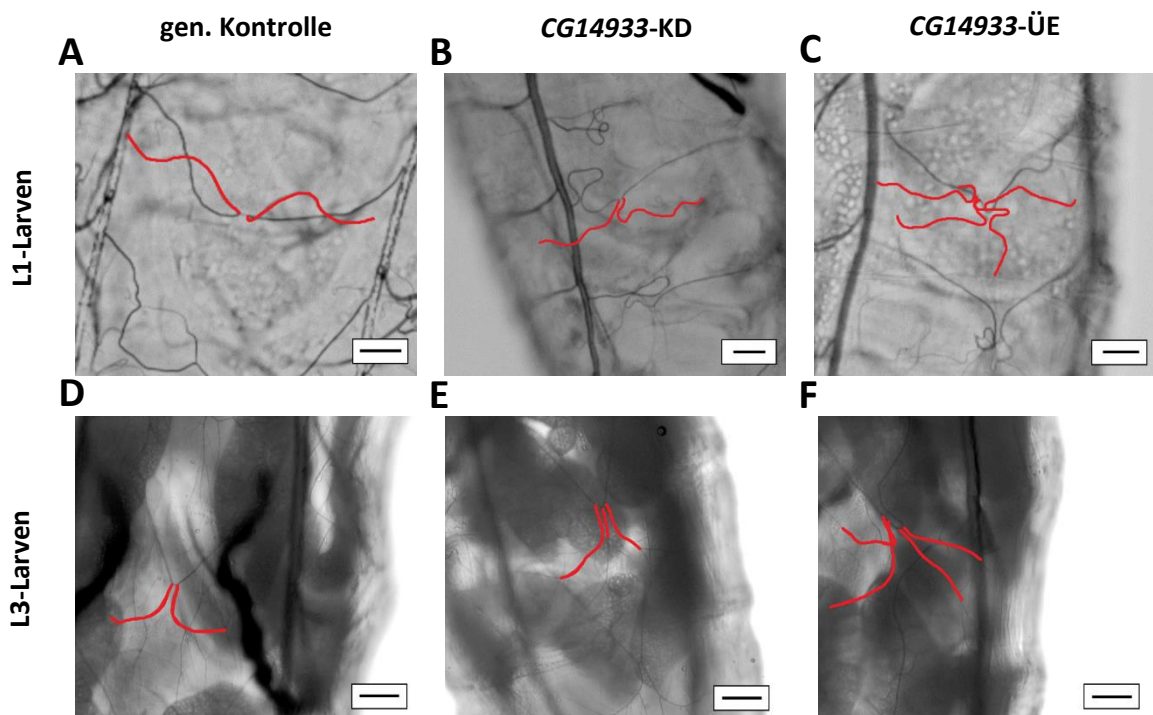


Abb. 3.10: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen sekundärer Äste des dritten thorakalen Segments in Larven des 1. und 3. Stadiums mit veränderter *CG14933*-Expression. Dargestellt sind die sekundären Äste (rot) in L1- (A - C) und L3-Larven (D - F) der genetischen Kontrolle (A, D), der *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD (B, E) und der Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE (C, F). Der dargestellte Messbalken entspricht einer Länge von 20 μm (A - C) bzw. 100 μm (D - F).

Die atemwegspezifische Überexpression des Serpingens *CG14933* führt zu einer signifikant erhöhten Anzahl von Sekundärästen in Tieren des 1. und 3. Larvenstadiums. Auch in Tieren

mit einer reduzierten Expression des Gens bilden sich zusätzliche sekundäre Atemwegsäste aus. Der Effekt ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 3.2: Anzahl sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit reduzierter (*CG14933-KD*) oder erhöhter (*CG14933-ÜE*) *CG14933*-Expression

Larven-stadium	Fliegenlinie	Anteil der Larven mit x sekundären Ästen/%		
		x=2	x=3	x=4
L1	gen. Kontrolle	100	0	0
	<i>CG14933-KD</i>	76,7	23,3	0
	<i>CG14933-ÜE</i>	43,4	43,3	13,3
L3	gen. Kontrolle	93,4	6,6	0
	<i>CG14933-KD</i>	70,1	26,6	3,3
	<i>CG14933-ÜE</i>	40	50	10

In L1-Larven mit reduzierter *CG14933*-Expression besitzen 23,3 % der Tiere drei Äste. Mit einer Überexpression von *CG14933* bilden 43,3 % aller gemessenen Larven einen zusätzlichen Ast, 13,3 % der Tiere sogar zwei zusätzliche Äste (Abb. 3.11 A).

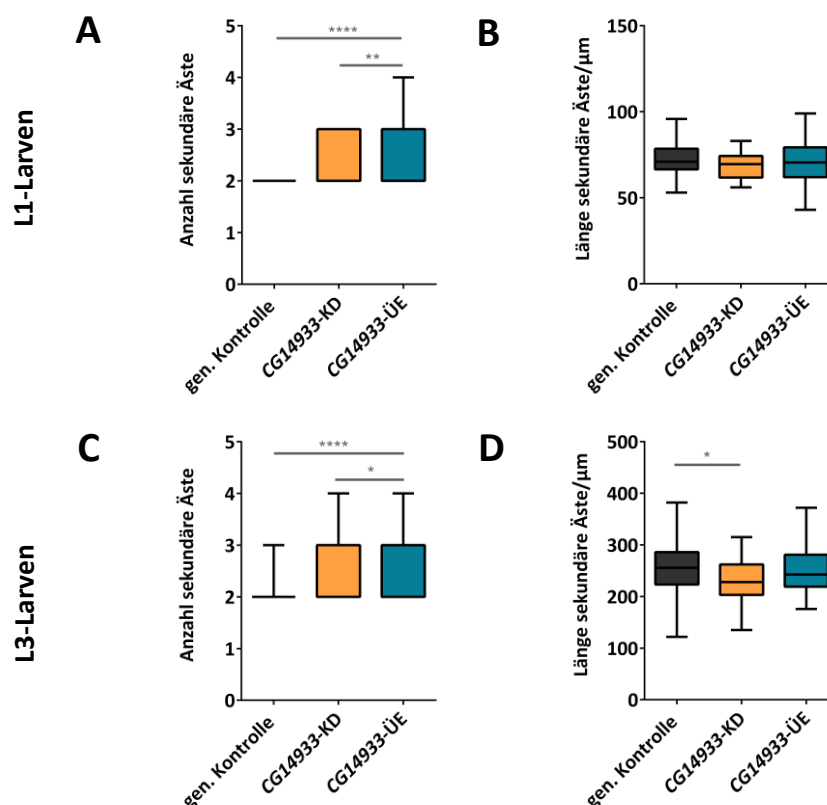


Abb. 3.11: Morphologie sekundärer Tracheenäste in Larven des 1. und 3. Stadiums mit modulierter *CG14933*-Expression. Dargestellt sind die Anzahl (A, C) und Länge (B, D) der sekundären Äste in L1- (A - B) und L3-Larven (C - D) der genetischen Kontrolle, der *Knockdown*-Linie *CG14933-KD* und der Überexpressionslinie *CG14933-ÜE*. N = 3 biologische Replikate, 10 mikroskopierte Larven pro Replikat. Median \pm Min/Max, *one-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p).

In L3-Larven ist der Einfluss auf die Morphologie noch verstärkt (Abb. 3.11 C). Hier besitzen 26,6 % der Larven mit einer reduzierten *CG14933*-Expression drei Äste, 13,3 % aller Tiere vier Äste. Tiere mit einer erhöhten Expression von *CG14933* weisen in 50 % aller gemessenen Tiere einen zusätzlichen sekundären Ast auf, 10 % der Tiere sogar zwei zusätzliche Äste. Außerdem haben zwei der 30 gemessenen L3-Larven der genetischen Kontrolle einen zusätzlichen sekundären Ast (Abb. 3.11 C). Im Hinblick auf die Länge der sekundären Äste verringert eine reduzierte Expression von *CG14933* diese in Larven des dritten Stadiums signifikant (Abb. 3.11 D; gen. Kontrolle: MW 261,3 μm ; *CG14933*-KD: MW 227,8 μm). Der Effekt ist in reduziertem Ausmaß bereits in Larven des ersten Stadiums messbar (Abb. 3.11 B; gen. Kontrolle: MW 72,53 μm ; *CG14933*-KD: MW 68,77 μm). Eine Überexpression von *CG14933* verändert die Länge der sekundären Äste nicht (Abb. 3.11 B: MW 69,95 μm ; Abb. 3.11 D: MW 248,5 μm).

3.3.2 Die Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch eine veränderte Expression von *CG14933* nicht beeinträchtigt

Vor Beginn und während der Metamorphose wurde der Einfluss einer veränderten *CG14933*-Expression in den Atemwegen auf die Überlebensrate von *Drosophila* anhand der Anzahl gebildeter Puppen und geschlüpfter Imagines ermittelt (Abb. 3.12 A, B).

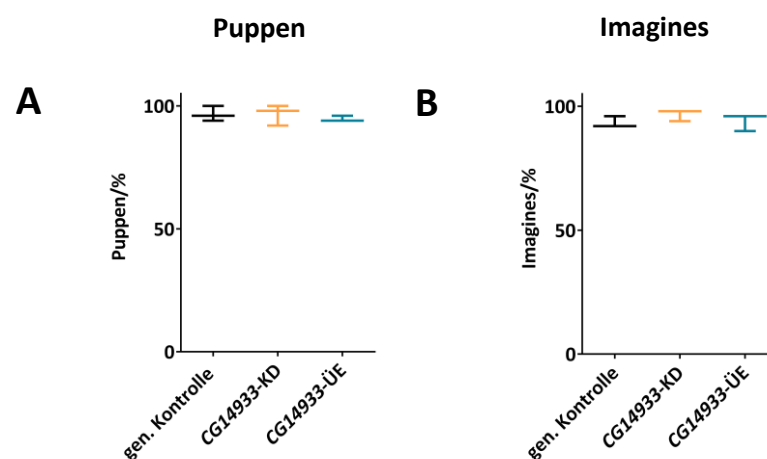


Abb. 3.12: Überlebensrate von *Drosophila* mit veränderter *CG14933*-Expression in den Atemwegen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Puppen (A) und Imagines (B) der genetischen Kontrolle, der *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD und Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE, bezogen auf die Anzahl ursprünglich eingesetzter Tiere. N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Median \pm Min/Max, one-way-ANOVA.

Die Bestimmung der Überlebensrate zeigt keinen Einfluss einer reduzierten oder verstärkten Expression von *CG14933* in den Atemwegen auf das Überleben von Puppen (Abb. 3.12 A) oder Imagines (Abb. 3.12 B).

3.3.3 Larven und Puppen mit erhöhter *CG14933*-Expression benötigen für ihre Entwicklung mehr Zeit

Nach der Eiablage wurde die Dauer der Larvenentwicklung anhand der Anzahl an gebildeten braunen Puppen und die Dauer der Metamorphose anhand der Anzahl an geschlüpften Imagines gemessen.

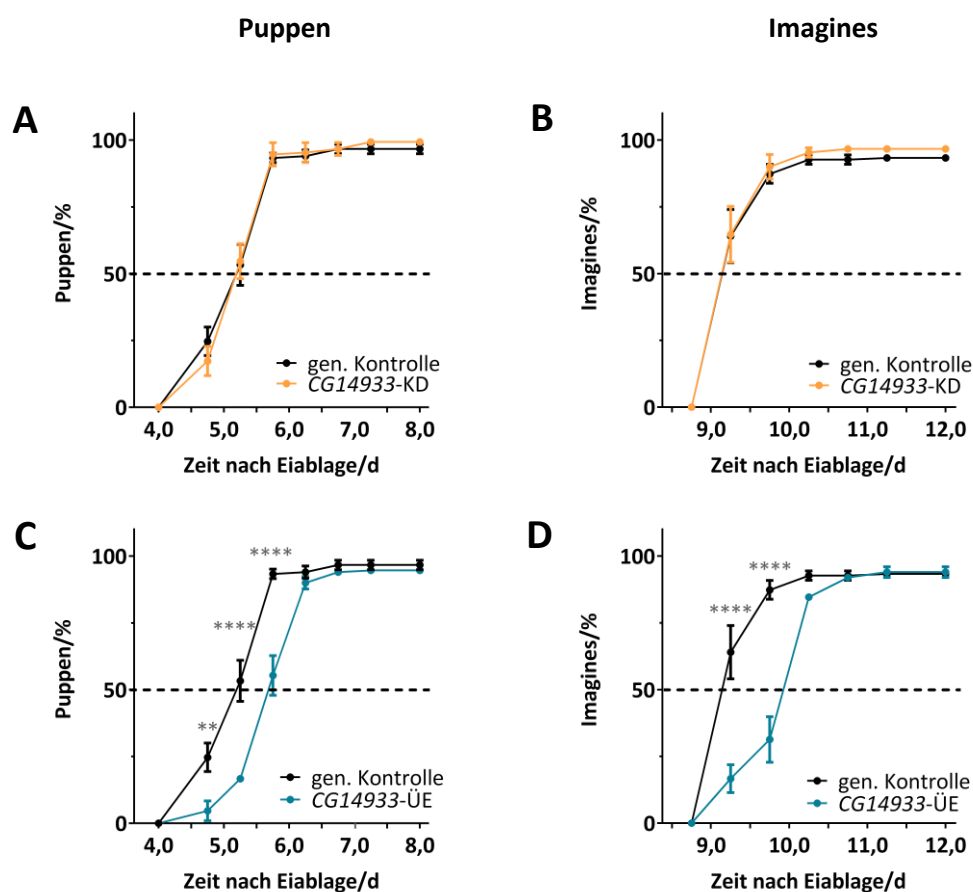


Abb. 3.13: Einfluss einer modulierten *CG14933*-Expression in den Atemwegen auf die Entwicklungsdauer von *Drosophila*. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Puppen (A, C) und geschlüpfter Imagines (B, D) zu definierten Zeitpunkten nach der Eiablage für die *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD (A - B) und Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE (C - D) jeweils verglichen mit der genetischen Kontrolle. N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert \pm SEM, *two-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

Hier ergibt sich ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Entwicklungszeit der Tiere. In der genetischen Kontrollgruppe haben sich 5,25 Tage nach der Eiablage aus 54 % der eingesetzten Larven Puppen entwickelt. Der zu diesem Zeitpunkt gemessene Wert von 55 %

gebildeter Puppen bei Tieren mit einer reduzierten *CG14933*-Expression (Abb. 3.8 A) ist zur genetischen Kontrollgruppe fast identisch. Die Überexpression von *CG14933* in den Atemwegen hat eine verzögerte Entwicklung von Larven und Puppen zur Folge (Abb. 3.13 C). Nach 5,25 Tagen haben sich aus 17 % der Larven mit einer erhöhten *CG14933*-Expression Puppen gebildet.

Der Zeitpunkt, zu dem aus den Puppen adulte Fliegen schlüpfen, ist für Tiere mit einer erhöhten *CG14933*-Expression ebenfalls zeitlich verzögert, und somit die Dauer der Metamorphose verlängert. Die genetische Kontrolllinie und die Linie mit einer reduzierten Expression von *CG14933* verhalten sich allerdings auch hier nahezu gleich. Aus den Puppen beider genetischen Gruppen sind 9,25 Tage nach der Eiablage 64 % der Imagines geschlüpft (Abb. 3.13 B). Nach 9,75 Tagen haben sich 87 % (gen. Kontrolle) bzw. 90 % (*CG14933*-KD) zu adulten Fliegen entwickelt. Für die *CG14933*-Überexpressionslinie sind die Werte zu beiden Zeitpunkten signifikant reduziert. In dieser Gruppe sind nach 9,25 Tagen 17 %, nach 9,75 Tage 31 % der Fliegen geschlüpft (Abb. 3.13 D).

3.3.4 Imagines mit erhöhter Expression von *CG1933* in den Atemwegen sterben früher

Schließlich wurde die maximale Überlebensdauer der Imagines über einen Zeitraum von 100 Tagen bestimmt. Die Tiere der genetischen Kontrollgruppe haben eine maximale Überlebenszeit von 80 Tagen.

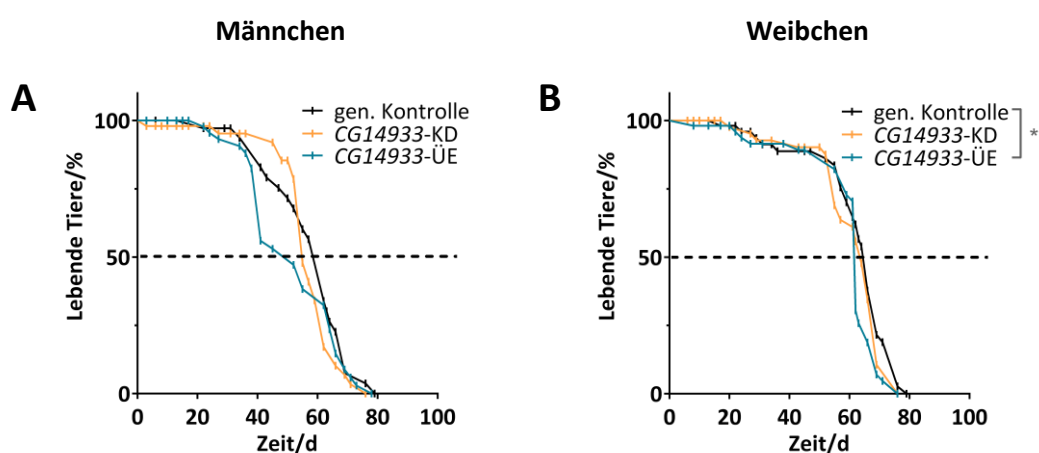


Abb. 3.14: Überlebensdauer von *Drosophila*-Imagines mit modifizierter *CG14933*-Expression in den Atemwegen. Dargestellt ist die Anzahl lebender Männchen (A) und Weibchen (B) über die Zeit für die genetische Kontrolle (schwarz), die *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD (orange) und Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE (blau). N = 3 biologische Replikate, 20 Tiere pro Replikat. Kaplan-Meier-Kurve, Log-rank mit Mantel-Cox Test, * 0,05 > p > 0,01.

Die mittlere Überlebensdauer ist als Zeitpunkt definiert, zu welchem 50 % der eingesetzten Tiere gestorben sind. Sowohl bei Männchen (Abb. 3.14 A; gen. Kontrolle: MW 62 Tage, *CG14933*-ÜE: MW 52 Tage), als auch bei Weibchen (Abb. 3.14 B; gen. Kontrolle: MW 66 Tage, *CG14933*-ÜE: MW 62 Tage) führt eine erhöhte Expression von *CG14933* in den Atemwegen zu einer reduzierten mittleren Überlebenszeit. Die gemessene Differenz ist bei den männlichen Tieren jedoch statistisch nicht signifikant.

Eine reduzierte Expression von *CG14933* in den Atemwegen hat hier keinen Einfluss auf die mittlere oder maximale Überlebensdauer von Männchen (Abb. 3.14 A) oder Weibchen (Abb. 3.14 B).

3.4 Einfluss einer veränderten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von *Drosophila melanogaster* nach Hypoxieexposition

L3-Larven mit veränderter Expression des Serpingens *spn43Aa* in den Atemwegen wurden fünf Tage nach der Eiablage für zwei Stunden hypoxischen Bedingungen (5 % O₂) ausgesetzt. Kontrolltiere wurden für den gleichen Zeitraum den normoxischen Bedingungen der Raumluft (etwa 21 % O₂) exponiert. Die folgenden Werte der Normoxiegruppe entsprechen den zuvor bereits dargestellten zur Charakterisierung der Fliegenmodelle.

Als Parameter für die Fitness der eingesetzten Fliegen wurden die Larvenaktivität, Entwicklungszeiträume und Überlebensrate nach Hypoxieexposition bewertet. Darüber hinaus wurde das Expressionslevel von *spn43Aa* in isolierten Atemwegen direkt im Anschluss an die Exposition gemessen.

3.4.1 Hypoxische Bedingungen reduzieren das Expressionslevel von *spn43Aa* in den larvalen Atemwegen

Um herauszufinden, wie hypoxische Bedingungen das Expressionsniveau von *spn43Aa* beeinflusst, wurden 40 Atemwege aus hypoxie- und normoxieexponierten Larven isoliert und die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt.

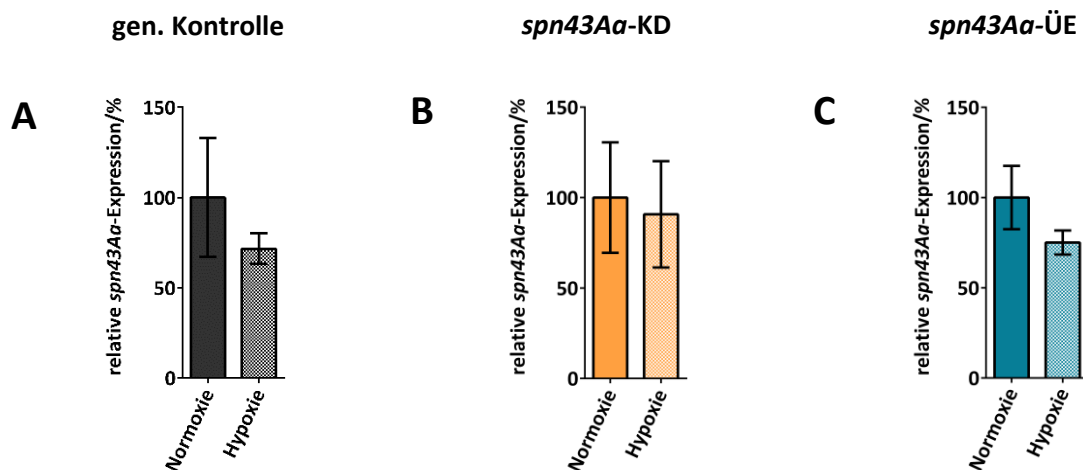


Abb. 3.15: *Spn43Aa*-Expression in isolierten larvalen Tracheen nach Hypoxieexposition. Gezeigt ist die zum Haushaltsgen *RpL32* relative Expression von *spn43Aa* in isolierten larvalen Tracheen der genetischen Kontrolle (A), *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (B) und der Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (C) nach Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h) verglichen mit der korrespondierenden Normoxiekontrolle (ca. 21 % O₂) in Prozent. N = 3 biologische Replikate, 40 isolierte Tracheen pro Replikat. Mittelwert ± SEM, *ratio-paired t-test*.

In allen drei verwendeten Genotypen führt die Hypoxieexposition zu einer Reduktion der *spn43Aa*-Expression um 30 % in der genetischen Kontrolle (Abb. 3.15 A), 10 % in der *spn43Aa*-*Knockdown*-Linie (Abb. 3.15 B) und 25 % in der *spn43Aa*-Überexpressionslinie (Abb. 3.15 C).

3.4.2 Modulation der *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen verstärkt das larvale Vermeidungsverhalten unter hypoxischen Bedingungen

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Exposition wurde die Anzahl an Larven, außerhalb des Mediums in der Hypoxie- und Normoxiegruppe bestimmt. Larven, die unter Sauerstoffmangel leiden, verändern ihr Verhalten und beginnen an der Wand des Kulturröhrchens empor zu kriechen. Dieses Vermeidungsverhalten kann als messbarer Wert für den hypoxischen Stress der Tiere verwendet werden.

Hinsichtlich des Verhaltens der Larven zeigt sich bereits innerhalb der Normoxiegruppe ein Unterschied bei den verschiedenen Genotypen (Abb. 3.16 A-C). Während des gesamten Experiments ist die Anzahl der Larven außerhalb des Mediums in der genetischen Kontrolllinie höher (20 bis 30 % aller Tiere), verglichen mit beiden transgenen Linien (*spn43Aa*-KD: 5-10 %, *spn43Aa*-ÜE: 5-10 %). Zwischen dem Verhalten der Überexpressions- und *Knockdown*-Linie von *spn43Aa* besteht kein Unterschied in der Normoxiegruppe.

Tiere, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden, beginnen innerhalb der ersten fünf Minuten der Exposition aus dem Futtermedium zu kriechen. In den ersten zwanzig Minuten ist der gemessene Wert für alle drei genetischen Gruppen gleich. Etwa 60 % aller Tiere befinden sich außerhalb des Mediums. Anschließend reagieren die drei genetischen Linien unterschiedlich auf die weiterhin anhaltenden hypoxischen Bedingungen. Während der Wert für die genetische Kontrolllinie stabil bleibt (nach 120 min Exposition 50 % der Tiere außerhalb des Mediums), zeigen die Kurven der beide transgenen Fliegenlinien einen Rückgang auf etwa 40 % für die *Knockdown*-Linie und 30 % für die Überexpressionslinie nach 120 min Exposition. Deutlicher wird dieser Unterschied in der Reaktion der untersuchten Linien auf die Hypoxieexposition nach Normalisierung der Werte auf ihre jeweiligen normoxieexponierten Äquivalente (Abb. 3.16 D).

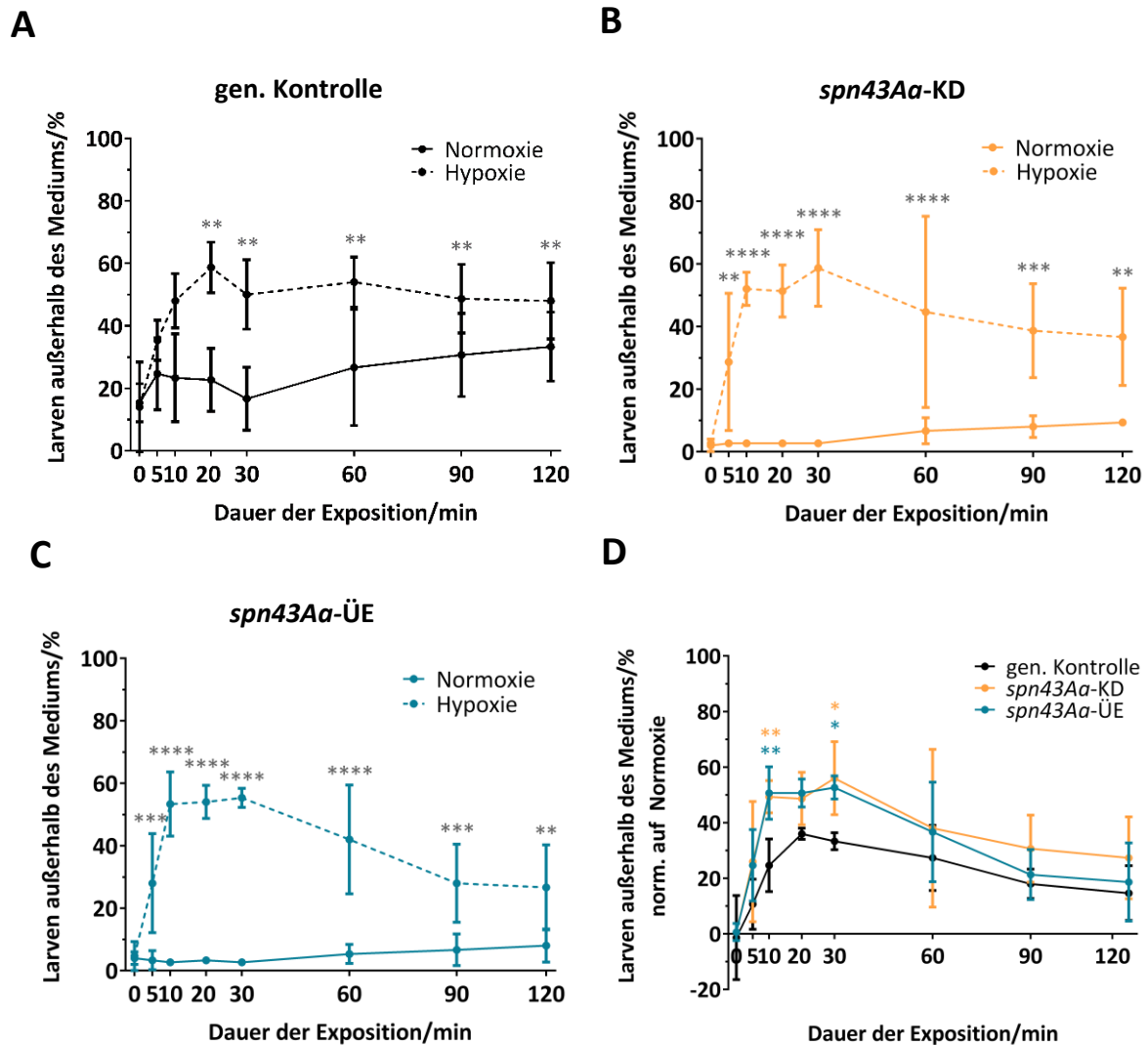


Abb. 3.16: Einfluss einer veränderten *spn43Aa*-Expression auf das Larvenverhalten unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt ist die Anzahl an Larven außerhalb des Mediums zu definierten Zeitpunkten während der Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h) bzw. Normoxieexposition (ca. 21% O₂) für die genetische Kontrolle (A), die *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (B) und die Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (C) in Prozent. (D) zeigt die Anzahl an Larven außerhalb des Mediums normalisiert auf die jeweilige Normoxiegruppe (schwarz: genetischen Kontrolle, orange: *spn43Aa*-KD, blau: *spn43Aa*-ÜE). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert ± SEM, two-way-ANOVA, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

Eine veränderte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen führt in beiden Linien zu einer erhöhten Reaktion auf die Hypoxie im Vergleich zu der genetischen Kontrolle. Zu den gemessenen Zeitpunkten 10, 20 und 30 min befinden sich im Vergleich zur genetischen Kontrolle bis zu 50 % mehr Larven der transgenen Linien außerhalb des Mediums. Während sich die Kurve der *spn43Aa*-überexprimierenden Larven mit 18,6 % nach 90 min in etwa an die genetische Kontrolle (14,6 %) annähert, bleibt die Anzahl an Larven außerhalb des Mediums für die Linie mit reduzierter *spn43Aa*-Expression mit 27,3 % weiter erhöht.

3.4.3 Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch Hypoxieexposition nicht beeinflusst

Nach der Hypoxieexposition wurde die Überlebensrate der Tiere vor Beginn und während der Metamorphose anhand der Anzahl an gebildeten braunen Puppen und geschlüpften Imagines ermittelt. Bezogen auf die ursprüngliche Anzahl eingesetzter Tiere ergeben diese beiden Werte die Anzahl an gestorbenen Larven vor Eintritt in die Metamorphose bzw. während des Puppenstadiums.

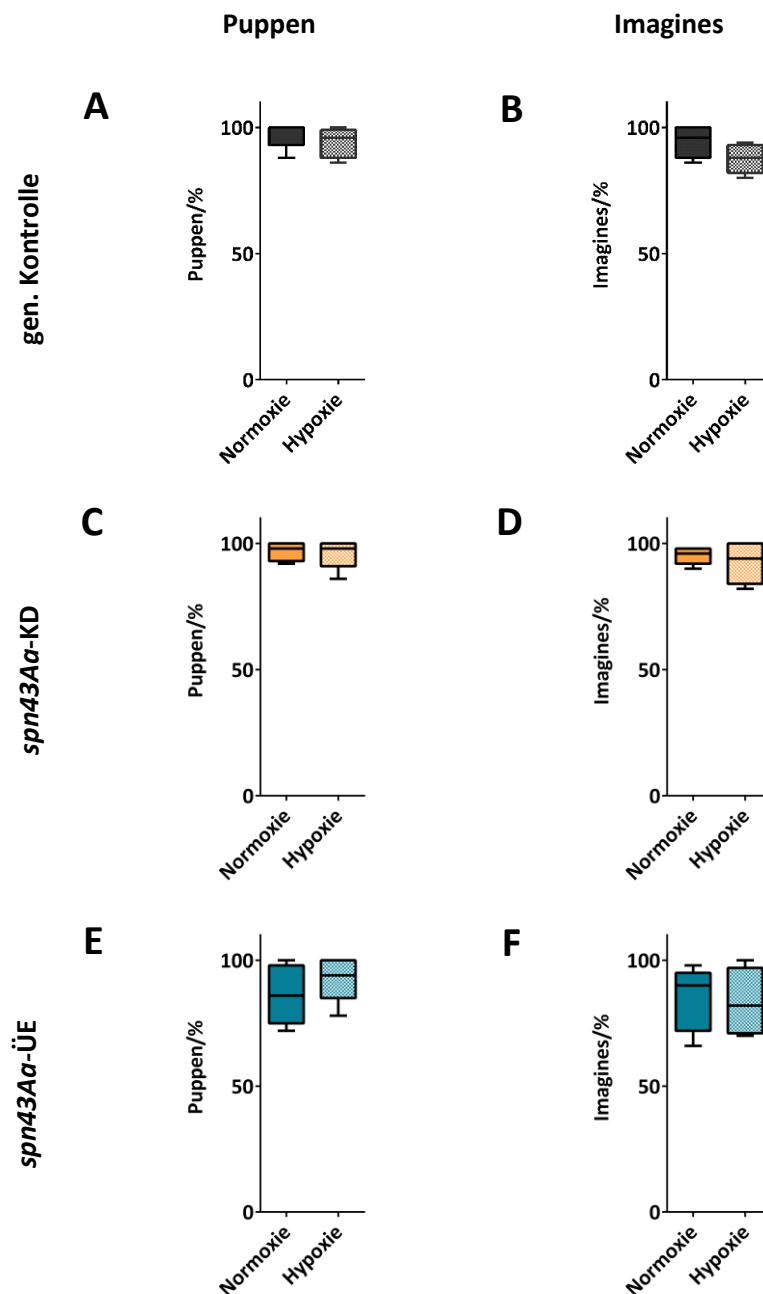


Abb. 3.17 Überlebensrate von *Drosophila* mit veränderter *spn43Aα*-Expression in den Atemwegen nach akuter Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h). Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Puppen (A, C, E) und Imagines (B, D, F) der genetischen Kontrolle (A, B), der *Knockdown*-Linie *spn43Aα*-KD (C, D) und Überexpressionslinie *spn43Aα*-ÜE (E, F), bezogen auf die Anzahl ursprünglich eingesetzter Tiere. N = 5 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Median ± Min/Max, *Ratio-paired t-test*.

Akute Hypoxieexposition hat keinen Einfluss auf die Anzahl an gebildeten Puppen, das heißt auf das Überleben der exponierten Larven, in allen drei genetischen Gruppen (Abb. 3.17 A, C, E). In der Anzahl geschlüpfter Imagines zeigt sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Einfluss der Hypoxieexposition auf das Überleben der eingesetzten Tiere (Abb. 3.17 B, D, F).

3.4.4 Hypoxie verzögert die Entwicklung von Tieren mit einer reduzierten Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen

Um den Einfluss einer akuten Hypoxieexposition auf die Entwicklungszeit von *Drosophila* zu untersuchen, wurde die Dauer der Larvenentwicklung und der Metamorphose gemessen.

Hypoxie führt in den ersten 15 h nach Exposition zu einem früheren Beginn der Metamorphose unabhängig vom genetischen Hintergrund der Larven (Abb. 3.18 A, C, E).

Darüber hinaus führt Hypoxie bei Tieren mit einer reduzierten Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen zu einem verzögerten Schlupfzeitpunkt und damit verlängerter Dauer der Metamorphose (Abb. 3.18 D). Hier sind in der Normoxiegruppe nach 4,5 Tagen aus 59 % der Puppen adulte Fliegen geschlüpft. Im Vergleich dazu haben sich in der hypoxieexponierten Gruppe aus 48 % der Puppen Imagines entwickelt

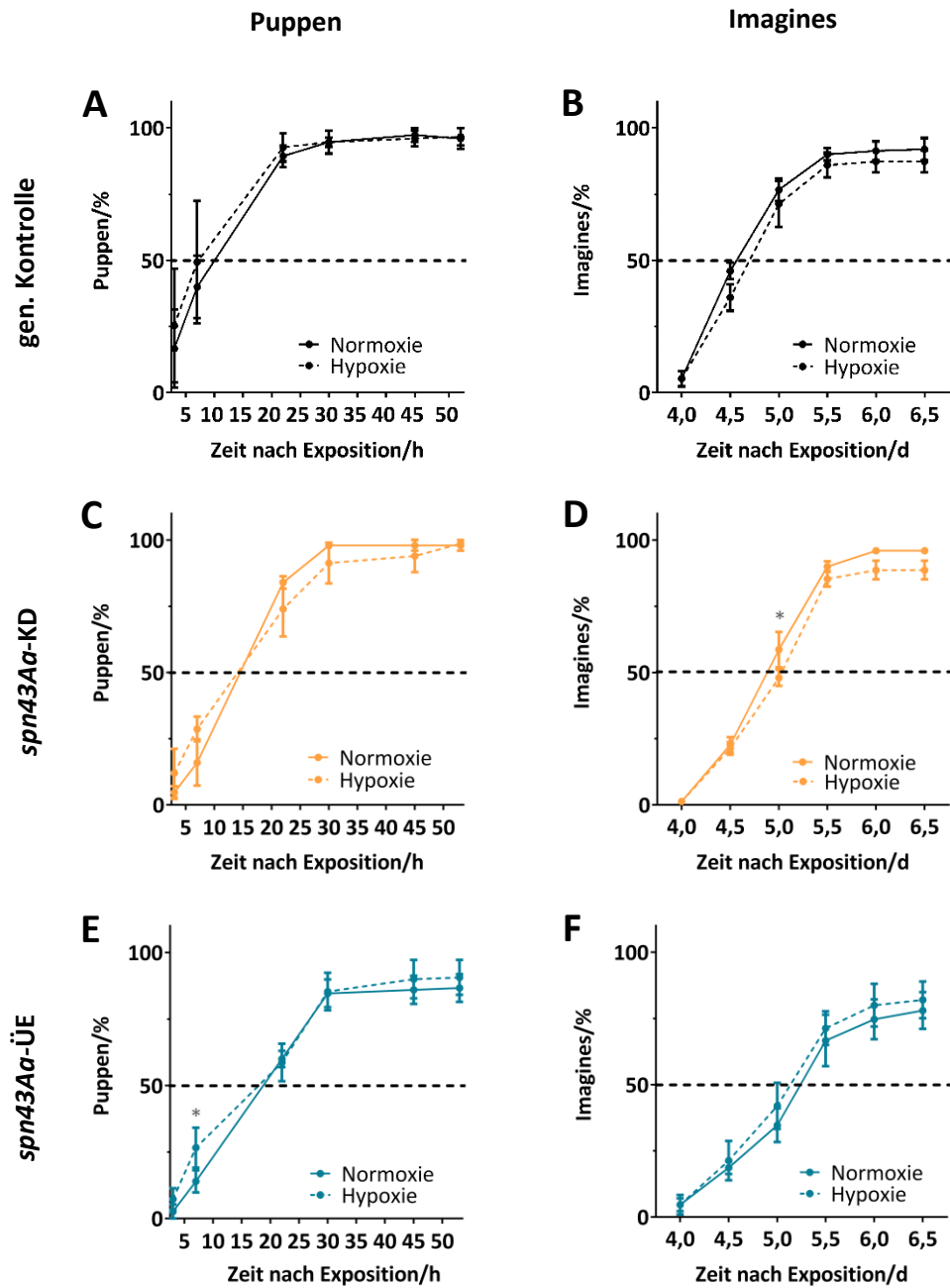


Abb. 3.18: Einfluss einer Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h) auf die Entwicklungsdauer von *Drosophila* mit modulierter *spn43Aa*-Expression. Anzahl an gebildeten Puppen (A, C, E) und geschlüpften Imagines (B, D, F) zu definierten Zeitpunkten nach Eiablage für die genetische Kontrolllinie (A, B), die *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (C, D) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert ± SEM, *two-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01.

3.4.5 Fliegen mit einer veränderten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen leben nach einer Hypoxieexposition länger

Schließlich wurde die Lebensdauer der erhaltenen adulten Fliegen ermittelt, indem die Anzahl der toten Fliegen über einen Zeitraum von 100 Tagen notiert wurde (Abb. 3.19).

Tiere der genetischen Kontrollgruppe haben eine maximale Lebenszeit von 70 bis 80 Tagen.

Die Lebenszeit der männlichen Imagines wird durch die Hypoxieexposition nicht modifiziert.

Bei weiblichen Tieren führt eine veränderte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen in Kombination mit einer Hypoxieexposition zu einer signifikanten Verlängerung der maximalen Lebenszeit um sechs Tage (Abb. 3.19 D, *spn43Aa*-KD) bzw. 15 Tage (Abb. 3.19 F, *spn43Aa*-ÜE).

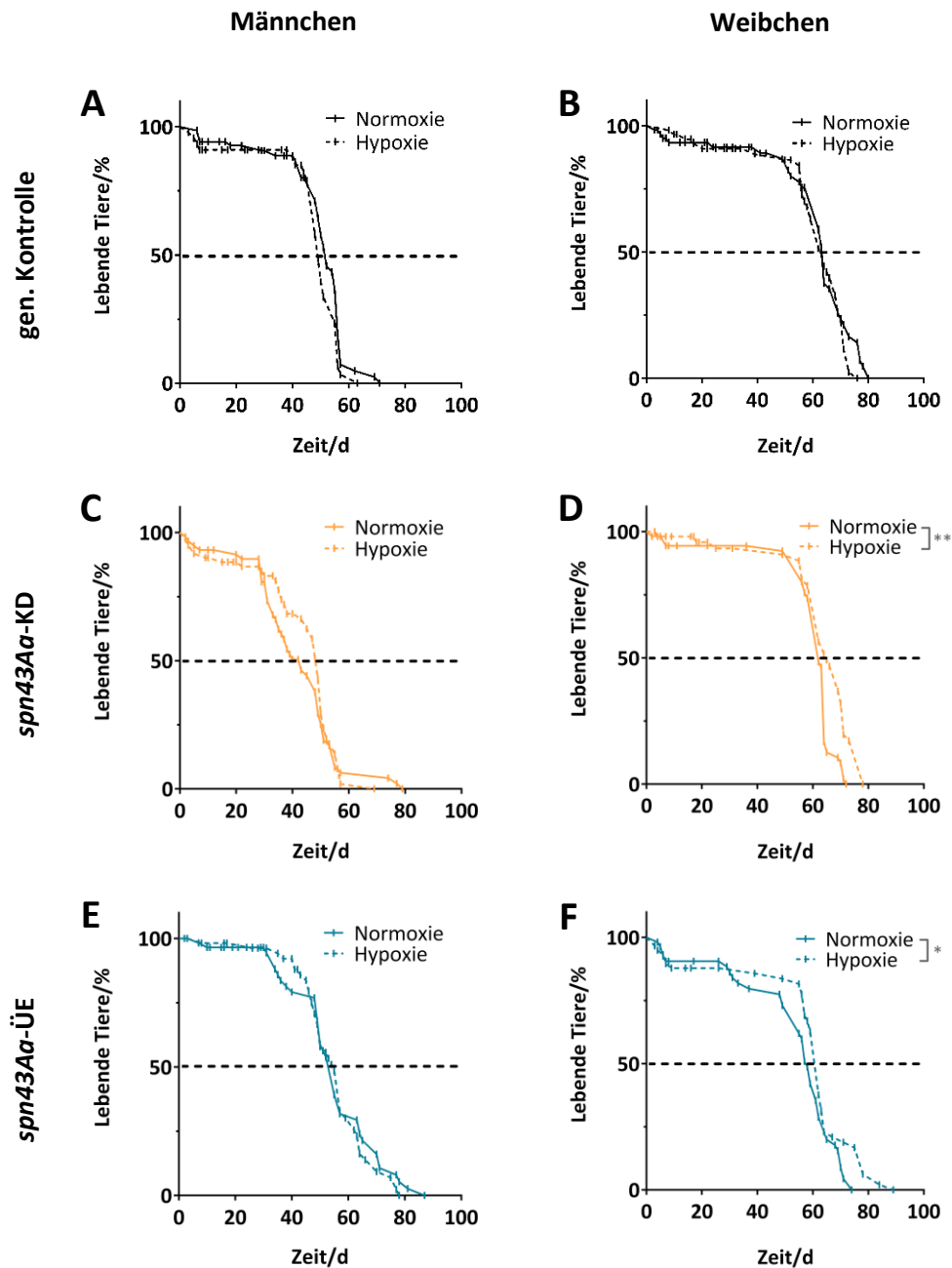


Abb. 3.19: Lebensdauer von *Drosophila*-Imagines mit veränderter *spn43Aa*-Expression nach Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h). Dargestellt ist die Anzahl lebender Männchen (A, C, E) und Weibchen (B, D, F) über Zeit für die genetische Kontrolle (A, B), der *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (C, D), der Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 20 Tiere pro Replikat. Kaplan-Meier-Kurve, Log-rank mit Mantel-Cox Test, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001.

3.5 Einfluss einer veränderten *CG14933*-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von *Drosophila melanogaster* nach Hypoxieexposition

Auch L3-Larven mit einer modifizierten Expression von *CG14933* in den Atemwegen wurden fünf Tage nach der Eiablage für zwei Stunden hypoxischen Bedingungen (5 % O₂) ausgesetzt. Kontrolltiere wurden für den gleichen Zeitraum normoxischen Bedingungen (Raumluft, etwa

21 % O₂) exponiert. Die folgenden Werte der Normoxiegruppe entsprechen den zuvor dargestellten zur Charakterisierung der Fliegenmodells zu Serpin *CG14933*.

Als Parameter für die Fitness der eingesetzten Fliegen wurden die Larvenaktivität, Entwicklungszeiträume und Überlebensrate nach Hypoxieexposition bestimmt. Zudem wurde die Expression des Serpingens *CG14933* in isolierten Atemwegen direkt im Anschluss an die Exposition gemessen.

3.5.1 Hypoxische Bedingungen induzieren ein erhöhtes *CG14933*-Expressionlevel in larvalen Atemwegen

Um herauszufinden, ob und inwiefern eine Hypoxieexposition auf das Expressionslevel des Serpingens *CG14933* Einfluss nimmt, wurden 40 Atemwege aus hypoxie- und normoxieexponierten Larven isoliert und die Expression von *CG14933* mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 3.20).

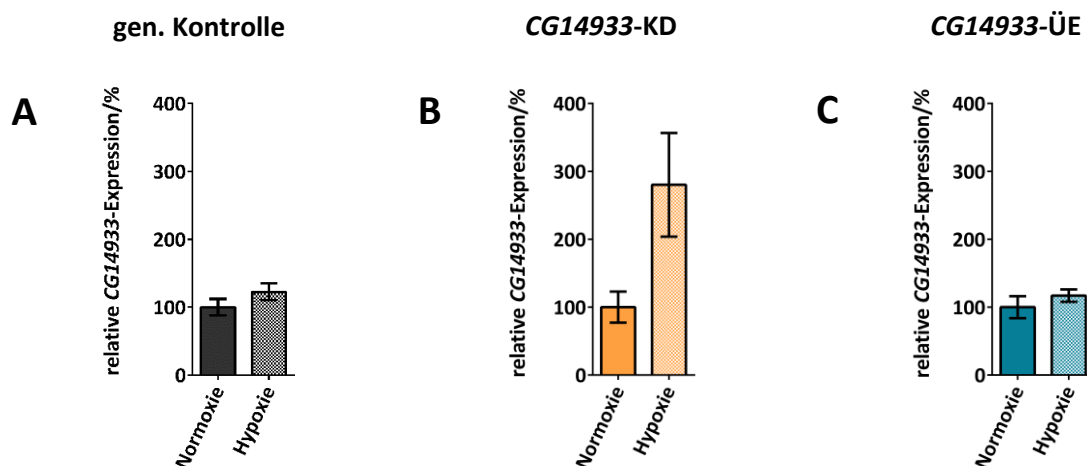


Abb. 3.20: *CG14933*-Expression in isolierten larvalen Tracheen nach Hypoxieexposition. Gezeigt ist die zum Haushaltsgen *RpL32* relative Expression von *CG14933* in isolierten larvalen Tracheen der genetischen Kontrolllinie (A), der *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD (B) und Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE (C) nach Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h) verglichen mit der korrespondierenden normoxischen Luftkontrolle (ca. 21 % O₂) in Prozent. N = 3 biologische Replikate, 40 isolierte Tracheen pro Replikat. Mittelwert ± SEM, *ratio-paired t-test*.

In allen drei untersuchten Genotypen führte die Hypoxieexposition zu einem Anstieg der Genexpression. Dieser beträgt 22 % in der genetischen Kontrolle (Abb. 3.20 A), 180 % in der *CG14933*-*Knockdown*linie (Abb. 3.20 B) und 17 % in der *CG14933*-Überexpressionslinie (Abb. 3.20 C).

3.5.2 Larven mit einer modifizierten Expression von *CG14933* in den Atemwegen reagieren mit einem verstärkten Vermeidungsverhalten auf hypoxische Bedingungen

Zu definierten Zeitpunkten während der Exposition wurde das Vermeidungsverhalten der Larven anhand der Anzahl an Tieren außerhalb des Mediums in der Hypoxie- und Normoxiegruppe bewertet.

Bereits innerhalb der normoxieexponierten Gruppe zeigt sich abhängig vom Genotyp ein Unterschied im Verhalten der Larven. Während des gesamten Experiments steigt die Anzahl der Larven, die sich außerhalb des Mediums befinden, sowohl bei der genetischen Kontrolle (Abb. 3.21 A), als auch bei den *CG14933-Knockdown* Tieren (Abb. 3.21 B) kontinuierlich an (25 % bzw. 24 % aller Tiere nach 120 min). Die Kurve der Überexpressionslinie bleibt mit einem Wert von 7 % nach 120 min am niedrigsten (Abb. 3.21 C).

Larven, die akuter Hypoxie ausgesetzt wurden, beginnen innerhalb der ersten fünf Minuten der Exposition aus dem Futtermedium zu kriechen. Die Kurven der genetischen Kontrolle (Abb. 3.21 A) und der *CG14933-Knockdown*-Linie (Abb. 3.21 B) steigen mit einem maximalen Wert von 59 % (nach 60 min) bzw. 56 % (nach 30 min) flach an. Nach 60 Minuten Hypoxieexposition divergieren die Kurven der beiden Linien. Während die Anzahl der Tiere außerhalb des Mediums für die genetische Kontrolle auch nach 120 min stabil bleibt (50 % aller Tiere), sinkt die Kurve der Linie mit reduzierter Expression auf 40 %.

Die Kurve der Tiere, welche *CG14933* in den Atemwegen überexprimieren, steigt im Vergleich zur genetischen Kontrolle und *Knockdown*-Linie steiler an (Abb. 2.21 C). Bereits nach 20 Minuten wird das Maximum mit 75,0 % der Larven außerhalb des Mediums erreicht. Nach diesem Zeitpunkt sinkt die Kurve bis auf 12 % nach 120 min Exposition und gleicht sich dem Wert der Normoxiegruppe an.

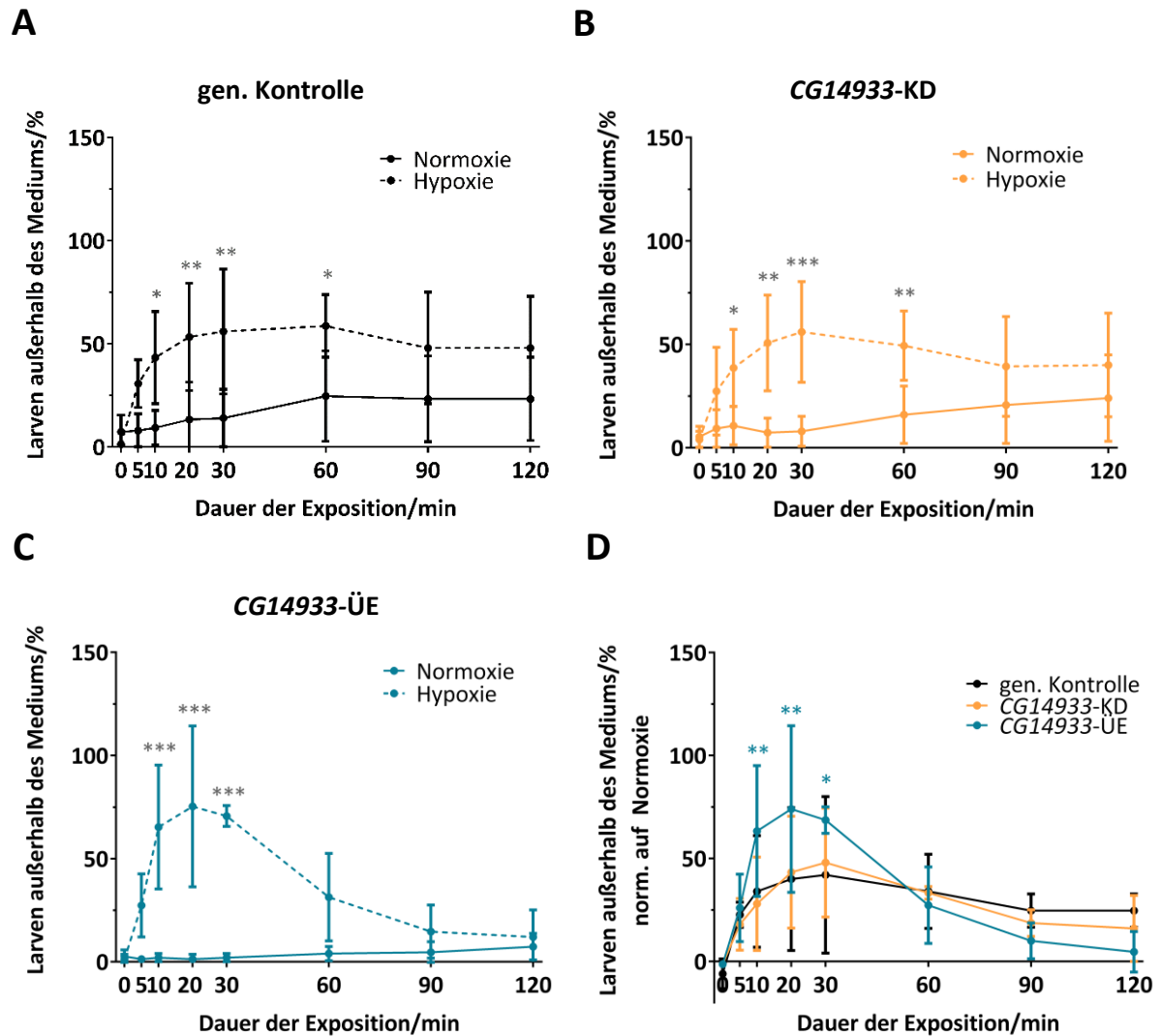


Abb. 3.21: Einfluss der modulierten *CG14933*-Expression auf das Larvenverhalten während einer akuten Hypoxieexposition. Dargestellt ist die Anzahl an Larven außerhalb des Mediums in Prozent zu definierten Zeitpunkten während der Hypoxie- (5 % O₂, 2 h) bzw. Normoxieexposition (ca. 21 % O₂) für die genetischen Kontrolle (A), die *Knockdown*-Linie *CG14933-KD* (B) und Überexpressionslinie *CG14933-ÜE* (C). (D) zeigt die Larvenaktivität der drei genetischen Gruppen normalisiert auf die jeweiligen Luftgruppen (schwarz: genetische Kontrolle, orange: *CG14933-KD*, blau: *CG14933-ÜE*). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert ± SEM, two-way-ANOVA, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001.

Deutlicher wird dieser Unterschied in der Reaktion der untersuchten Linien auf die Hypoxieexposition, nach Normalisierung der Werte auf ihre korrespondierende Normoxiegruppe (Abb. 3.21 D). Mit einer erhöhten Expression von *CG14933* in den Atemwegen wandern 75,0 % der Larven nach 20 min Hypoxieexposition aus dem Medium heraus. Im Vergleich verlassen nur 40 % der genetischen Kontrolltiere das Medium. Allerdings zeigt die Kurve *CG14933*-überexprimierenden Linie mit 4,6 % nach 120 min auch den stärksten Rückgang. Sowohl die Kurve der genetischen Kontrolle, als auch der *CG14933-Knockdown*-Linie steigt auch nach einer Normalisierung auf die Luftgruppe langsam an, mit einem

maximalen Wert von 42,0 % (gen. Kontrolle) bzw. 48,0 % (CG14933-KD) nach 30 min. Nach 60 min Hypoxieexposition divergieren die Kurven der beiden Linien, bleiben jedoch verglichen mit der *spn43Aa*-überexprimierenden Linie auch nach 120 min erhöht (gen. Kontrolle: 24,6 %; CG14933-KD: 16 %).

3.5.3 Hypoxieexposition hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Larven und Puppen

Nach der Hypoxieexposition wurde die Überlebensrate der Tiere vor Beginn und während der Metamorphose anhand der Anzahl an braunen Puppen und geschlüpften Imagines ermittelt. Weder in der Anzahl der gebildeten Puppen, noch der geschlüpften adulten Fliegen lässt sich ein Einfluss der Hypoxie auf die Überlebensrate nachweisen (Abb. 3.22).

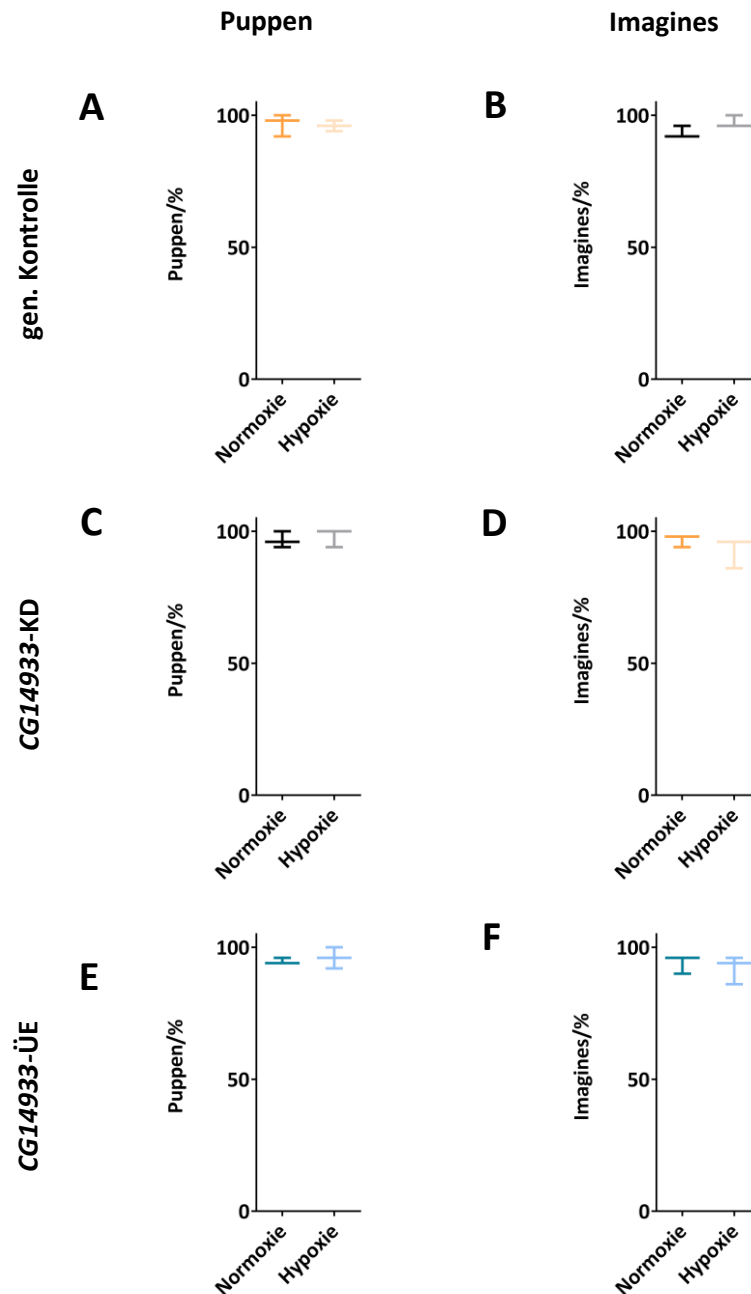


Abb. 3.22: Überlebensrate von *Drosophila* mit veränderter *CG14933*-Expression nach Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h). Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Puppen (A, C, E) und Imagines (B, D, F) der genetischen Kontrolle (A, B), der *Knockdown*-Linie *CG14933-KD* (C, D) und Überexpressionslinie *CG14933-ÜE* (E, F), bezogen auf die Anzahl ursprünglich eingesetzter Larven. N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Median ± Min/Max, *Ratio-paired t-test*.

3.5.4 Die Entwicklung von *Drosophila* ist unabhängig vom genetischen Hintergrund nach Hypoxieexposition verzögert

Die Auswirkung der hypoxischen Bedingungen auf die Entwicklungsdauer wurde anhand der Dauer der Larvenentwicklung und der Metamorphose gemessen.

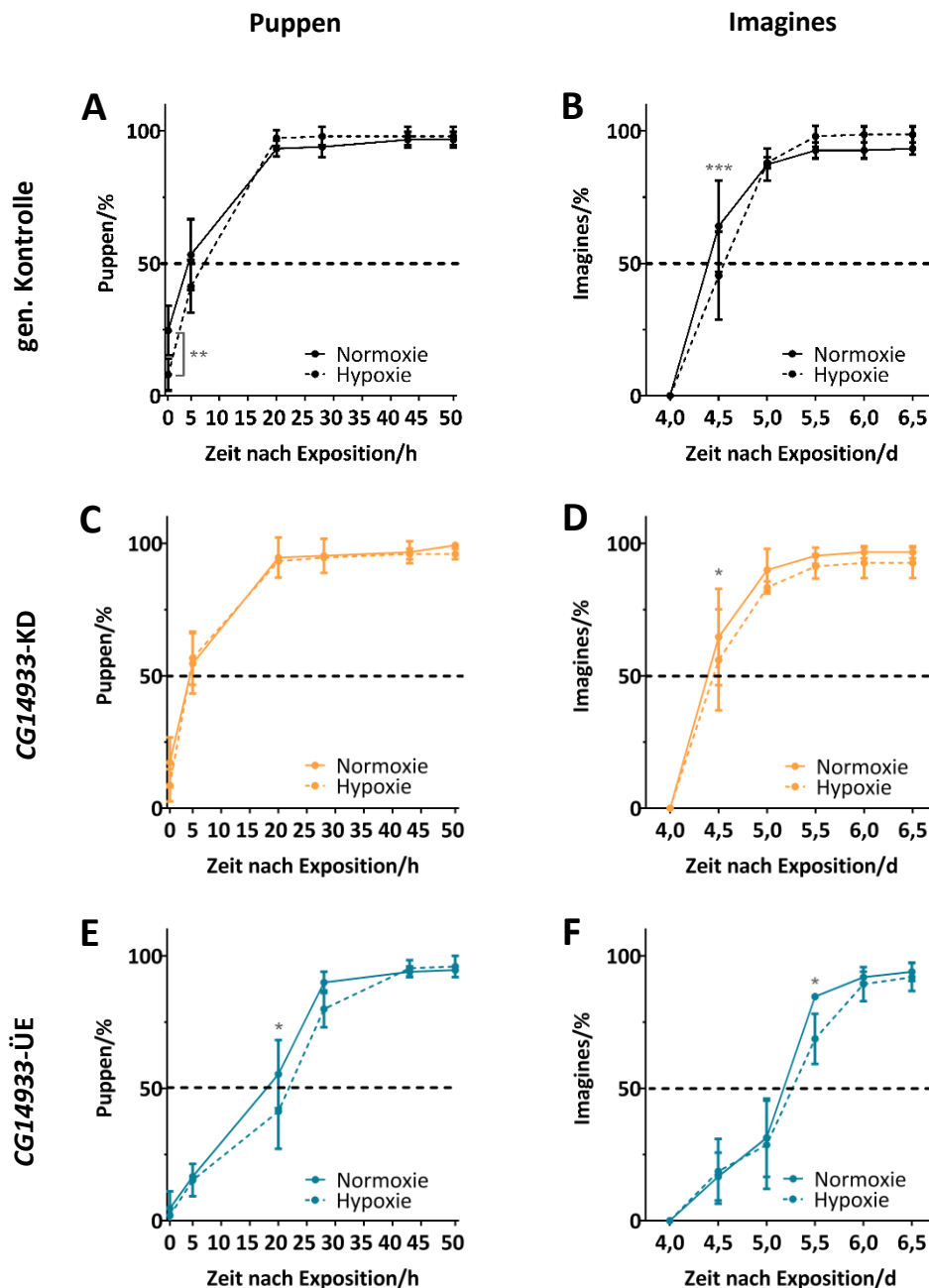


Abb. 3.23: Einfluss einer Hypoxie (5 % O₂) bzw. Normoxieexposition (ca. 21 % O₂) auf die Entwicklungsdauer von *Drosophila* mit veränderter CG14933-Expression. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Puppen (A, C, E) und geschlüpfter Imagines (B, D, F) zu definierten Zeitpunkten nach der Exposition für die genetische Kontrolle (A, B), die *Knockdown*-Linie CG14933-KD (C, D) und Überexpressionslinie CG14933-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert ± SEM, *two-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001.

Sowohl bei Tieren der genetischen Kontrolle, als auch jenen mit einer Überexpression von *CG14933* in den Atemwegen führen die hypoxischen Bedingungen zu einem signifikant verzögerten Eintritt in die Verpuppung. Nach Hypoxieexposition haben sich in der genetischen Kontrollgruppe fünf Stunden nach Exposition 29 % mehr Larven zu Puppen entwickelt (Abb. 3.23 A). Für die *CG14933*-Überexpressionslinie ist dieser Effekt zeitlich verschoben. Verhalten sich fünf Stunden nach Exposition hypoxie- und normoxieexponierte Tiere gleich, sind nach 20 Stunden in der Normoxiegruppe allerdings bereits 33 % mehr adulte Fliegen geschlüpft (Abb. 3.23 E).

Auch auf die Dauer der Metamorphose, bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens, wirkt die Hypoxieexposition entwicklungsverzögernd (Abb. 3.23 B, D, F). 4,5 Tage nach der Exposition sind aus den Puppen der genetischen Kontrolle 41 % weniger Fliegen geschlüpft, wenn die Larven zuvor hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren (Abb. 3.23 B). Bei der Linie mit reduzierter Expression schlüpfen zum gleichen Zeitpunkt in der Hypoxiegruppe 16 % weniger Tiere (Abb. 3.23 D). Der Effekt für die *CG14933*-Überexpressionslinie ist erneut zeitlich verschoben. Nach 4,5 Tagen verhalten sich hypoxie- und normoxieexponierte Tiere gleich, nach 5,5 Tagen sind in der Normoxiegruppe allerdings bereits 23 % mehr adulte Fliegen geschlüpft (Abb. 3.23 F).

3.5.5 Die Lebenszeit von *Drosophila*-Imagines wird nicht durch die Hypoxieexposition beeinflusst

Als weiterer Parameter für die Fitness der Tiere wurde die Lebenszeit der geschlüpften adulten Fliegen ermittelt (Abb. 3.24). In keiner der untersuchten Linien führt die akute Hypoxieexposition zu einem Effekt auf die Lebensdauer von männlichen (Abb. 3.24 A, C, E) oder weiblichen Imagines (Abb. 3.24 B, D, F).

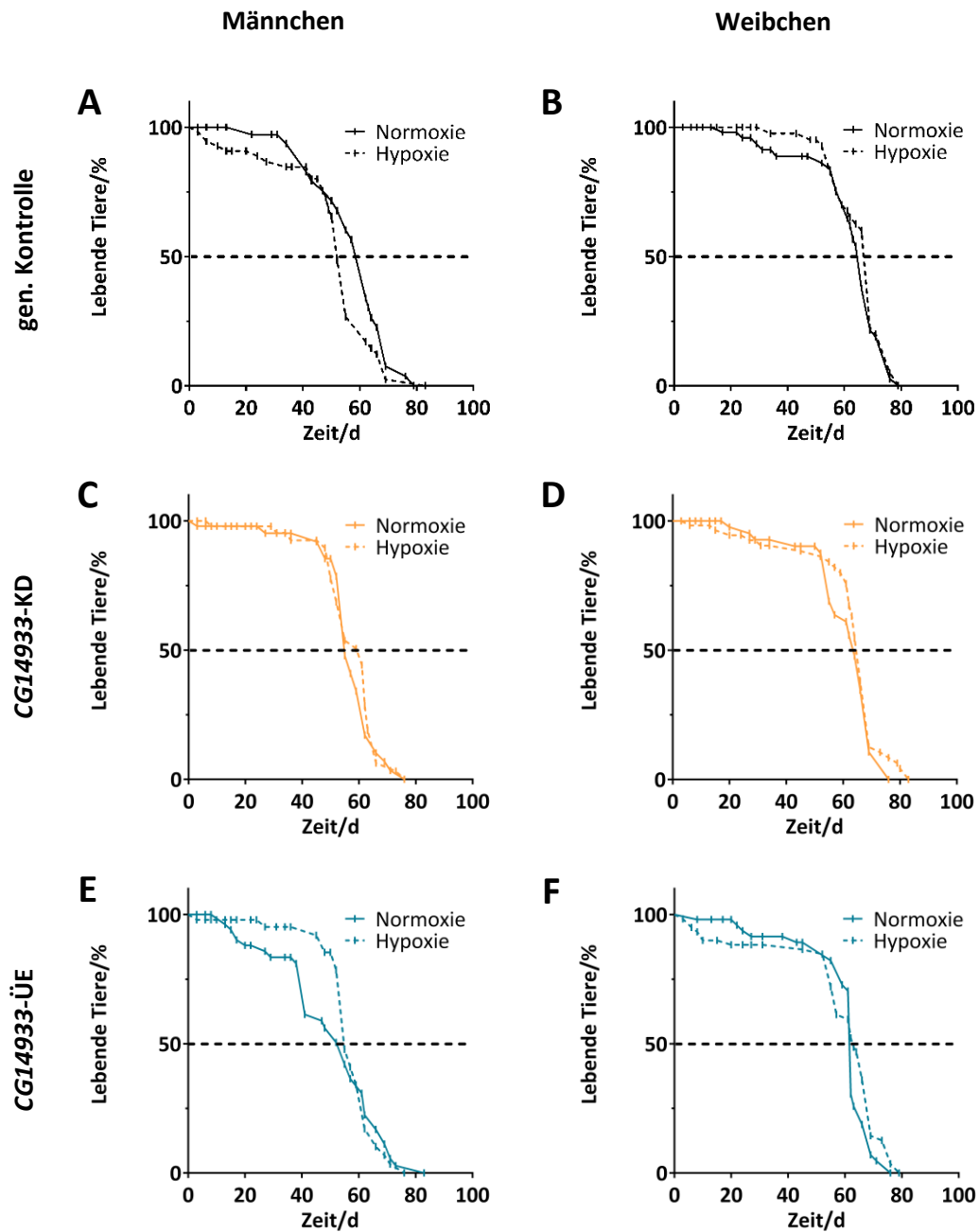


Abb. 3.24: Lebensdauer von *Drosophila*-Imagines mit veränderter *CG14933*-Expression nach Hypoxieexposition (5 % O₂, 2h). Dargestellt ist die Anzahl lebender Männchen (A, C, E) und Weibchen (B, D, F) über die Zeit für die genetische Kontrolle (A, B), die *Knockdown*-Linie *CG14933*-KD (C, D) und Überexpressionslinie *CG14933*-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 20 Tiere pro Replikat. Kaplan-Meier- Kurve, Log-rank mit Mantel-Cox Test.

3.6 Einfluss einer veränderten Expression des Serpingens *spn43Aa* in den Atemwegen auf die Fitness von *Drosophila melanogaster* nach wiederholter Zigarettenrauchexposition

Larven, bei welchen die Expression des Serpingens *spn43Aa* in den Atemwegen moduliert ist, wurden an Tag zwei, drei und vier nach der Eiablage jeweils eine Stunde dem aktiven Rauch von 18 Zigaretten ausgesetzt. Als Parameter für die Fitness wurden die Überlebensrate, Entwicklungs- und Lebensdauer der Tiere ermittelt.

3.6.1 Die Überlebensrate von Larven und Puppen wird durch Zigarettenrauch nicht beeinflusst

Nach der Zigarettenrauchexposition wurde die Überlebensrate der Tiere unmittelbar nach der letzten Berauchung (Überlebensrate Larven, Abb. 3.25 A, D, G), vor Eintritt in die Metamorphose (Überlebensrate Puppen, Abb. 3.25 B, E, H) und während der Metamorphose (Überlebensrate Imagines, Abb. 3.25 C, F, I) ermittelt.

In keinem der gemessenen Stadien von *Drosophila* hat Zigarettenrauch einen Einfluss auf die Überlebensrate der eingesetzten Tiere unabhängig vom Expressionslevel des Serpingens *spn43Aa*.

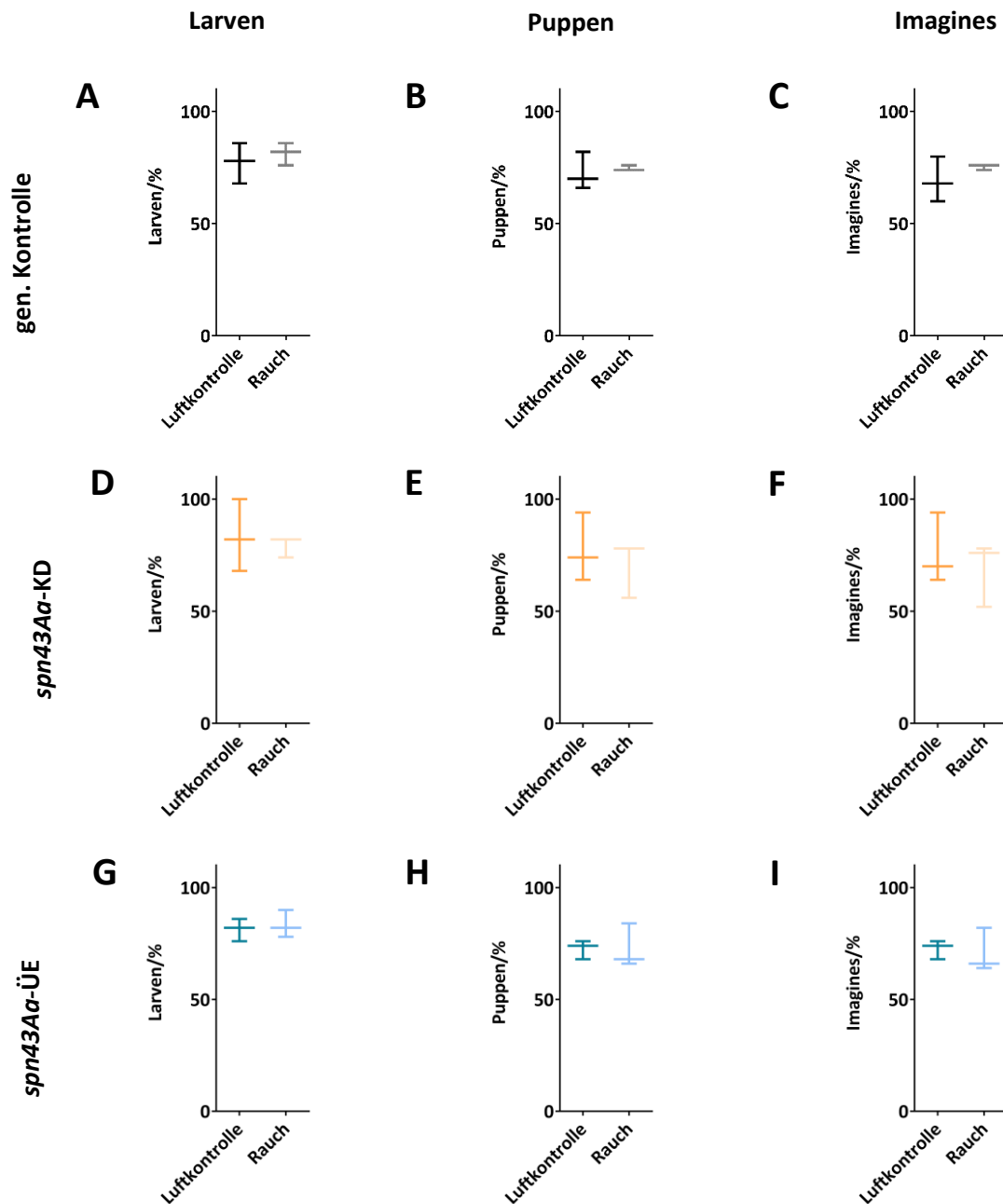


Abb. 3.25: Einfluss einer wiederholten Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h) auf die Überlebensrate von *Drosophila*. Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender Larven (A, D, G), Puppen (B, E, H) und Imagines (C, F, I) der genetischer Kontrolle (A - C), der *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (D - F) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (G - I), bezogen auf die ursprüngliche Anzahl eingesetzter Larven. N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikate. Median \pm Min/Max, *Ratio-paired t-test*.

3.6.2 Zigarettenrauch verzögert die Entwicklung von Larven und Puppen unabhängig vom *spn43Aa*-Expressionslevel

Um den Einfluss einer wiederholten Zigarettenrauchexposition auf die Entwicklungszeit von *Drosophila* zu ermitteln, wurde die Dauer der Larvenentwicklung und der Metamorphose gemessen.

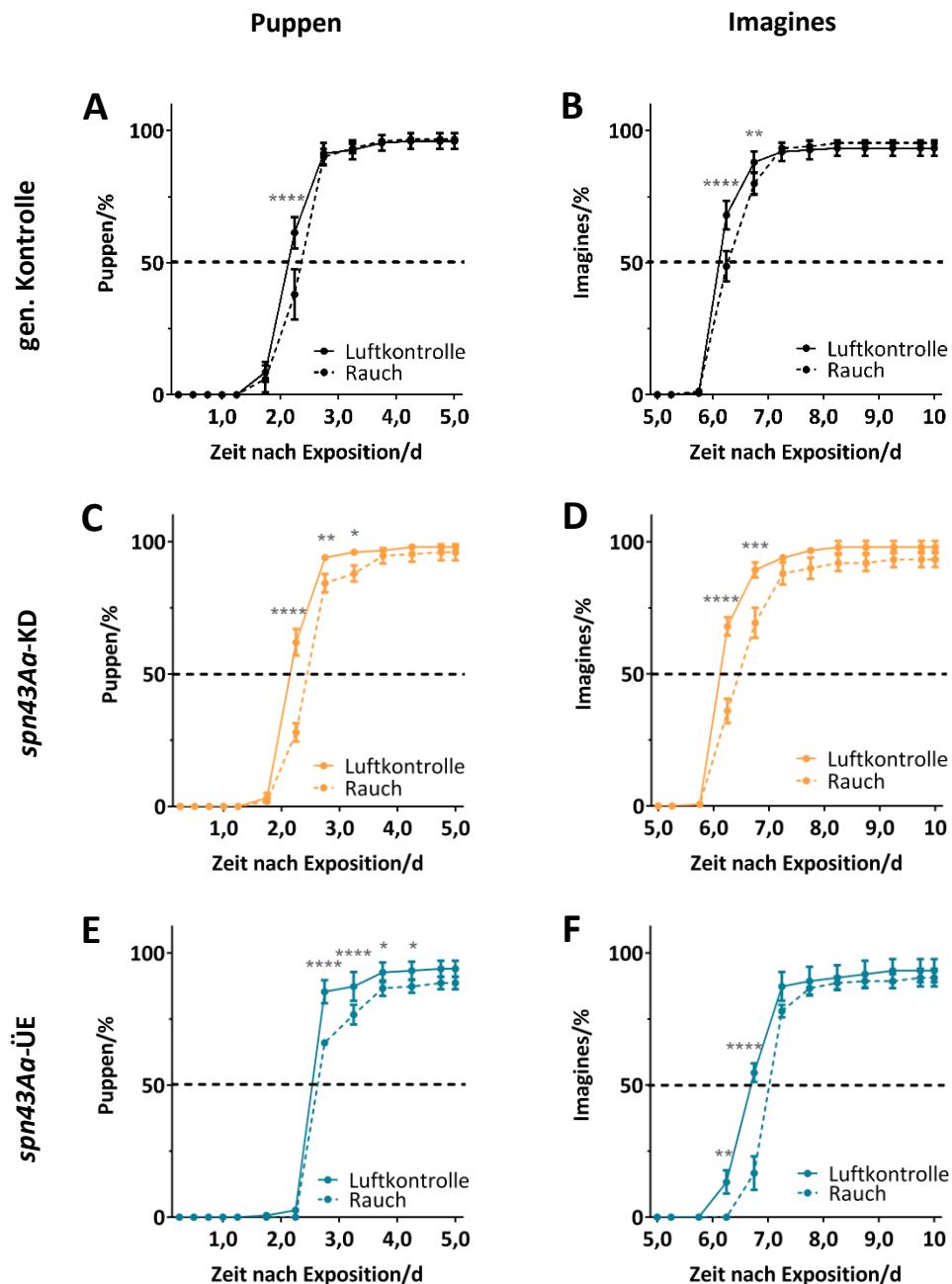


Abb. 3.26: Entwicklungsdauer von *Drosophila* nach wiederholter Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h). Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Puppen (A, C, E) und geschlüpfter Imagines (B, D, F) zu definierten Zeitpunkten nach der letzten Exposition mit Zigarettenrauch für die genetische Kontrolle (A, B), die *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (C, D) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikat. Mittelwert \pm SEM, *two-way-ANOVA*, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

Die wiederholte Zigarettenrauchexposition führt unabhängig von dem Expressionslevel des Serpingens *spn43Aa* sowohl zu einer verzögerten Larvenentwicklung (Abb. 3.26 A, B, E), als auch zu einer verlängerten Dauer der Metamorphose (Abb. 3.26 B, D, F). Dabei tritt der Effekt in der genetischen Kontrolle (Abb. 3.26 A) und *Knockdown*-Linie (Abb. 3.26 C) bereits 2,25 Tage nach der letzten Behandlung auf, mit einem gemessenen Unterschied von 38 % bzw. 55 % an gebildeten Puppen zwischen der Hypoxie- und Normoxiegruppe. Wohingegen die Entwicklungsverzögerung in der *spn43Aa*-überexprimierende Linie erst nach 2,75 Tagen mit einer Differenz von 23 % gebildeter Puppen auftritt (Abb. 2.26 E).

Der Zeitpunkt des Schlüpfens ist ebenfalls für alle verwendeten Linien verzögert. 6,25 Tage nach der letzten Berauchung liegt für die genetische Kontrolle ein Unterschied von 29 % an geschlüpften adulten Fliegen vor (Abb. 2.26 B), für die Linie mit reduzierter Expression eine Differenz von 47 % (Abb. 2.26 D). Auch hier ist der Effekt für die *spn43Aa*-Überexpressionslinie zeitlich verschoben. Zwar ist bereits nach 6,25 Tagen ein verzögertes Schlüpfen (7 % Differenz) zu sehen, allerdings ist die Auswirkung nach 6,75 Tagen mit einer Differenz von 70 % verstärkt (Abb. 2.26 F).

3.6.3 Imagines mit einer modulierten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen sterben durch Zigarettenrauch früher

Schließlich wurde die Lebensdauer der geschlüpften adulten Fliegen ermittelt, indem die Anzahl der toten Fliegen über einen Zeitraum von 100 Tagen notiert wurde (Abb. 3.27).

Tiere der genetischen Kontrollgruppe haben eine maximale Überlebenszeit von 60 bis 70 Tagen. Die Lebenszeit der genetischen Kontrolle wird sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen durch eine Exposition mit Zigarettenrauch signifikant verlängert (Abb. 3.27 A: Männchen; Abb. 3.27 B: Weibchen). Zusätzlich verkürzt Zigarettenrauch die Überlebensdauer der Fliegen mit einer reduzierten und erhöhten *spn43Aa*-Expression signifikant (Abb. 3.27 C: *spn43Aa*-KD; Abb. 3.27 E: *spn43Aa*-ÜE). Bei den weiblichen Imagines zeigt sich hier kein Unterschied zwischen rauchexponierten Tieren und der Luftkontrolle.

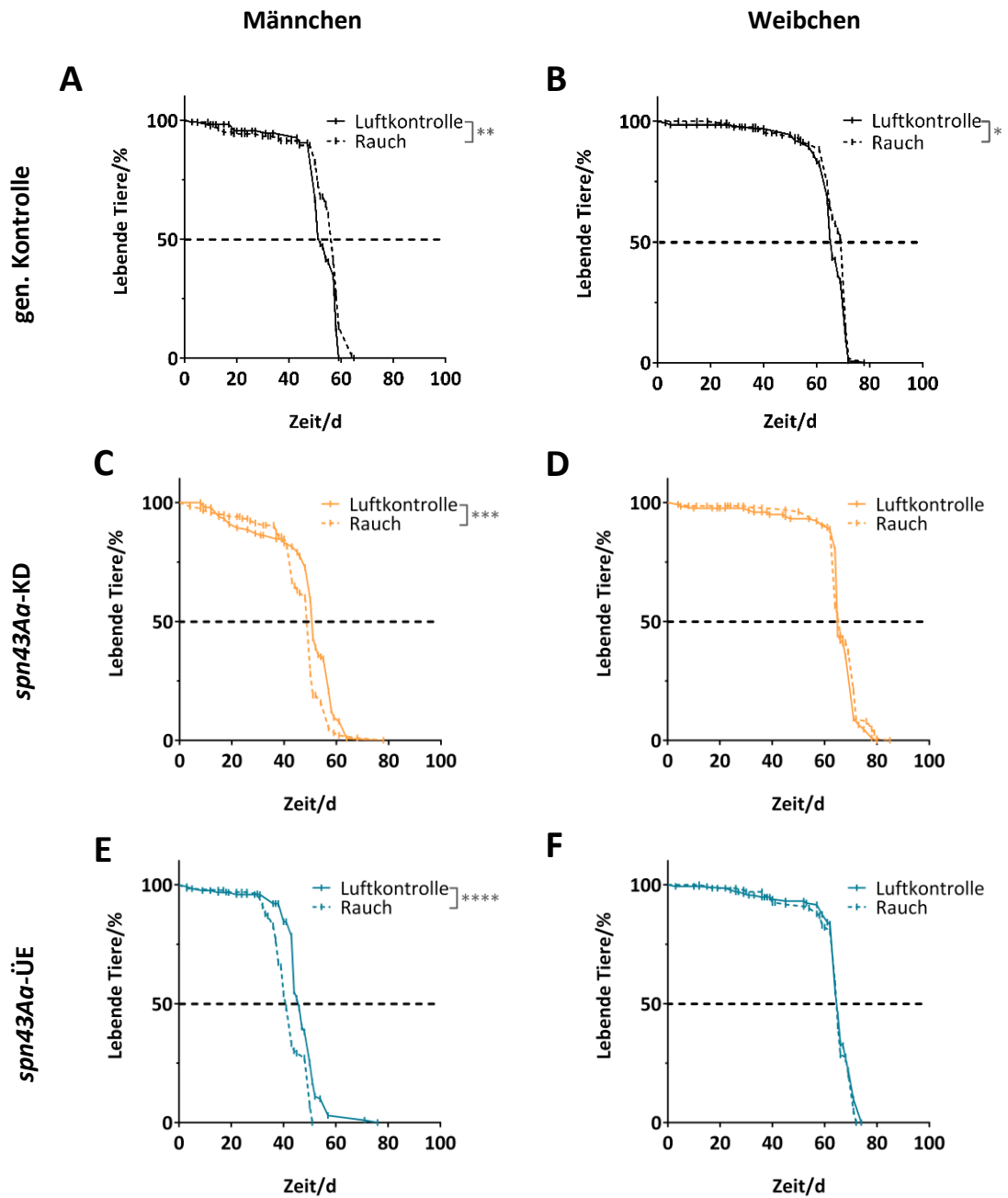


Abb. 3.27: Lebenszeit von *Drosophila*-Imagines nach wiederholter Zigarettenrauchexposition (18 Zigaretten, 1h). Dargestellt ist die Anzahl lebender Männchen (A, C, E) und Weibchen (B, D, F) über die Zeit für die genetische Kontrolle (A, B), die *Knockdown*-Linie *spn43Aa*-KD (C, D) und Überexpressionslinie *spn43Aa*-ÜE (E, F). N = 3 biologische Replikate, 50 Tiere pro Replikate. Kaplan-Meier-Kurve, Log-rank mit Mantel-Cox Test, * 0,05 > p > 0,01; ** 0,01 > p > 0,001; *** 0,001 > p > 0,0001; **** 0,0001 > p.

4 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit widmet sich der Charakterisierung der Serpine Spn43Aa und CG14933 im Kontext der Atemwegsphysiologie. Durch die Verwendung des einfachen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* sollen dabei Rückschlüsse auf die Frage, auf welche Weise die humanen Serpine SERPINB3 und SPINK5 zu einer möglichen Entwicklung von *Asthma bronchiale* beitragen, gezogen werden.

Asthma ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, welche in industriellen Ländern wie Deutschland nicht nur eine sehr hohe Prävalenz aufweist, sondern noch immer zunimmt [1]. Zu den Risikofaktoren für Asthma gehören neben der Belastung durch Umweltfaktoren, wie Allergene, Tabakrauch und Infektionen, auch genetische Faktoren [7, 8]. In einer Reihe von epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Krankheit und dem genetischen Hintergrund untersucht [12, 18, 98]. Die Analysen haben gezeigt, dass Träger von Mutationen in der Gensequenz des Serpins SPINK5 ein erhöhtes Risiko besitzen, Asthma zu entwickeln [17]. Weitere Studien wiesen nach, dass in an Asthma erkrankten Patienten die Expression von SERPINB3 sowohl in den Atemwegen als auch systemisch im Serum erhöht ist [18, 25]. Somit stehen die Serpine SPINK5 und SERPINB3 mit der Erkrankung in Verbindung. Auf welchem Weg sie allerdings zu Entwicklung dieser beitragen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt.

Um die Fragestellung zu beantworten, welchen Einfluss eine fehlregulierte Expression der Serpine auf die Funktion und Morphologie der Atemwege hat, wurde eine veränderte Expression der für SERPINB3 und SPINK5 orthologen Gene in den Atemwegen der Taufliede *Drosophila melanogaster* modelliert.

Obwohl zwischen Fliege und Mensch über 700 Mio. Jahre der evolutionären Divergenz liegen, verbindet beide Organismen ein hoher Grad an konservierten genetischen, zellulären und metabolischen Prozessen. Zusätzlich bietet *Drosophila* den Vorteil, dass eine Vielzahl an gentechnischen Werkzeugen zur Verfügung steht, welche die genetische Grundlagenforschung vereinfacht. Das binäre GAL4/UAS-Expressionssystem beispielsweise ermöglicht eine zeit- und/oder gewebsspezifische Modulation der Expression nahezu jedes Gens [80–82]. Unter Anwendung dieses Systems wurde in dieser Arbeit die Genexpression von SERPINB3 und SPINK5 gezielt im Atemwegsepithel der *Drosophila*-Larve manipuliert, um die Folgen dieser Dysregulation zu analysieren.

Um passende Fliegenmodelle zu generieren, war es notwendig die orthologen Gene von SERPINB3 und SPINK5 in *Drosophila* zu identifizieren. Da es sich bei SERPINB3 und SPINK5 um inhibierende Serpine handelt, wurden nur Kandidaten ausgewählt, die über eine Inhibitoraktivität verfügen. Serpine werden als inhibierend kategorisiert, basierend auf dem Vorhandensein spezifischer Sequenzabfolgen im Bereich des *reactive center loops*. Nicht-inhibitorische Serpine haben oft kürzere Sequenzen in den genannten Regionen und die Proteine haben andere Funktionen [99].

Anschließend wurde anhand einer Sequenzhomologie der Aminosäuren von mehr als 30 % (BLAST-Wert) die Auswahl der Kandidaten weiter reduziert. Als letztes Auswahlkriterium wurde das Expressionsniveau der in Frage kommenden Gene in isolierten larvalen Atemwegen des Stammes CantonS herangezogen. Aufgrund ihres hohen Expressionslevels in isolierten Tracheen wurden die Kandidatengene *spn43Aa* (SERPINB3-Ortholog) und *CG14933* (SPINK5-Ortholog) ausgewählt, um die Folgen einer veränderten Expression der Gene im Atemwegsepithel der Fliege zu analysieren. Für beide Gene wurden Fliegenlinien hergestellt, die eine ektopische Expression durch RNAi oder Überexpression herbeiführen. Im Folgenden werden die Modelle zur Fehlregulation von *spn43Aa* und *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster* vorgestellt und ihre Funktion im Kontext der Tracheenmorphologie, sowie anhand verschiedener Fitnessparameter charakterisiert.

4.1 Charakterisierung der fehlregulierten Expression des Serpins *spn43Aa* in den Atemwegen

Zu Beginn dieser Arbeit standen wenige grundlegende Informationen zum Serinproteaseinhibitor Spn43Aa zur Verfügung und die Literatur konzentrierte sich primär auf strukturelle Beobachtungen des Serpins.

Das Serpingen *spn43Aa* ist in der chromosomalen Bande 43A zusammen mit den Genen *spn43Ab*, *spn43Ac* und *spn43Ad* lokalisiert. Das Protein besitzt einen aktiven *reactive center loop*, durch welchen das Serpin Spn43Aa Proteasen inhibiert und die Proteolyse negativ reguliert [71, 100]. Eine Besonderheit von Spn43Aa ist, dass es sowohl intrazellulär [101], als auch im extrazellulären Raum [100, 102] aktiv ist, was ihm ein breites Wirkspektrum verleiht. Die Funktion des Serpins Spn43Aa in *Drosophila* wurde bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Serpin Spn43Ac, welches durch das Gen *necrotic* kodiert wird, untersucht. In diesen Studien wurde kein Einfluss auf den Phänotyp der Larve [71] oder die

Expression von antimikrobiellen Peptiden des Immunsystems detektiert [70]. Jedoch lag in keiner der Studien der Fokus auf dem Atemwegsepithel der Tiere.

Die induzierte Fehlexpression von *spn43Aa* erfolgte in der hier präsentierten Arbeit mit Hilfe der *ppk4*-Promotorsequenz, die eine atemwegsspezifische Manipulation in allen Stadien der larvalen Entwicklung ermöglicht. Der *spn43Aa-Knockdown* konnte in den Tracheen in Form einer konstant verminderten Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, war in Tieren, in denen eine *ppk4*-getriebene *spn43Aa*-Überexpression induziert wurde, keine konstante Expressionszunahme erkennbar. In vier Tage alten Larven wurde in den Atemwegen *spn43Aa*-überexprimierender Larven im Vergleich zu den Atemwegen der genetischen Kontrolltiere eine starke Überexpression (330000-fach erhöht) nachgewiesen. Am Tag fünf nach der Eiablage war die Genexpression in isolierten Tracheen der Überexpressionstiere im Vergleich zur genetischen Kontrolle um 25 % reduziert. Die Tiere zeigten somit eine Reduktion der *spn43Aa*-Expression, obwohl *ppk4* nachweislich in allen larvalen Stadien gleichbleibend aktiv ist und somit eine konstante Expression des Zielgens unter der transkriptionellen Kontrolle des *ppk4*-Promotors zu erwarten wäre [83]. Beschäftigt man sich genauer mit den publizierten *spn43Aa*-Expressionsmustern im Verlauf der embryonalen und larvalen Entwicklung der Taufliege und der Funktion des Serpins, lässt sich dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis allerdings erklären. In Wildtyp-*Drosophila* wird *spn43Aa* vor allem im Embryonalstadium exprimiert. Während der Larvenentwicklung sinkt das Expressionsniveau, bis *spn43Aa* im dritten Larvenstadium (L3) nicht mehr exprimiert wird [103]. Bei den für die Expressionsmessung am Tag fünf verwendeten Tieren, handelt es sich ausschließlich um späte L3-Larven. Diese Tiere haben den Darm bereits entleert, was darauf hindeutet, dass sie sich unmittelbar vor dem Beginn der Metamorphose befinden. Während der Metamorphose werden, ausgelöst durch einen Anstieg des Hormons Ecdyson, im Prozess der Histolyse das larvale Gewebe, bis auf wenige Stammzellbereiche, aufgelöst. Ecdyson sorgt dabei nicht nur für die Einleitung der Verpuppung, sondern auch für die Freisetzung von Proteasen, wie die Serinprotease Stubble, die für die Degradierung des larvalen Gewebes sorgen [104, 105].

Da *Spn43Aa* ein Serinproteaseinhibitor und somit ein negativer Regulator der Proteolyse ist, muss die Expression reduziert werden, um die Proteolyse zu aktivieren und den Prozess der Metamorphose zu ermöglichen. Im späteren Puppenstadium, sobald der Abbau larvaler Strukturen abgeschlossen ist und der Aufbau der Organe der Imagines dominiert, findet keine

Proteolyse mehr statt. Daher wird die Expression von Proteaseinhibitoren wie *spn43Aa* wieder aktiviert [71, 103]. Auf gleiche Weise wurde die, durch das GAL4/UAS-Expressionssystem ektopisch induzierte *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen später L3-Larven gehemmt, um die Metamorphose einzuleiten.

Im Folgenden wird der Einfluss des Serpins Spn43Aa auf die Atemwegsentwicklung, sowie auf Parameter, die mit der Fitness von *Drosophila melanogaster* einhergehen, anhand der beiden Fliegenmodelle (*spn43Aa-Knockdown*- und *spn43Aa-Überexpressions*-Modell) zur gezielten Reduktion oder Hyperaktivierung des Serpins in den Atemwegen diskutiert. In der entsprechenden Kontrolllinie, „genetische Kontrolle“, ist das Expressionslevel nicht verändert und gleicht dem von Wildtyp-Fliegen.

4.1.1 Einfluss einer modifizierten *spn43Aa*-Expression auf die Tracheenmorphologie von *Drosophila melanogaster*

Als erster Aspekt zur Charakterisierung des Serpins Spn43Aa wurde der Einfluss einer *spn43Aa*-Dysregulation auf die Tracheenmorphologie und -entwicklung in *Drosophila*-Larven untersucht. Hierfür wurde die Anzahl und Länge der Sekundäräste im dritten thorakalen Segment von Larven im ersten und dritten Entwicklungsstadium gemessen. Die atemwegspezifische Überexpression von *spn43Aa* führt zu einer erhöhten Anzahl von Sekundärästen sowohl in Tieren des ersten als auch des dritten Larvenstadiums, wobei der gemessene Effekt in L3-Larven stärker ist. Gleichzeitig verringert die Überexpression von *spn43Aa* die Länge der sekundären Zweige in Larven im dritten Entwicklungsstadium. Larven, bei denen die *spn43Aa*-Expression in den Epithelzellen der Atemwege reduziert wurde, weisen hingegen eine Zunahme der Stranglänge auf. Damit konnte gezeigt werden, dass das Serpin Spn43Aa an der Tracheenentwicklung beteiligt ist und durch die Stärke seiner Expression die Morphologie beeinflusst. Die Ausbildung von sekundären Verzweigungen steht unter der Kontrolle einer Vielzahl von Genen, deren Expression zeitlich terminiert ist und in der Phase vom 14. bis zum 16. Embryonalstadium seinen Aktivitätshöhepunkt hat [50]. Der Transkriptionsfaktor Tracheless (Trh) reguliert die Expression aller Gene für die Tracheenentwicklung, und ist damit auch an der Ausbildung von sekundären Atemwegsästen beteiligt. Trh aktiviert die Expression von *breathless (btl)* in den Atemwegszellen. Gene für die Ausbildung von sekundären Verzweigungen, wie *pointed* und *sprouty*, werden wiederum durch die Aktivierung des Btl-Signalweges induziert [106]. Die Expression des Gens *pointed*

sorgt für die Einleitung der Verzweigung in den von Trh aktivierten Zellen. Wird *pointed* konstitutiv exprimiert, kommt es zur vermehrten Ausbildung von sekundären Verzweigungen und einem stark verästelten Phänotyp [58, 107]. *Sprouty* hingegen verhindert die Verästelung in den benachbarten Zellen. Das Gen wird zwar ebenfalls durch den Btl-Signalweg aktiviert, kodiert allerdings einen Inhibitor, der sich in einem negativen Rückkopplungsmechanismus hemmend auf die Signalkaskade auswirkt. Es begrenzt das Wirkspektrum des Btl-Signals auf eine Region und beschränkt damit die Ausbildung sekundärer Äste auf die Positionen, die den Btl-Signalzentren am nächsten liegen. Sogenannte *sprouty*-Mutanten, die über kein funktionierendes *sprouty*-Gen verfügen, zeigen eine übermäßige Verzweigung, welche durch eine verstärkte Aktivität des Btl-Signalwegs induziert wird [59].

Auch das Serpin Spn43Aa wird in den Embryonalstadien 12 - 16 in den Zellen des Atemwegsepithels exprimiert [103, 108] und steht dabei unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Tracheless (Trh) [108]. Damit steht der Inhibitor in direkter Verbindung zum Btl-Signalweg, welcher für die korrekte Ausbildung der Sekundäräste zuständig ist. Bei Wildtyp-*Drosophila* äußert sich dies phänotypisch in der Bildung von zwei Sekundärästen an jedem der paarig vorliegenden Primärästen in jedem Segment des Embryos bzw. der Larve. Da für die Ausbildung der korrekten Anzahl ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der Aktivierung des Btl-Signalwegs und der negativen Regulierung durch *sprouty* notwendig ist, gibt es hier zwei mögliche Wege, wie das Serpin Spn43Aa in die Bildung von sekundären Verzweigungen eingreifen kann. Da die Überexpression von *spn43Aa* zu einer erhöhten Anzahl von Ästen führt, kann man daraus schlussfolgern, dass das Ausmaß der *spn43Aa*-Expression direkt proportional mit der Aktivität des Btl-Signalwegs einhergeht und eine *spn43Aa*-Expressionszunahme eine Signalwegaktivierung bedingt. Dies ist möglich, wenn Spn43Aa ähnlich wie *Pointed* zu einer positiven *Feedback*-Aktivierung des Btl-Signals führt, oder aber die inhibitorische Wirkung von *Sprouty* auf den Btl-Signalweg hemmt.

Die Fehlregulation von *spn43Aa* führt aber zusätzlich noch zu einem weiteren Phänotyp. Wird die Expression des Gens in den Atemwegen reduziert, bilden sich sekundäre Äste, die deutlich länger sind als die Äste gentechnisch unveränderter Tiere. Der Effekt ist in L3-Larven, nicht jedoch in L1-Larven messbar, und manifestiert sich damit nicht während der Atemwegsentwicklung im Embryonalstadium, sondern erst im Laufe der Larvenentwicklung. Es ist bekannt, dass die Länge der sekundären Atemwegsäste kontinuierlich im Verlauf des Embryonal- und Larvenstadiums zunimmt. Dabei haben Sauerstoffmangel oder die Größe des

Larvenkörpers keinen Einfluss auf die Länge der Tracheenäste. Die Zunahme des Durchmessers und der Länge der trachealen Verzweigungen findet nicht durch Zellteilung statt, sondern nur durch die Veränderung der Zellform, Zellanordnung und Vergrößerung der apikalen Membran der Epithelzellen [109].

Veränderungen in der Länge von trachealen Verzweigungen gehen einerseits mit Fehlfunktionen von Proteinen der *Septate Junctions*, den Septumverbindungen zwischen den Epithelzellen, einher. Ein Beispiel dafür ist das Gen *megatrachea*, dessen Mutation zur Bildung überlanger Äste führt [110]. Andererseits können Defekte an apikalen extrazellulären Matrix-Proteinen, die die Struktur der Chitinmatrix verändern, ebenfalls zu überlangen Tracheen führen [111, 112].

Aber auch der bereits mehrfach erwähnte Btl-Signalweg ist an der Ausprägung der korrekten Länge der sekundären Atemwegsäste beteiligt - über den Transkriptionsfaktor Grainy head (Grh). Grh wird in den trachealen Epithelzellen exprimiert, wobei seine Aktivität durch den Btl-Signalweg moduliert wird, und wirkt dem Btl-induzierten Wachstum der Atemwegsverzweigungen entgegen. Dabei funktioniert das Btl-Signal über zwei Schritte, indem es zunächst die Verlängerung der Tracheen induziert und anschließend über eine Aktivierung seines eigenen Antagonisten Grh übermäßiges apikales Zellwachstum verhindert. Damit ist Grh erforderlich, um das apikale Membranwachstum zu begrenzen und eine übersteigerte Verlängerung der Verzweigungen zu verhindern. Ein *Knockout* des Proteins Grainy head führt zu einem Phänotyp mit überlangen Tracheenästen [113].

Wie bereits beschrieben, steht auch *Spn43Aa* in direkter Verbindung zum Btl-Signalweg. Wenn eine Überexpression von *spn43Aa* mit einer übermäßigen Aktivierung des Btl-Signalwegs einhergeht und damit zu einer erhöhten Anzahl von Ästen führt, kann ein *Knockdown* des Serpins zu einem reduzierten und verminderten Btl-Signal beitragen. Wird der Signalweg nicht stark genug aktiviert, reicht dies eventuell nicht aus um den zweiten Schritt im Längenwachstum der sekundären Äste, den negativen Rückkopplungsmechanismus über den Antagonisten Grainy head, zu induzieren. Das Wachstum der apikalen Zellmembran wird nicht gestoppt, wodurch die Verzweigungen weiterwachsen. Die überlangen Äste manifestieren sich somit erst, nachdem das genetisch determinierte Längenwachstum bereits abgeschlossen wurde [113]. Diese Schlussfolgerung steht in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit detektierten Phänotyp: eine tracheenspezifische, reduzierte *spn43Aa*-Expression führte zu keiner messbaren Längenzunahme im 1. Larvenstadium, da zu diesem Zeitpunkt das

Längenwachstum noch nicht abgeschlossen ist. Im 3. Larvenstadium hingegen, sind die sekundären Äste signifikant verlängert, da infolge der reduzierten Spn43Aa-Aktivität der Btl-Signalweg und somit das Längenwachstum nicht inhibiert wurden.

4.1.2 Einfluss einer veränderten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von *Drosophila melanogaster*

Bevor man beginnt die Fitness von *Drosophila* zu messen und zu beschreiben, sollte hier erst einmal die Begrifflichkeit geklärt werden, da der Begriff „Fitness“ heute häufig in unterschiedlichen Bedeutungen gebraucht wird. Fitness wird hier sowie im Kontext der Evolutionsbiologie als Maß für die Anpasstheit an Umweltbedingungen verwendet [114]. Die Veränderung eines Merkmals bedingt durch eine Genmutation führt zu einer veränderten Interaktion eines Organismus mit seiner Umwelt. Diese veränderte Interaktion kann negativ sein, also von Nachteil für den Organismus, sie kann aber auch positiv sein, sich demnach vorteilhaft für den Organismus, sein Überleben in der Umwelt und den Erfolg seiner Reproduktion auswirken. Bei der Betrachtung dieser Arbeit bedeutet ein positiver Effekt auf die Fitness eine höhere Widerstandskraft gegenüber Umweltfaktoren, wie eine verringerte Sauerstoffkonzentration oder gegenüber Schadstoffen wie Zigarettenrauch. Ein direktes Maß für die Fitness ist die Anzahl der Nachkommen, aber auch indirekte Parameter wie Überlebensrate, Entwicklungszeit oder Lebensdauer, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, können ermittelt werden. Es geht also nicht darum, *Drosophila* möglichst viele Runden in einem kleinen Sportstadion fliegen zu lassen, sondern wie sich eine fehlregulierte Expression des Serpins *spn43Aa* in den Atemwegen von *Drosophila* auf die genannten Parameter auswirkt.

Als Inhibitor der Proteolyse ist es wahrscheinlich, dass eine veränderte Expression von *spn43Aa* in einem holometabolen Insekt wie *Drosophila melanogaster* einen Einfluss auf Parameter wie Mortalitätsrate der Larven und Puppen und Entwicklungsdauer der Larven hat. *Drosophila* durchläuft während ihrer Entwicklung eine Metamorphose vom Larvenstadium zur adulten Fliege. Während dieses Puppenstadiums wird im Prozess der Histolyse das larvale Gewebe, bis auf einige Primordialzellen und Stammzellenbereiche der Imaginalscheiben, aufgelöst und die Organe der adulten Fliege gebildet. Das Hormon Ecdyson sorgt dabei sowohl für die Einleitung der Metamorphose, als auch für die Freisetzung von Proteasen, wie die Serinprotease Stubble, die für eine Degradierung des larvalen Gewebes sorgen [104, 105].

Auch im Larvenstadium, während der Übergänge zwischen den larvalen Entwicklungsstadien von L1 zu L2, und von L2 zu L3 findet eine Histolyse statt. Beim Übergang zwischen den Stadien wird die innere chitinöse Auskleidung der Tracheen entfernt und durch eine neue ersetzt. Die alte Kutikula wird dabei durch Chitinasen und Proteasen degradiert [115, 116]. Spn43Aa inhibiert Serinproteasen und reguliert damit den Prozess der Proteolyse. Wird die Expression des Proteaseinhibitors manipuliert, kann das die Proteolyse und Histolyse des larvalen Gewebes und der trachealen Kutikula beeinträchtigen und damit die Entwicklung der Larven beeinflussen.

Des Weiteren ist bekannt, dass Spn43Aa an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) durch Phenoloxidasen beteiligt ist [117]. Phenoloxidasen liegen als inaktives Vorläuferprotein vor und werden durch Serinproteasen, wie beispielsweise Hayan, in ihre aktive Form gespalten [118]. Spn43Aa verhindert durch Inhibierung dieser Serinproteasen die Aktivierung der Phenoloxidasen und hemmt die Produktion von ROS. So führt eine verminderte Expression von *spn43Aa* somit zu einer erhöhten Produktion von ROS. Studien mit *Drosophila* und anderen Invertebraten zeigen, dass die Zunahme der ROS-Produktion in einem Organismus sich wiederum negativ auf die Entwicklung und Überlebensdauer auswirkt [119–121].

Der Einfluss einer atemwegsspezifischen *spn43Aa*-Fehlexpression auf die Fitness von *Drosophila* wurde 1) unter optimalen Bedingungen analysiert um die Effekte des Gens zu beleuchten, sowie 2) unter Stressbedingungen wie einer akuten Hypoxie oder wiederholter Exposition mit Zigarettenrauch gemessen.

Zunächst wird hier die Fitness unter optimalen Bedingungen betrachtet und anschließend die Anpassungsfähigkeit auf Stressfaktoren wie Sauerstoffmangel und Zigarettenrauch besprochen. Populationen von Tieren, in den eine *spn43Aa*-Fehlregulation induziert wurde, wurden vor Beginn und während der Metamorphose untersucht und anhand der Anzahl brauner Puppen und geschlüpfter Imagines wurden die Überlebensraten ermittelt. Eine erhöhte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen führt zu einer erhöhten Sterblichkeit der Larven, sodass weniger Tiere in das Puppenstadium eintreten. Tiere, die das Puppenstadium erreicht haben, zeigen annähernd identische Überlebensraten wie die genetische Kontrolle. Somit hat eine erhöhte *spn43Aa*-Expression einen negativen Einfluss auf die Larvenentwicklung und das Eintreten in die Metamorphose, es beeinflusst jedoch nicht den Prozess und die Vollendung der Metamorphose. Die Larven mit einer erhöhten *spn43Aa*-

Expression in den Atemwegen, die erfolgreich in die Metamorphose eintreten und diese beenden, weisen eine Entwicklungsverzögerung auf. Wie bereits beschrieben werden während der Metamorphose, ausgelöst durch einen Anstieg des Hormons Ecdyson, durch Histolyse larvale Organe aufgelöst und abgebaut. Auch in den Atemwegen der Fliege sind unter anderem Proteasen, wie die Serinprotease Stubble, an diesem Prozess beteiligt [104, 105, 115]. Spn43Aa ist als Serinproteaseinhibitor ein negativer Regulator der Proteolyse. Daher kann die Metamorphose bei einer stark erhöhten Expression dieses Gens nicht eintreten. Der unmittelbar vor Einsetzen der Metamorphose gemessene *spn43Aa*-Expressionslevel in den Atemwegen von L3-Larven gibt einen durchschnittlichen Wert aus 40 zufällig ausgewählten Tieren wieder. Die tatsächliche Expression einzelner Individuen kann dabei variieren. Wie bereits beschrieben, wurde unter den *spn43Aa*-überexprimierenden Larven eine erhöhte Mortalität vor Einsetzen der Metamorphose beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Tiere aufgrund einer besonders starken Überexpression in den Atemwegen nicht fähig sind die, durch Spn43Aa gehemmte, Proteolyse zu aktivieren und den Prozess der Metamorphose zu induzieren. Der Population der Larven, die sich erfolgreich verpuppt, gelingt es die inhibitorische Wirkung von Spn43Aa durch Gegenregulation zu kompensieren. Diese Tiere benötigen allerdings mehr Zeit bis zur Verpuppung als Artgenossen mit einer endogenen *spn43Aa*-Expression. Auch während des Larvenstadiums, zwischen den larvalen Entwicklungsstadien von L1 zu L2, und von L2 zu L3, findet in den Atemwegen eine Proteolyse statt, dabei wird die innere chitinöse Auskleidung der Tracheen durch Chitinasen und Proteasen degradiert und durch eine neue Kutikula ersetzt [115, 116]. Eine erhöhte Expression des Inhibitors *spn43Aa* in den Atemwegen, verhindert auch diese Häutungsprozesse und verzögert somit die Entwicklung und das Wachstum der Larven zusätzlich.

Nachdem nun die Effekte einer induzierten *spn43Aa*-Expressionerhöhung betrachtet wurden, wird im Folgenden eine reduzierte Expression beleuchtet. Wie die Expressionserhöhung, führt auch eine reduzierte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen zu einer verzögerten Entwicklung der Larven und einem dadurch verspäteten Eintritt in die Metamorphose. Diese Beobachtung lässt sich allerdings nicht durch einen Einfluss der *spn43Aa*-Expression auf die Histolyse erklären. Ein weiterer möglicher Faktor, der durch Spn43Aa beeinflusst wird und durchaus die larvale Entwicklung reguliert, ist die Morphologie der Atemwege. Die Fehlexpression von *spn43Aa* bedingt eine veränderte Atemwegsstruktur, die wiederum zu

Folgeschäden führen kann. Da die Körpermaße der Larve im Laufe eines Stadiums zunehmen, steigt der Sauerstoffbedarf im Gewebe an. Die Größe des Tracheensystems, wie zum Beispiel die Länge des dorsalen Stranges oder der Durchmesser der Stigmen, bleibt innerhalb eines Stadiums bis zu Häutung jedoch unverändert. Der steigende Sauerstoffbedarf durch das Wachstum der Larven in Kombination mit einer gleichbleibenden Tracheenstruktur führt dazu, dass der Sauerstoffbedarf das Angebot übersteigt. Der zelluläre Sauerstoffpartialdruck nimmt mit der Zeit innerhalb eines Entwicklungsstadiums ab und löst die Häutung aus [122–124]. Fliegen, in denen eine gezielte Reduktion oder Überexpression von *spn43Aa* induziert wird, bilden verlängerte Atemwegsäste, bzw. eine höhere Anzahl dieser. Beide Phänotypen bringen eine Vergrößerung des Volumens und somit eine vergrößerte Oberfläche mit sich, die den Sauerstoffaustausch verbessern. Somit ist der kritische Zeitpunkt, an dem der Sauerstoffmangel die Häutung oder Verpuppung auslöst, zeitlich verschoben, was sich in der verzögerten Entwicklung äußert. Dieser Effekt der veränderten Atemwegsmorphologie wird in der Überexpressionslinie durch die Zeitspanne, bis eine Gegenregulation der *spn43Aa*-Expression stattfindet, noch verstärkt, weshalb hier die Entwicklung im Vergleich zur *spn43Aa*-*Knockdown*-Linie stärker verzögert ist.

Die Manipulation der *spn43Aa*-Expression hat aber nicht nur Auswirkungen auf die larvale Entwicklung. Auch in der Überlebensdauer der adulten Fliegen ist ein Einfluss der modifizierten atemwegsspezifischen Genexpression messbar. Bei Männchen mit einer reduzierten Expression ist die mittlere Überlebensdauer verkürzt. Männchen mit einer erhöhten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen leben hingegen länger verglichen mit der genetischen Kontrolle, in welcher das Expressionslevel von *spn43Aa* unverändert ist und dem von Wildtyp-Fliegen gleicht. Bei Weibchen ist die Auswirkung weniger stark ausgeprägt, jedoch ist die mittlere Lebensdauer sowohl bei einer erhöhten als auch bei einer reduzierten Expression von *spn43Aa* leicht verkürzt. Die maximale Lebenszeit der Imagines zeigt hier jedoch keinen signifikanten Unterschied. Steht eine reduzierte Expression von *spn43Aa* tatsächlich mit einer erhöhten endogenen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Verbindung und im Umkehrschluss eine erhöhte Expression mit einem reduzierten ROS-Level, liegt hier ein möglicher Grund für die veränderte Lebensdauer der Imagines, da die endogene ROS-Konzentration durchaus mit der Lebensdauer von *Drosophila* in Verbindung gebracht wird [119–121]. Reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen als freie Radikale eine Reihe biologischer Prozesse in den Zellen. Sie modifizieren Proteine, inaktivieren Enzyme, schädigen

die DNA und steuern die Regulation der Genexpression [125]. Die Schädigung und reduzierte Lebensfähigkeit der Atemwegszellen durch erhöhte ROS-Level kann sich auf die Lebensdauer des gesamten Organismus auswirken, auch wenn alle anderen Zelltypen im Körper davon unbeeinflusst sind [126]. Somit kann sich eine erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen infolge einer Reduktion von *spn43Aa* negativ auf die Überlebensdauer auswirken. Im Umkehrschluss ist auch ein positiver Effekt, also Lebensverlängerung, durch eine reduzierte Menge an ROS möglich [119].

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine modifizierte Expression des Serpins *spn43Aa* in den Atemwegen sich unter optimalen Umweltbedingungen negativ auf die Entwicklung und die Überlebensrate der Larven sowie das Überleben von *Drosophila*-Imagines auswirkt und somit die Fitness der Tiere beeinträchtigt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich eine fehlregulierte *spn43Aa*-Expression auf die Fitness der Tiere unter Stressbedingungen wie Hypoxie auswirkt. Die Effekte einer akuten oder auch chronischen Hypoxieexposition auf *Drosophila* wurden bereits vielfach untersucht, insbesondere mit Fokus auf die Atemwege, die Entwicklung und die Genexpression. Hypoxie, ein Stressfaktor, der durchaus auch Relevanz bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma hat [127], bietet sich daher an um die Auswirkungen einer fehlregulierten Expression des Serpins *spn43Aa* im Atemwegsepithel zu charakterisieren. Eine respiratorische Insuffizienz aufgrund der erschwerten Diffusion von Sauerstoff bei Patienten, die an *Asthma bronchiale* erkrankt sind, führt zu sauerstoffarmen Bedingungen in der Alveolar- und Kapillarmembran [127]. Diese Situation wird durch eine Herabsetzung der Sauerstoffkonzentration bei *Drosophila*-Larven nachgestellt. Anschließend wurde das Expressionslevel von *spn43Aa* in isolierten larvalen Atemwegen gemessen. In allen verwendeten Linien führt eine Hypoxieexposition zu einer Reduktion der *spn43Aa*-Expression in den Tracheen von *Drosophila*. Wenn man die ersten Folgen einer Hypoxie auf zelluläre Prozesse näher betrachtet, erscheint die Expressionsreduktion durchaus nachvollziehbar. Unter hypoxischen Bedingungen nutzen Mitochondrien den Prozess der Glykolyse um ATP zu synthetisieren. Diese ist weit weniger effizient als die oxidative Phosphorylierung unter aeroben Bedingungen. Es werden mehr Elektronen freigesetzt, wodurch sich mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden. Damit stellt die ROS-Produktion eine wichtige frühe Reaktion auf Hypoxie dar. Das freigesetzte ROS dient als *second messenger* und aktiviert zum Beispiel den HIF-1-Signalweg. Dieser wiederum reguliert unter anderem Gene, die die Angiogenese in

den Atemwegen steuern, um die Sauerstoffzufuhr zu erhöhen [128, 129]. Es ist bekannt, dass eine erhöhte ROS-Produktion mit einer reduzierten Expression des Serpins *spn43Aa* einhergeht [117]. Um Signalwege zu aktivieren, die den Folgen der Hypoxie entgegenwirken und das Überleben der Zelle sicherstellen, ist eine hohe Expression von *spn43Aa* hinderlich und wird inhibiert.

Als erster Messwert für die Reaktion der Larven mit modifizierter *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen gegenüber einer akuten Hypoxie wurde die Larvenaktivität während der Exposition ermittelt. Alle drei untersuchten Linien 1) *spn43Aa*-überexprimierende Linie, 2) *spn43Aa*-*Knockdown*-Linie und 3) Kontrolllinie mit einer endogenen *spn43Aa*-Expression zeigen während der Exposition ein verstärktes Vermeidungsverhalten, indem die Tiere an der Wand des Kulturröhrchens emporkriechen, verglichen mit Tieren, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden. Bei diesem Verhalten der *Drosophila*-Larven handelt es sich um ein instinktives Verhalten, mit dem sie versuchen einer unangenehmen oder schädlichen Situation wie Hypoxie zu entkommen. Dabei verstärkt sich das Fluchtverhalten, sowohl die Distanz als auch die Geschwindigkeit, mit zunehmender Stärke und Dauer des Sauerstoffmangels [94, 95, 130]. Die transgenen Linien, mit reduzierter bzw. erhöhter Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen, reagieren dabei in der ersten Hälfte des Experiments identisch. In beiden genetischen Gruppen begeben sich mehr Larven aus dem Medium an die Wand des Kulturröhrchens und zeigen damit ein verstärktes Vermeidungsverhalten im Vergleich zur genetischen Kontrolle. Diese beiden Linien besitzen durch ihre jeweilige veränderte Atemwegsmorphologie zusätzliche bzw. längere Verzweigungen. Dies vergrößert die Oberfläche der Atemwege und damit die Fläche, welche den Reiz Hypoxie wahrnimmt. In *Drosophila* dienen die Atemwege als sensorisches Organ für Sauerstoffmangel. Durch ihre Nähe zum zentralen Nervensystem, kann das Signal direkt weitergeleitet werden [131, 132]. Eine vergrößerte Oberfläche führt somit zu einem verstärkten Signal als Reaktion auf die Hypoxie und damit zu einem verstärkten Vermeidungsverhalten der Tiere [95].

Anschließend wurde das Zusammenspiel der veränderten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen und einer akuten Hypoxie in Bezug auf die schon beschriebenen Fitnessparameter Überlebensrate, Entwicklungszeit und Lebensdauer der Imagines untersucht. Die Überlebensrate der Larven weist keinen Unterschied in der Anzahl gebildeter Puppen zwischen den Tieren, die unter normoxischen und jenen, die unter hypoxischen

Bedingungen gehalten wurden. Aber Hypoxieexposition führt zu einer leicht reduzierten Anzahl an geschlüpften Imagines in allen drei untersuchten Linien. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit publizierten Daten, wonach sich durch Hypoxieexposition die Mortalität von *Drosophila* erhöht [122]. In der Entwicklungszeit sind zwei unterschiedliche Reaktionen auf den Sauerstoffmangel messbar. Zunächst kommt es zu einem früheren Beginn der Metamorphose in allen drei untersuchten *Drosophila*-Linien. Dass sich hypoxieexponierte Larven noch während der Exposition und in den ersten zehn Stunden im Anschluss daran früher verpuppen als Tiere, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, liegt an einem Notprogramm. Werden späte L3-Larven, welche in ihrer Entwicklung bereits kurz vor der Metamorphose stehen, einem Stressfaktor wie Hunger, Hitze oder eben Hypoxie ausgesetzt, gehen sie direkt in die Metamorphose über, da das Puppenstadium eine Art Dauerstadium darstellt und das Tier vor ungünstigen Umweltbedingungen geschützt ist [133, 134]. Im Anschluss an die zunächst früher eintretende Verpuppung nach Hypoxieexposition zeigt sich eine Entwicklungsverzögerung der übrigen Tiere mit einer reduzierten *spn43Aa*-Expression in den Atemwegen. Der Aspekt, dass eine Hypoxie zu einer Entwicklungsverzögerung führt, wurde bereits vielfach beobachtet [122, 123, 135]. Der Prozess der Verpuppung wird in Larven durch einen raschen Anstieg des Hormons Ecdyson eingeleitet, das unter anderem über den Insulin-Signalweg reguliert wird [136]. Werden Larven sauerstoffarmen Bedingungen ausgesetzt, wird das Insulin-Signal gehemmt und dadurch die Freisetzung des Hormons Ecdyson reduziert [137]. Der Ecdyson-Peak, der die Metamorphose letztendlich einleitet, wird zeitlich verzögert. Bei Larven, die zum Zeitpunkt der Hypoxieexposition noch nicht weit genug entwickelt sind, um die Notverpuppung einzuleiten, wird das dritte Larvenstadium verlängert und die Metamorphose tritt später ein. Als letzter Parameter für einen Einfluss der Hypoxieexposition auf die Fitness der Fliege wurde die Lebensdauer der adulten Fliegen gemessen. Auf *Drosophila* Männchen hat diese einmalige Exposition keinen Einfluss, unabhängig von ihrem Genotyp. Bei Weibchen führt die Hypoxie sowohl in der *spn43Aa-Knockdown* - als auch Überexpressionslinie zu einer erhöhten mittleren Lebensdauer der Imagines. Interessanterweise kann Hypoxie tatsächlich eine erhöhte Lebenszeit zur Folge haben. Zellen reagieren auf Sauerstoffmangel, indem sie durch gezielte Genexpression die Energieproduktion optimieren und Signalkaskaden aktivieren, die Zellschäden verhindern oder diese reparieren. Die Reaktion auf den Sauerstoffmangel wird durch den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF gesteuert. Bei dem Fadenwurm

Caenorhabditis elegans ist eine Induktion von HIF-1, durch das Wachstum bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen bereits ausreichend, um die Lebensdauer von adulten Tieren zu erhöhen und hat damit eine ähnliche Wirkung auf die Lebensdauer wie einer Überexpression von *hif-1* [138–140]. Durch hypoxischen Stress wird unter anderem auch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxO induziert [141, 142]. FoxO beeinflusst zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Autophagie, Apoptose und auch Stressresistenz beispielsweise gegenüber Sauerstoffmangel [143]. Bei *C. elegans* fördert das FoxO-Homolog DAF-16 die Widerstandsfähigkeit gegen hypoxischen Stress sowie eine längere Lebenszeit [144–146]. Auch für *Drosophila* konnte dieser Effekt bereits nachgewiesen werden [147]. Es ist also möglich, dass akute Hypoxie während der larvalen Entwicklungsphasen dazu führt, dass sogenannte *Rescue*-Mechanismen aktiviert werden. Trotz der dazwischenliegenden Metamorphose ist es durchaus plausibel, dass diese Mechanismen noch im erwachsenen Tier weiterhin wirksam sind, obwohl kein äußerer Reiz vorhanden ist. Da im Alter ähnliche Schutzmechanismen und Genexpressionsmuster wie bei hypoxischen Stress auftreten, wirkt sich eine intrinsisch erhöhte Expression von protektiven Faktoren wie HIF-1 und FoxO positiv auf das Überleben der Fliege aus [148, 149].

Zusammengefasst konnte hier gezeigt werden, dass alle analysierten *Drosophila*-Linien, sowohl diejenigen mit einer Wildtyp-, als auch jene mit einer manipulierten Expression des Serpins *spn43Aa* in den Atemwegen mit erhöhter Mortalität und veränderter Entwicklungszeit auf eine akute Hypoxie reagieren. Das *spn43Aa*-Expressionslevel hat dabei keinen Einfluss. Allenfalls im Hinblick auf das Vermeidungsverhalten zeigen Larven mit einer fehlregulierten *spn43Aa*-Expression eine reduzierte Anpassungsfähigkeit im Vergleich zu Tieren der genetischen Kontrolle. Larven mit einer erhöhten oder reduzierten Expression von *spn43Aa* reagieren aufgrund ihrer veränderten Atemwegsstruktur mit einem verstärkten Vermeidungsverhalten auf die hypoxischen Bedingungen, was darauf hindeutet, dass sie den hypoxischen Reiz stärker wahrnehmen. Dadurch führt die veränderte Atemwegsmorphologie zu einem Nachteil der Tiere gegenüber dem Stressfaktor Hypoxie.

Begibt man sich auf Fehlersuche, könnte man annehmen, dass eine einmalige Exposition mit Hypoxie für die hier gemessenen Parameter eventuell nicht stark genug ist. In der Literatur werden häufig wiederholte oder dauerhafte Hypoxieexpositionen beschrieben [122–124, 130, 150, 151]. Daher wäre es ratsam den Einfluss einer modifizierten *spn43Aa*-Expression auf die

Fitness und Anpasstheit gegenüber dem Stressfaktor Hypoxie mit einer mehrfachen Exposition zu wiederholen.

Diese, aus Experimenten der Hypoxieexposition gewonnenen, Erkenntnisse wurden im Hinblick auf den zweiten exogenen Stressfaktor Zigarettenrauch angewandt. Hier wurden die Larven an drei aufeinanderfolgenden Tagen in den Stadien L1, L2 und L3 jeweils für eine Stunde Zigarettenrauch ausgesetzt. Es ist bekannt, dass Rauchen einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von Asthma ist. Hinzu kommt, dass Zigarettenrauch mit vermehrten Asthmaanfällen und einer allgemeinen Verschlimmerung des Krankheitsbildes einhergeht [152, 153].

Im Anschluss an die letzte Exposition wurden Fitnessparameter wie Überlebensrate der Larven und Puppen, Entwicklungsdauer und die Lebenszeit bis zum Tod der geschlüpften Imagines dokumentiert. Weder in der *spn43Aa*-überexprimierenden Linie, der *spn43Aa*-*Knockdown*-Linie oder der genetischen Kontrolllinie hat die wiederholte Exposition mit Zigarettenrauch eine Auswirkung auf die Mortalität von Larven und Puppen. Ferner unterschieden sich die Überlebensraten der drei hier analysierten *Drosophila*-Linien nicht voneinander.

Eine eindeutige Folge des Zigarettenrauchs ist in der Entwicklungszeit nachweisbar. Hier verzögert die Exposition den Zeitpunkt bis zur Verpuppung der Larven und verlängert zusätzlich die Dauer des Puppenstadiums. Dabei ist der Effekt in den beiden *spn43Aa*-fehlexprimierenden Linien stärker als in der genetischen Kontrolle. Zwischen einer reduzierten oder erhöhten Expression des Serpins *spn43Aa* besteht jedoch kein Unterschied in der Stärke der Reaktion. Es ist bekannt, dass das Nikotin im Zigarettenrauch entwicklungsverzögernd wirkt. Je höher die Nikotin- oder Rauchdosis dabei ist, desto stärker ist der Effekt [154]. Durch die veränderte Atemwegsstruktur, die sich in mehr oder verlängerten Atemwegsästen äußert, besitzen die beiden *spn43Aa*-dysexprimierenden Linien eine größere Angriffsfläche für den aufgenommenen Zigarettenrauch. Dadurch nehmen diese Tiere mehr Nikotin über die Tracheen auf als Tiere der Kontrollgruppe, wodurch sich der Effekt der Entwicklungsverzögerung verstärkt.

Die Betrachtung der Überlebenszeit der adulten Fliegen zeigt zwei unterschiedliche Auswirkungen des Tabakrauchs. Zum einen führt Zigarettenrauch bei männlichen Tieren mit einer manipulierten *spn43Aa*-Expression zu einer verkürzten Lebenszeit. Wohingegen eine Konfrontation mit Zigarettenrauch bei Kontrolltieren geschlechtsunabhängig zu einer leicht

erhöhten mittleren Lebenszeit führt. Obwohl in der Literatur zumeist postuliert wird, dass Zigarettenrauch bei *Drosophila* zu einer reduzierten Überlebenszeit führt [155], können unter den in dieser Arbeit angewandten Bedingungen ähnliche Schutzmechanismen aktiviert werden, wie sie bereits für Hypoxie als Stressfaktor beschrieben wurden. Zigarettenrauch ist eine komplexe Mischung aus über 4000 chemischen Verbindungen und es wurden hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowohl im Aktiv- als auch im Passivrauch nachgewiesen [156]. Zigarettenrauch-vermittelter oxidativer Stress verursacht unter anderem DNA-Schäden, inaktiviert Enzyme [125] und induziert Schutzmechanismen über den Nrf2-Signalweg oder FoxO. Ähnlich wie eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors FoxO die Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress und eine längere Lebenszeit fördert [144–147], verlängert sich die Lebenszeit von Tieren, die mit Zigarettenrauch behandelt wurden, wenn der Nrf2-Signalweg konstitutiv aktiviert ist [155]. Wie zuvor bei der Diskussion der Folgen der Hypoxieexposition thematisiert, ist es auch hier durchaus denkbar, dass eine wiederholte Exposition der Larven mit Zigarettenrauch dazu führt, dass *Rescue*-Mechanismen aktiviert werden, die auch nach Beendigung der Stresssituation im erwachsenen Tier protektiv wirken. Da bei zellulären Alterungsprozessen ähnliche Genexpressionsmuster aktiviert werden, wie zum Schutz gegen oxidativen Stress, wirkt sich eine intrinsisch erhöhte Expression von protektiven Genen wie Nrf2 und FoxO positiv auf das Überleben aus [148, 149].

Imagines, die in ihren Atemwegen eine *spn43Aa*-Fehlexpression erfahren, reagieren auf die Rauchbehandlung mit einer reduzierten Lebenszeit. Mit Sicherheit sind auch bei Tieren dieser beiden Linien die *Rescue*-Mechanismen aktiv und protektiv, aber die Kombination aus der Fehlregulation eines essentiellen Genes (*spn43Aa*) und einer massiven Konfrontation mit dem Stressor Rauch kann in diesen Tieren nicht mehr kompensiert werden, was sich in einer reduzierten Lebensdauer manifestiert. Die schadhafte Wirkung des Zigarettenrauchs wird bei diesen Tieren durch einen weiteren Aspekt verstärkt, nämlich durch die bereits mehrfach erwähnte Oberflächenvergrößerung des respiratorischen Epithels. Vermutlich ist auch hier der Effekt der verkürzten Lebensdauer ähnlich wie für die Entwicklungszeit abhängig von der erhaltenen Dosis an Zigarettenrauch. Auf diese Weise nehmen die *spn43Aa*-fehlexprimierenden Tiere mehr Nikotin und Schadstoffe aus dem Zigarettenrauch auf, was die damit einhergehenden Schäden multipliziert und die Lebenszeit dieser *Drosophila*-Linien verkürzt.

Zusammenfassend weist keiner der analysierten Parameter darauf hin, dass ein *Knockdown* oder eine erhöhte Expression des Serpins *spn43Aa* im Atemwegsepithel zu einer effizienteren Resistenz von *Drosophila melanogaster* gegenüber Zigarettenrauch führt. Tiere beider Linien reagieren aufgrund ihrer veränderten Tracheenmorphologie aber unabhängig vom Expressionslevel des Serpins mit einer verzögerten larvalen Entwicklung, einer verlängerten Metamorphose und einer verkürzten Lebensdauer. Bei Tieren mit einer unveränderten *spn43Aa*-Expression verzögert die Konfrontation mit Zigarettenrauch ebenfalls die larvale Entwicklung. Im Gegensatz zu *spn43Aa*-manipulierten *Drosophila*, sind diese Fliegen jedoch in der Lage eine, während der larvalen Entwicklung widerfahrene Konfrontation mit Tabakrauch, durch die Aktivierung von Zellschutzmechanismen zu kompensieren, wodurch sich der zelluläre Stress während der Larvenentwicklung positiv auf die Lebensdauer der erwachsenen Fliegen auswirkt.

Die übergeordnete Frage dieser Arbeit lautet, ob das humane SERPINB3 als Suszeptibilitätsgen zu der Entwicklung von *Asthma bronchiale* beiträgt und welche Funktion in den Atemwegen es dabei übernimmt. Diese Fragestellung wurde anhand seines Orthologs *spn43Aa* im Modellsystem *Drosophila melanogaster* evaluiert, indem der Einfluss einer modifizierten Expression des Serpins in den Atemwegen sowohl auf die Tracheenmorphologie als auch auf die Fitness von *Drosophila* untersucht wurde. Das Serpin ist maßgeblich an der embryonalen Entwicklung der Atemwege beteiligt und verändert durch seine Fehlexpression die Struktur der Atemwege schwerwiegend. Auch bei Asthmapatienten ist die Morphologie der Lunge verändert und die Funktion dadurch beeinträchtigt [4, 157]. Da gezeigt werden konnte, dass eine veränderte Expression von *spn43Aa* in der Fliege die Struktur der Atemwege verändert und deren Funktion beeinträchtigt, ist es möglich, dass ein verändertes Expressionslevel von SERPINB3 in der menschlichen Lunge ähnliche strukturelle Veränderungen und dadurch eine Beeinträchtigung der Atemwegsfunktion bewirkt. Es wurde bereits gezeigt, dass das SERPINB3-Level im Lungengewebe von Patienten mit Asthma, aber auch systemisch im Serum, erhöht ist [18, 24, 25]. Dies spricht dafür, dass das erhöhte SERPINB3-Niveau keine Folge der Erkrankung ist, sondern ihr eine fehlerhafte und zu hohe Expression des Gens zugrunde liegt. Diese erhöhte Expression kann in der Lunge, ähnlich wie *spn43Aa* in der Fruchtfliege, zu strukturellen Veränderungen führen, welche die Atemwege anfälliger gegen Umweltreize und Allergene machen und so maßgeblich zur Entwicklung der Krankheit beitragen.

Asthma bronchiale ist aber nicht nur durch eine veränderte Struktur der Atemwege charakterisiert. Die Atemwege reagieren hyperreagibel auf äußere Reize wie Allergene und Reizstoffe, physische Anstrengung oder kalte Luft. Daher wurden die Auswirkungen einer veränderten Expression des SERPINB3-Orthologs *spn43Aa* in dieser Arbeit anhand von Parametern, die mit der Toleranz von *Drosophila melanogaster* gegenüber Sauerstoffmangel und Zigarettenrauch in Verbindung stehen, untersucht.

Aus den in *Drosophila* erhobenen und hier präsentierten Daten lässt sich zusammenfassen, dass eine fehlregulierte Expression von *spn43Aa* in den Atemwegen und die damit verbundene veränderte Atemwegsstruktur die Entwicklung und das Überleben der Fliege grundsätzlich negativ beeinflusst. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die bei Asthmapatienten beobachtete erhöhte SERPINB3-Expression ebenso negativ auf die Entwicklung der Atemwege auswirkt und damit die Entwicklung der Erkrankung *Asthma bronchiale* begünstigt. Damit stellt SERPINB3 ein potentielles Asthma-Suszeptibilitätsgen dar, dessen Funktion in den Atemwegen in weiteren Studien genauer untersucht werden sollte.

4.2 Charakterisierung der fehlregulierten Expression des Serpins *CG14933* in den Atemwegen

Nachdem die Folgen einer Fehlregulation des SERPINB3-Orthologs *spn43Aa* im respiratorischen Epithel des Modellorganismus charakterisiert wurden, werden im folgenden Abschnitt die Auswirkungen einer modifizierten Expression des Serpingens *CG14933* auf die Atemwegsentwicklung und Fitness von *Drosophila melanogaster* beleuchtet. Bei *CG14933* handelt es sich um das Ortholog des humanen Serpingens SPINK5 in *Drosophila*. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Träger von Mutationen in der Gensequenz des Serpins SPINK5 ein erhöhtes Risiko besitzen, Asthma zu entwickeln [17]. Um die Frage zu beantworten, wie das Serpin zu der Entwicklung von *Asthma bronchiale* beiträgt und welche Funktion in den Atemwegen es dabei übernimmt, wurde die fehlregulierte Expression des zu SPINK5 orthologen Gens *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster* nachgestellt. Im Folgenden werden die Modelle zur erniedrigten sowie erhöhten Expression von *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster* vorgestellt und ihre Funktion im Kontext der Tracheenmorphologie, sowie anhand verschiedener Fitnessparameter charakterisiert.

Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit war nur wenig über den Serinproteaseinhibitor *CG14933* bekannt. Sowohl das humane Serpin SPINK5 als auch das in *Drosophila* vorkommende orthologe Protein *CG14933* besitzen eine Proteaseinhibitor-Aktivität [158]. In einer Studie von Gelbart und Emmert (2013) wurden die *CG14933*-Expressionsprofile in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* ermittelt. Das Gen wird am stärksten während der späten Embryogenese (Stadium 16 - 17), im frühen dritten Stadium der larvalen Entwicklung, sowie in der frühen Phase der Metamorphose exprimiert [159]. Über die Expressionsmuster in den einzelnen Geweben oder die Funktion des Serpins ist bis zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde die Expression des SPINK5-Orthologs *CG14933* in den Tracheen der *Drosophila*-Larve untersucht. Diese Analyse hat ergeben, dass *CG14933* in den Atemwegen von L3-Larven stark exprimiert wird, was darauf hinweist, dass es in den Atemwegen zu diesem Zeitpunkt eine wichtige Funktion erfüllt. Um eine detaillierte Charakterisierung der atemwegsspezifischen Funktion durchzuführen, wurden Fliegenlinien zum gezielten *Knockdown* und zur Überexpression des Serpins *CG14933* herangezogen. Nach der Kreuzung mit der Treiberlinie (*ppk4*-GAL4), die eine atemwegsspezifische Expression des Zielgens unter der transkriptionellen Kontrolle des *ppk4*-Promotors ermöglicht, wurde die Effizienz des *Knockdowns* und der Überexpression des Gens in den isolierten larvalen Tracheen dieser Fliegenmodelle nachgewiesen. Unter Verwendung dieser beiden Fliegenlinien werden gezielt die Einflüsse einer reduzierten oder verstärkten Serpin-Expression auf die Atemwegsentwicklung und auf die Fitness von *Drosophila melanogaster* charakterisiert.

4.2.1 Einfluss einer modifizierten *CG14933*-Expression auf die Tracheenmorphologie von *Drosophila melanogaster*

Als erster Punkt in der Charakterisierung wurde der Einfluss einer *CG14933*-Dysregulation auf die Tracheenmorphologie in *Drosophila*-Larven untersucht. Hierfür wurde die Anzahl und Länge der sekundären Tracheenäste im dritten thorakalen Segment von Larven des ersten und dritten Entwicklungsstadiums gemessen.

Die atemwegsspezifische Dysexpression von *CG14933* führt zu einer signifikant erhöhten Anzahl von Sekundärästen in Tieren beider Stadien unabhängig davon, ob ein *Knockdown* oder eine Überexpression des Zielgens stattfindet. Allerdings ist der gemessene Effekt stärker bei

einer *CG14933*-Überexpression. Darüber hinaus verringert ein *Knockdown* die Länge der sekundären Zweige in Larven des dritten Entwicklungsstadiums.

Es ist eine Vielzahl von Genen bekannt, deren Mutation oder Fehlexpression zu einer veränderten Tracheenmorphologie führt. Veränderungen in der Länge von trachealen Verzweigungen gehen einerseits mit Fehlfunktionen in Proteinen der Septumverbindungen zwischen den Epithelzellen einher [110]. Auch das Transmembranprotein Wurst ist an der trachealen Morphogenese beteiligt. Ein *Knockout* des Gens in früheren Embryonalstadien führt zu einer Verlängerung der Tracheen, wodurch die Tracheenäste eine gekringelte Form annehmen [160, 161]. Die Anzahl an ausgebildeten sekundären Ästen wird beispielsweise von den beiden Genen *sprouty* und *pointed* beeinflusst. Wird *pointed* konstitutiv exprimiert, kommt es zur vermehrten Ausbildung von sekundären Verzweigungen [58, 107]. Die Expression von *sprouty* hingegen inhibiert die Entwicklung sekundärer Verzweigungen. Hier führt ein *Knockout* des Gens ebenfalls zu einer übermäßigen Verzweigung [59]. Die Beobachtung, dass ein *Knockdown* sowie Überexpression desselben Gens den gleichen Phänotyp hervorbringt, ist jedoch atypisch.

Wie bereits für das Serpin *spn43Aa* beschrieben, unterliegt die Ausbildung von sekundären Verzweigungen einer genetischen Kontrolle und findet während der späten Embryonalentwicklung zwischen dem 14. und 16. Stadium statt [50]. Auch von dem Gen *CG14933* wissen wir, dass es im späten Embryonalstadium seine maximale Expression aufweist [159]. In dieser Phase der Entwicklung wird die Expression zahlreicher Gene, die an der Ausbildung von sekundären Atemwegsästen beteiligt sind, durch den Transkriptionsfaktor Tracheless (Trh) reguliert. So zum Beispiel aktiviert Trh die Expression von *breathless (btl)* in den Atemwegszellen. Eine Induktion der *btl*-Expression hat eine Aktivierung des Btl-Signalweges zur Folge, welcher wiederum die Ausbildung von sekundären Verzweigungen initiiert [106]. Eine übermäßige Aktivierung des Btl-Signals geht mit einem stark verästelten Phänotyp einher. Daher wird die regulierte Entstehung von sekundären Ästen durch die Expression der beiden Gene *pointed* und *sprouty* kontrolliert. Die Expression des Gens *pointed* sorgt für die Einleitung der Verzweigung in den von Trh aktivierten Zellen [58, 107]. *Sprouty* verhindert die Ausbildung von sekundären Ästen in den umliegenden Zellen [59]. Da eine veränderte Expression von *CG14933* die Ausbildung der sekundären Äste beeinflusst, kann man daraus schlussfolgern, dass das Serpin an diesem Signalweg mitwirkt und diesen zusätzlich aktiviert. Wie allerdings sowohl eine erniedrigte als auch erhöhte Expression dieses

Gens, zur Manifestation desselben Phänotyps führen kann, kann zu diesem Zeitpunkt und ohne gezielte Analysen der beteiligten Signalwege nicht beantwortet werden.

Die reduzierte Expression des Serpingens *CG14933* hat zudem einen weiteren Phänotyp in den Atemwegen von L3-Larven zur Folge, in welchen die Länge der sekundären Verzweigungen reduziert ist.

Die Länge der trachealen Verzweigungen wird durch eine Reihe von genetischen Faktoren bestimmt. Dabei wird die Zunahme des Durchmessers und der Länge der trachealen Verzweigungen nur durch die Veränderung der Zellanordnung und Vergrößerung der apikalen Membran der Epithelzellen erreicht [109]. Übermäßig lange Atemwegsäste werden beispielsweise durch fehlerhafte Proteine in den Septumverbindungen zwischen den Epithelzellen [110] ausgelöst, aber auch durch einen *Knockout* des Transmembranproteins Wurst [160, 161] oder des Transkriptionsfaktors Grainy head ausgelöst [113]. Verkürzte Atemwegsäste treten als Phänotyp seltener auf. Mutationen, die zum Verlust der Tyrosinkinase Src42 führen, haben beispielsweise eine reduzierte Länge der Tracheenäste zur Folge [162]. Src42 ist unter anderem an Prozessen der Zellproliferation und Zelladhäsion beteiligt, reguliert allerdings auch die Länge trachealer Äste, indem es die Zunahme der apikalen Oberfläche der Epithelzellen begrenzt. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen verkürzten Atemwegsästen und der Kontrolle der apikalen Oberflächenvergrößerung von Epithelzellen wurde auch für Komponenten des Hippo-Signalwegs gezeigt [163]. Dieser Signalweg kontrolliert die Größe, Proliferation und Apoptose von Zellen und ist an dem Wachstum von Geweben beteiligt. Wird die Genexpression einzelner Komponenten dieses Signalwegs, wie beispielsweise der Kinasen *hippo* oder *warts* reduziert, führt das in den Atemwegen von *Drosophila* zu einer verkleinerten apikalen Oberfläche der Atemwegsepithelzellen, und dadurch wiederum zu einem verkürzten Tracheenast. Um zu beantworten, ob das Serpin *CG14933* an einem der hier genannten Signalwege in den Atemwegen von *Drosophila* beteiligt ist und auf welche Weise es die Länge der trachealen Verzweigungen beeinflusst, bedarf es allerdings weiterer Analysen der zu Grunde liegenden Signalwege.

4.2.2 Einfluss einer veränderten *CG14933*-Expression in den Atemwegen auf die Fitness von *Drosophila melanogaster*

Im Anschluss an die Analyse der Atemwegsmorphologie, wurde der Einfluss einer fehlregulierten Expression des Serpingens *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila* auf die Fitness untersucht. Der erste Teil dieses Kapitels befasst sich zunächst mit den Folgen einer *CG14933*-Manipulation auf die physische Widerstandsfähigkeit der Tiere unter optimierten Lebensbedingungen. Im Anschluss daran wird die Reaktion der Fliegen auf akut auftretenden Sauerstoffmangel diskutiert.

Bei Tieren der unterschiedlichen Linien 1) *CG14933-Knockdown*, 2) *CG14933*-Überexpression in den Atemwegen und 3) endogene *CG14933*-Expression (genetische Kontrolllinie), die ausschließlich unter optimalen Bedingungen gehalten wurden, wurden die Parameter Überlebensrate der Tiere vor Beginn und während der Metamorphose, Entwicklungs- und Lebensdauer betrachtet.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel für das Serpin Spn43Aa diskutiert, handelt es sich auch bei dem zweiten hier charakterisierten Serpin *CG14933* um einen Inhibitor der Proteolyse. Daher ist anzunehmen, dass seine veränderte Expression in einem holometabolen Insekt wie *Drosophila* einen Einfluss auf den Prozess der larvalen Entwicklung und der Metamorphose und somit auf Parameter wie Mortalität und Entwicklungszeit hat. Auch wenn eine gezielte Fehlexpression von *CG14933* keine Auswirkung auf die Überlebensrate von Larven oder Puppen hat, zeigt sich ein Einfluss auf die Entwicklungsdauer. Hier führt eine Überexpression des Serpins *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila*-Larven zu einer verzögerten Entwicklung von Larven und Puppen. Wie bereits im Kapitel 4.1.2 ausführlich erörtert, werden während der Metamorphose im Prozess der Histolyse das larvale Gewebe, bis auf einige Stammzellenbereiche, aufgelöst und anschließend die Organe der adulten Fliege gebildet. Tatsächlich sind auch in den Atemwegen der Fliege Proteasen, wie beispielsweise die Serinprotease *Stubble*, an diesem Prozess beteiligt und sorgen für die Degradierung des larvalen Gewebes [104, 105, 115]. Auch während der Larvenentwicklung findet beim Übergang von Stadium L1 zu L2, und von Stadium L2 zu L3 eine Histolyse in den Atemwegen statt. Zwischen den Stadien wird die formgebende Chitinstruktur, welche das Lumen der Tracheen auskleidet, entfernt und durch einen neu ersetzt. Die alte Kutikula wird dabei durch Chitinasen und Proteasen abgebaut [115, 116]. Als Proteaseinhibitor wirkt das Serpin *CG14933* als negativer Regulator der Proteolyse. Daher wirkt sich seine erhöhte Expression

negativ auf proteolytische Prozesse und in Folge dessen auch auf die erfolgreiche Durchführung dieser Häutungen und die Metamorphose aus und verzögert so die Entwicklung.

Anschließend wurde der Einfluss der modifizierten *CG14933*-Expression auf die Lebensdauer der adulten Fliegen ermittelt. Sowohl bei männlichen als auch weiblichen Imagines führt eine erhöhte Expression von *CG14933* in den Atemwegen zu einer reduzierten durchschnittlichen Lebensdauer der Fliegen. Es ist möglich, dass *CG14933*, ähnlich wie das SERPINB3-Ortholog Spn43Aa an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt ist. Reaktive Sauerstoffspezies beeinträchtigen als freie Radikale eine Vielzahl an biologischen Prozessen in der Zelle. Sie inaktivieren Enzyme, schädigen die DNA und sind an der Regulation der Genexpression beteiligt [125]. Die Schädigung und reduzierte Lebensfähigkeit der Atemwegszellen durch erhöhte ROS-Level kann sich auf die Lebensdauer der Fliege auswirken [126]. Falls eine veränderte *CG14933*-Expression zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen führt, wirkt sich das negativ auf die Überlebensdauer aus. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass *CG14933* direkt mit Signalwegen korreliert, welche mit der Lebensdauer der Fliegen in Verbindung stehen. In *Drosophila* sind Serinproteaseinhibitoren, wie die Serpine Spn43Ac oder Spn1 an der Regulation der Immunantwort beteiligt [70, 71, 73]. Fallen diese negativen Regulatoren aufgrund einer reduzierten Expression aus, kann es zu einer dauerhaften Aktivierung des Immunsystems kommen. In Studien mit *Drosophila* wurde gezeigt, dass eine chronische Aktivierung der Immunantwort mit einer reduzierten Lebensdauer der adulten Fliegen einhergeht [164, 165]. Falls *CG14933* auf ähnliche Weise wie spn43Ac oder Spn1 an der Regulation dieser Signalwege beteiligt ist, kann sich eine modifizierte Expression von *CG14933* ebenfalls negativ auf die Lebensdauer der Imagines auswirken. Eine konkrete Aufschlüsselung der Wechselwirkung zwischen einer veränderten *CG14933*-Expression und der verminderten Lebensdauer bedarf allerdings gezielter Analysen der zellulären Prozesse und beteiligten Signalkaskaden.

Zusammengefasst geht eine Fehlregulation des Serpingens *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila* mit einer Entwicklungsverzögerung und einer reduzierten Lebensdauer einher und trägt somit zu einer verminderten Fitness dieser Tiere bei.

Im ersten Schritt wurden die Effekte unter optimalen Lebensbedingungen betrachtet, im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich eine fehlerhafte Expression von *CG14933* und die

damit einhergehenden Veränderungen in der Atemwegsmorphologie auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Stressfaktor Sauerstoffmangel auswirken.

Larven der drei Linien 1) *CG14933-Knockdown* und 2) *CG14933*-Überexpression in den Atemwegen, sowie 3) endogene *CG14933*-Expression (genetische Kontrolllinie) wurden während des dritten Entwicklungsstadiums einer akuten Hypoxie ausgesetzt. Zunächst wurde die Genexpression von *CG14933* in isolierten larvalen Tracheen direkt im Anschluss an die Exposition gemessen. Hier führt der Sauerstoffmangel in allen drei untersuchten Populationen zu einem Anstieg des Expressionslevels. Bereits von Allee (2011) wurde publiziert, dass in *Drosophila* die Expression von *CG14933* unter hypoxischen Bedingungen ansteigt [166]. Für das Serpin *CG14933* ist jedoch nicht bekannt, ob es an hypoxierelevanten Signalwegen wie HIF-1 beteiligt ist, ob es an der Bildung oder gar am Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) involviert ist oder welche Funktion es unter Hypoxie erfüllt.

Für die Widerstandsfähigkeit der Larven gegenüber hypoxischen Bedingungen wurde die Reaktion der Larven während der Exposition untersucht. Unter hypoxischen Bedingungen reagieren *Drosophila*-Larven mit einem instinktiven Vermeidungsverhalten, um den unangenehmen oder schädlichen Situationen zu entkommen. Sie verlassen das Medium und bewegen sich an der Wand des Kulturröhrchens empor. Dabei verstärkt sich das Fluchtverhalten, sowohl die Distanz als auch die Geschwindigkeit, mit zunehmender Hypoxie [94, 95, 130]. Die Larven der drei hier untersuchten Linien verlassen während der Hypoxieexposition das Medium, sodass sich mehr Tiere an der Wand des Kulturröhrchens befinden verglichen mit den Normoxiegruppen [94, 95, 130]. Dabei kann kein Unterschied im Verhalten der Tiere der *CG14933-Knockdown*- und der Kontrolllinie festgestellt werden. Tiere mit einer erhöhten Expression von *CG14933* in den Atemwegen hingegen zeigen eine deutlich stärkere Reaktion auf die Hypoxie. Verglichen mit der *CG14933-Knockdown*- und der Kontrolllinie verlassen mehr Tiere das Medium und bewegen sich vertikal an der Gefäßwand empor. Wie bereits im Kapitel 4.1.2 für das SERPINB3-Ortholog *spn43Aa* diskutiert, spielt auch hier die vergrößerte Fläche der Atemwege in Folge der zusätzlichen Verzweigungen in der *CG14933*-überexprimierenden *Drosophila*-Linie eine Rolle und führt zu der verstärkten Fluchtbewegung der Larven. In *Drosophila* nehmen die Atemwege den Sauerstoffmangel als erstes Organ wahr. Durch ihre Nähe zum zentralen Nervensystem der Fliege dienen sie als sensorisches Organ und leiten das Signal an dieses weiter [131, 132]. Eine vergrößerte Oberfläche durch zusätzliche Atemwegsverzweigungen, führt zu einer wirksameren

Wahrnehmung der Hypoxie, wodurch ein gesteigertes Vermeidungsverhalten der Tiere ausgelöst wird [95]. Anders als Larven, die eine verstärkte *CG14933*-Expression in ihren Atemwegen aufweisen, wurden infolge einer reduzierten Expression nur bei einigen Individuen zusätzliche sekundäre Verzweigungen detektiert. Außerdem sind die sekundären Äste bei Larven dieser Linie signifikant verkürzt. Obwohl zusätzliche Äste vorhanden sind, wird durch die Verkürzung dieser die Oberfläche des respiratorischen Epithels wiederum verkleinert. Diese, in Relation zu *CG14933*-überexprimierenden Larven kleinere Fläche bietet weniger Angriffsfläche für den hypoxischen Reiz. Dadurch wird das durch Hypoxie aktivierte Signal weniger stark induziert und das vertikale Fluchtverhalten ist schwächer.

Wie bereits unter optimalen Bedingungen ohne Einfluss von Stressoren beobachtet, ist nach akuter Hypoxie weder eine verminderte noch eine verstärkte Mortalität bei keiner der drei *Drosophila*-Linien festzustellen. Auch auf die Lebensdauer der Tiere mit einer manipulierten *CG14933*-Expression hat Hypoxie keinen Einfluss.

Betrachtet man allerdings die Entwicklungszeit der Larven, führt akute Hypoxie sowohl bei den Kontrolltieren mit einer natürlichen *CG14933*-Expression, als auch mit einer Überexpression von *CG14933* in den Atemwegen zu einer verzögerten larvalen Entwicklung und einem späteren Eintreten der Verpuppung. Somit zeigen Larven dieser beiden Linien eine Reaktion, die typisch für hypoxische Bedingungen ist [122, 135]. Bei *Drosophila* wird das Larvenwachstum, sowie die Einleitung der Metamorphose durch die Freisetzung des Hormons Ecdyson gesteuert. Die Produktion des Hormons Ecdyson ist unter anderem durch den Insulin-Signalweg reguliert [136]. Durch den Sauerstoffmangel wird das Insulin-Signal und dadurch ebenso die Freisetzung des Hormons Ecdyson reduziert [137]. Der Ecdyson-Peak, der benötigt wird, um die Verpuppung letztendlich einzuleiten, tritt zeitlich verzögert auf. Dadurch wird das dritte Larvenstadium verlängert und die Larven gehen später in die Metamorphose über, was auch in der hier diskutierten Arbeit beobachtet wurde.

In dieser Arbeit ist es gelungen zu beweisen, dass sich eine induzierte Erhöhung der Expression des Serpins *CG14933* bereits unter optimalen Bedingungen negativ auf die Fitness von *Drosophila* auswirkt. Werden Fliegen mit Stressoren wie Hypoxie konfrontiert, weisen Tiere mit einer fehlregulierten *CG14933*-Expression eine verminderte Widerstandsfähigkeit auf und die Fitness wird zusätzlich reduziert.

Vergleicht man die hier vorliegenden Ergebnisse nach einer modifizierten Expression des Serpingens *CG14933*, mit den zuvor diskutierten Veränderungen und Beeinträchtigungen von

Drosophila durch eine veränderte Expression des SERPINB3-Orthologs *spn43Aa* (siehe Kapitel 4.1.2), lassen sich ähnliche Auswirkungen durch die Dysregulation der beiden Serpine auf die Atemwegsstruktur sowie die dargestellten Fitnessparameter feststellen. Beide Serpine sind an der Bildung der Atemwegsstruktur beteiligt. Zusätzlich führt die veränderte Expression beider Serpine zu einer Entwicklungsverzögerung der Larven, einer verkürzten Lebenszeit der Imagines sowie einer sensitiveren Reaktion auf Umweltfaktoren. Jedoch zeigen Tiere mit einer modifizierten *CG14933*-Expression ein reduzierteres Ausmaß der Beeinträchtigung verglichen mit Tieren, in denen *spn43Aa* in den Atemwegen fehlerhaft exprimiert wird. Die Tiere können den Verlust oder die Hyperaktivität von *CG14933* im Gegensatz zu *Spn43Aa* offenbar besser kompensieren. Somit scheint die Funktion des Serpins *CG14933* weniger essentiell zu sein. Falls beide Serpine an denselben Signalwegen während der Tracheenentwicklung beteiligt sind, sowie auf ähnliche Weise die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die Aktivierung der Immunantwort oder des Hypoxiesignalwegs regulieren, ist es möglich, dass die fehlerhafte Expression von *CG14933* durch das funktionsfähige Serpin *Spn43Aa* kompensiert wird. Im Umkehrschluss ist das Serpin *CG14933* zu ineffizient um den Defekten durch eine fehlregulierte Expression *spn43Aa*-Gen entgegen zu wirken.

Das Ziel dieses Teilabschnittes der hier vorliegenden Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob *SPINK5* als potentielles Suszeptibilitätsgen an der Entwicklung von *Asthma bronchiale* beteiligt ist. Mutationen im *SPINK5*-Gen werden mit der Entwicklung von Asthma in Verbindung gebracht [17]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei chronischer Rhinosinusitis die Expression von *SPINK5* stark reduziert ist [38, 167, 168]. Auch bei chronischer Rhinosinusitis ist die Barriereintegrität des Epithels gestört und es kommt zu chronischen Entzündungsprozessen. Wie das Serpin jedoch zur Entwicklung dieser gestörten Funktion des Epithels beiträgt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Für diese Fragestellung wurde die Expression des *SPINK5*-Orthologs *CG14933* im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* gezielt manipuliert. Zum einen wurde der Einfluss einer fehlregulierten Expression in den Atemwegen auf die Atemwegsmorphologie und zum anderen auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber asthmarelevanten Stressoren untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Serpin *CG14933* in *Drosophila* maßgeblich an der Ausbildung der Tracheen beteiligt ist und durch seine Fehlexpression die tracheale Struktur verändert. Wie bereits im Kapitel 1.1.1 erörtert, ist auch bei Asthmapatienten die Morphologie der Lunge verändert, die

Barriereintegrität des Epithels ist gestört und die Funktion dadurch beeinträchtigt. Zusätzlich sind Reparaturmechanismen eingeschränkt und durch den ständigen Kontakt mit Reizstoffen kommt es zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion [4, 157]. Da gezeigt werden konnte, dass eine veränderte Expression von *CG14933* in der Fliege die Struktur der Atemwege verändert, ist es möglich, dass auch eine gestörte Expression von *SPINK5* in der Lunge, ähnlich wie *CG14933* in der Fruchtfliege, zu strukturellen Veränderungen führt, welche zu einer erhöhten Anfälligkeit für Asthma beitragen.

Die Erkrankung *Asthma bronchiale* ist nicht nur durch eine veränderte Struktur der Atemwege charakterisiert, sondern auch durch die damit verbundene Hyperreagibilität auf äußere Reize. Ausgelöst durch eine Konfrontation mit Allergenen und Reizstoffen, physische Anstrengung oder kalte Luft kommt es zu anfallsartiger Atemnot. Es entsteht eine chronische Entzündungsreaktion, Mukus wird vermehrt sekretiert, und die Bronchialmuskulatur verkrampft sich [2]. Dadurch wird das Atmen zusätzlich erschwert und das Leben der Betroffenen beeinträchtigt. Daher wurden die Folgen einer gezielt in den Atemwegen veränderten Expression des zu *SPINK5* orthologen Serpingens *CG14933* in dieser Arbeit anhand von Parametern, die mit der Toleranz von *Drosophila* gegenüber und die Reaktion auf den Stressfaktor Sauerstoffmangel in Verbindung stehen, analysiert. Eine erhöhte Expression von *CG14933* in den Atemwegen von *Drosophila* und die damit verbundene veränderte Atemwegsstruktur beeinträchtigt die Entwicklung der Larve, das Überleben der adulten Fliegen, sowie die Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine veränderte Expression des *SPINK5*-Gens bei Asthmapatienten durch eine Beeinträchtigung der Atemwegsentwicklung diese anfälliger gegen Reizstoffe macht und damit die Entwicklung der Erkrankung begünstigt. Damit stellt *SPINK5*, ebenso wie *SERPINB3*, ein potentiell Risikogen für die Entwicklung von Asthma dar.

5 Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Lungenerkrankung, bei der die Atemwege hypersensitiv auf äußere Reize reagieren. Zu den Risikofaktoren für Asthma gehören neben der Belastung durch Umweltfaktoren, wie Allergene, Tabakrauch und Infektionen, auch genetische Aspekte. Epidemiologische Studien mit Asthmapatienten haben eine Vielzahl dieser potenziellen Suszeptibilitätsgene identifiziert, zu welchen auch die Gene der Serinproteaseinhibitoren (Serpine) SPINK5 und SERPINB3 gehören. Träger von Punktmutationen in der Gensequenz von SPINK5 besitzen nachweislich ein erhöhtes Risiko an Asthma zu erkranken. Außerdem wurde bei an Asthma erkrankten Patienten eine erhöhte Expression von SERPINB3 sowohl in Biopsien bronchialer Epithelzellen als auch systemisch im Serum nachgewiesen. Auf welche Weise eine veränderte Genexpression dieser Serpine die Pathogenese von *Asthma bronchiale* begünstigt, ist bisher noch gänzlich unerforscht. Die hier vorliegende Arbeit, in der die grundlegenden Aspekte der SPINK5- und SERPINB3-Funktion im respiratorischen Epithel charakterisiert wurden, ist ein elementarer Beitrag zur Klärung dieser Fragestellung. Für eine gezielte Betrachtung und Charakterisierung von Genen in einem spezifischen Gewebe bedarf es eines einfachen Modellorganismus und die Taufliege *Drosophila melanogaster* erfüllt bestens die obligatorischen Voraussetzungen. Nicht nur verfügt die Taufliege über ein Atemwegssystem, das in Funktion und Morphologie dem humanen äquivalent ist, sondern auch über die orthologen Gene zu SERPINB3 und SPINK5: *spn43Aa* bzw. *CG14933*, die anhand homologer Aminosäuresequenzen, des Vorhandenseins einer inhibitorischen Domäne und der Transkription in Epithelzellen der Atemwege ausgewählt wurden. Die Fehlregulation der Serpingene, wie sie bei Asthmatikern auftritt, wurde durch eine gezielte Manipulation der *spn43Aa*- bzw. *CG14933*-Genexpression (RNAi-Knockdown bzw. ORF-Überexpression) selektiv im Atemwegsepithel der Taufliege nachgestellt.

Für beide Gene, sowohl *spn43Aa* als auch *CG14933*, konnte eine maßgebliche Beteiligung an der embryonalen Entwicklung der Atemwege nachgewiesen werden. Eine fehlerhafte Expression der Serpine führt sowohl zu einer erhöhten Anzahl als auch einer Verlängerung der sekundären Atemwegsverzweigungen. Dies geht mit einer Oberflächenvergrößerung des respiratorischen Epithels einher, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass ein Defizit in der Serpinexpression die Funktion der Atemwege erheblich beeinträchtigt. Da die Morphologie der Lunge bei Asthmapatienten ebenfalls verändert ist, ist es daher möglich, dass ein

verändertes Expressionslevel von SERPINB3 oder SPINK5 in der humanen Lunge ähnliche strukturelle Veränderungen bewirkt, wie *spn43Aa* und *CG14933* in der Taufliege, und dadurch zu der Entwicklung der Erkrankung *Asthma bronchiale* beiträgt.

Darüber hinaus beeinträchtigt eine fehlregulierte Expression von *spn43Aa* und *CG14933* in den Atemwegen die Entwicklung und das Überleben der Fliege drastisch. Nicht nur benötigen die Tiere für ihre Entwicklung signifikant mehr Zeit, zusätzlich ist die Überlebensrate der Larven sowie die Lebensdauer der Imagines stark reduziert. Unter Einbezug Asthma-relevanter Faktoren, wie die Inhalation von Tabakrauch und akute Hypoxie, führt die Fehlregulation der Serpine *spn43Aa* oder *CG14933* und die damit einhergehende veränderte Atemwegsmorphologie außerdem zu einem verstärkten Vermeidungsverhalten und daher gesteigerter Sensitivität der Larven während der Exposition. Nach der Behandlung mit Tabakrauch oder Hypoxie äußert sich die sensitive Reaktion der Tiere in einer Entwicklungsverzögerung und verkürzten Lebenszeit. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die bei Asthmapatienten beobachtete veränderte Expression der Serpine SERPINB3 und SPINK5 nicht nur negativ bei der Entwicklung der humanen Atemwege auswirkt, sondern diese dadurch anfälliger für äußere Reize macht. Damit bestätigen die in *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse, dass die beiden Serpingene SERPINB3 und SPINK5 durchaus als Suszeptibilitätsgene fungieren und die Entstehung von *Asthma bronchiale* begünstigen.

6 Summary

Bronchial asthma is a chronic inflammatory lung disease where the airways react hypersensitively to external stimuli. The risk factors for asthma include not only exposure to environmental factors such as allergens, tobacco smoke and infections, but also genetic aspects. Epidemiological studies in patients with asthma have identified a large number of susceptibility genes, including the genes of the serine protease inhibitors (serpins) SPINK5 and SERPINB3. Carriers of single nucleotide polymorphisms in SPINK5 gene have been shown to be at higher risk of developing asthma. In addition, elevated expression of SERPINB3 has been detected in both bronchial epithelial cell biopsies and serum of asthma patients. However, how altered serpin gene expression facilitates the pathogenesis of bronchial asthma has not yet been investigated. The present work which dissects the basic function of SPINK5 and SERPINB3 in the respiratory epithelium, is an essential contribution to the clarification of this question. For a targeted examination and characterization of genes in a specific tissue, a simple model organism is required, and the fruit fly *Drosophila melanogaster* fulfills the obligatory requirements. The respiratory system of *Drosophila melanogaster* is equivalent in function and morphology to the human lung, as well as it has genes orthologous to human SERPINB3 and SPINK5: *spn43Aa* and *CG14933*, respectively. These genes were selected on the basis of aminoacid sequences similarity, the presence of an inhibitory domain and the transcription level in respiratory epithelial cells. The misregulation of the serpin genes, as it occurs in asthmatic patients, was selectively simulated in the respiratory epithelium of the fruit fly by targeted manipulation of the *spn43Aa* and *CG14933* gene expression (RNAi knockdown and ORF overexpression).

For both genes, *spn43Aa* and *CG14933*, a significant involvement in the embryonic development of the respiratory tract could be demonstrated. Misexpression of serpin genes lead to an increase in number and length of the secondary airway branches. This is accompanied by an increase in the surface area of the respiratory epithelium, which suggests that a deficit in serpin expression significantly impairs respiratory function. Since the morphology of the lung in asthma patients is also altered, it is therefore possible that an altered expression level of SERPINB3 or SPINK5 in the human lung causes structural changes similar to those of *spn43Aa* and *CG14933* in the fruit fly, thereby contributing to the development of bronchial asthma.

In addition, the misregulated expression of *spn43Aa* and *CG14933* in the fly airways severely affected their development and survival. The results showed that the flies required significantly more time for their development. Moreover, the larval survival rate as well as the lifespan of adult flies was significantly reduced. Taking asthma-relevant factors such as tobacco smoke inhalation and acute hypoxia into account, the misregulation of *spn43Aa* or *CG14933* and the associated alteration in airway morphology lead to an increased larval avoidance behaviour and consequently increased sensitivity during exposure. After treatment with tobacco smoke or induction of hypoxia, the sensitive response of these animals resulted in delayed development and shortened lifespan. It is therefore likely that the altered expression of SERPINB3 and SPINK5 observed in asthma patients not only has a negative effect on the development of the human lung, but also makes it more susceptible to external stimuli. The findings obtained in *Drosophila* thus confirm that both serpin genes SERPINB3 and SPINK5 function as susceptibility genes and promote the development of bronchial asthma.

7 Literatur

1. Akmatov MK, Holstiege J, Steffen A, Bätzing J (2018) Diagnoseprävalenz und -inzidenz von Asthma bronchiale – Ergebnisse einer Studie mit Versorgungsdaten aller gesetzlich Versicherten in Deutschland (2009 – 2016). <https://doi.org/10.20364/VA-18.08>
2. McCracken JL, Veeranki SP, Ameredes BT, Calhoun WJ (2017) Diagnosis and management of asthma in adults a review. *JAMA - J Am Med Assoc* 318:279–290. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.8372>
3. Holgate ST (2007) Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120:1233–1244. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.10.025>
4. Hackett TL, Knight DA (2007) The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:63–68. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328013d61b>
5. Georas SN, Rezaee F (2014) Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 134:509–520. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.049>
6. James AL, Wenzel S (2007) Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J* 30:134–155. <https://doi.org/10.1183/09031936.00146905>
7. Kuschner WG (2007) The asthma epidemic [12]. *N Engl J Med* 356:1073. <https://doi.org/10.1056/NEJMc063596>
8. Holgate ST (2004) The epidemic of asthma and allergy. *J R Soc Med* 97:103–110. <https://doi.org/10.1258/jrsm.97.3.103>
9. DeVries A, Wlasiuk G, Miller SJ, et al (2017) Epigenome-wide analysis links SMAD3 methylation at birth to asthma in children of asthmatic mothers. *J Allergy Clin Immunol* 140:534–542. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.041>
10. Anthoni M, Wang G, Leino MS, et al (2007) Smad3 -signalling and Th2 cytokines in normal mouse airways and in a mouse model of asthma. *Int J Biol Sci* 3:477–485. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3.477>
11. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al (2002) Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418:426–430. <https://doi.org/10.1038/nature00878>
12. Blumenthal MN (2005) The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5:141–145. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000162306.12728.c2>
13. Cookson W, Moffatt Miriam (2004) Making sense of asthma Genes. *N Engl J Med* 351:1794–1796. <https://doi.org/10.1056/NEJMe048232>

14. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al (2007) Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448:470–473. <https://doi.org/10.1038/nature06014>
15. Miller M, Rosenthal P, Beppu A, et al (2014) ORMDL3 Transgenic Mice Have Increased Airway Remodeling and Airway Responsiveness Characteristic of Asthma. *J Immunol* 192:3475–3487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303047>
16. Galanter JM, Choudhry S, Eng C, et al (2008) ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1194–1200. <https://doi.org/10.1164/rccm.200711-1644OC>
17. Kabesch M, Carr D, Weiland SK, Von Mutius E (2004) Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 34:340–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01860.x>
18. Yuyama N, Davies DE, Akaiwa M, et al (2002) Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19:287–296. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1972>
19. Nishi N, Miyazaki M, Tsuji K, Tomohiro Hitomi, Eriko Muro, Masafumi Zaitzu, Syuichi Yamamoto, Shigeyasu nada, Ikuko Kobayashi, Tomohiro Ichimaru, Kenji Izuhara, Fumio Nagumo, Noriko Yuyama YH (2005) Squamous cell carcinoma-related antigen in children with acute asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 94:391–397
20. Geppetti P, Dabbagh K, Knott P, et al (2014) Protease-Activated Receptor 2 Mediates Eosinophil Infiltration and Hyperreactivity in Allergic Inflammation of the Airway. *J Immunol* 169:5315–5321. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.5315>
21. Davies PL, Spiller OB, Beeton ML, et al (2010) Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity. *Thorax* 65:246–251. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.116061>
22. Heutinck KM, ten Berge IJM, Hack CE, et al (2010) Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol* 47:1943–1955. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.020>
23. Reed CE, Kita H (2004) The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 114:997–1008. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.060>
24. Karaaslan C, Birben E, Keskin O, et al (2012) The role of SCCA1 in asthma related physiological events in the airway epithelium and the effect of promoter variants on asthma and gene function. *Respir Med* 107:368–379. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.11.003>
25. Mitsuishi K, Nakamura T, Sakata Y, et al (2005) The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 35:1327–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02353.x>

26. Kato H, Miyauchi F, Morioka H, et al (1979) Tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. Correlation of circulating levels with disease progress. *Cancer* 43:585–590. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197902\)43:2<585::AID-CNCR2820430227>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197902)43:2<585::AID-CNCR2820430227>3.0.CO;2-0)
27. Crombach G, Scharl A, Vierbuchen M, et al (1989) Detection of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous epithelia and in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 63:1337–1342. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19890401\)63:7<1337::AID-CNCR2820630719>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19890401)63:7<1337::AID-CNCR2820630719>3.0.CO;2-J)
28. Kato Hiroshi (1996) Expression and Function of squamous cell carcinoma related antigen. *Anticancer Res* 16:2149–2154
29. Sun Y, Sheshadri N, Zong WX (2017) SERPINB3 and B4: From biochemistry to biology. *Semin Cell Dev Biol* 62:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.09.005>
30. Schick C, Brömme D, Bartuski AJ, et al (1998) The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13465–13470. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13465>
31. Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, et al (2000) Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *J Histochem Cytochem* 48:113–122. <https://doi.org/10.1177/002215540004800112>
32. Katagiri C, Iida T, Nakanishi J, et al (2010) Up-regulation of serpin SCCA1 is associated with epidermal barrier disruption. *J Dermatol Sci* 57:95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.09.004>
33. Daines MO, Bass SA, Stringer KF, et al (2010) A nonredundant role for mouse Serpinb3a in the induction of mucus production in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 127:254–261.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.009>
34. Hovnanian A, Chavanas S, Bodemer C, et al (2000) Mutations in *SPINK5*, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 25:141–142. <https://doi.org/10.1038/75977>
35. Birben E, Sackesen C, Turgutoğlu N, Kalayci Ö (2012) The role of SPINK5 in asthma related physiological events in the airway epithelium. *Respir Med* 106:349–355. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.11.007>
36. Clayman KMJHJFKWKE-NL (2003) Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A cathepsin G and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry* 42:3874–3881
37. Schechter NM, Brass LF, Lavker RM, Jensen PJ (1998) Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 176:365–373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199808\)176:2<365::AID-JCP15>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199808)176:2<365::AID-JCP15>3.0.CO;2-2)

38. Kouzaki H, Matsumoto K, Kikuoka H, et al (2017) Endogenous protease inhibitors in airway epithelial cells contribute to eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 195:737–747. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0529OC>
39. Reiter LT, Potocki L, Chien S, et al (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
40. Pandey UB, Nichols CD (2011) Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev* pr.110.003293. <https://doi.org/10.1124/PR.110.003293>
41. Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, Bucova M (2009) Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:331–344. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0039-4>
42. Buchon N, Silverman N, Cherry S (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 14:796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
43. Wagner C, Isermann K, Fehrenbach H, Roeder T (2008) Molecular architecture of the fruit fly's airway epithelial immune system. *BMC Genomics* 9:1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-446>
44. Affolter M, Itoh N, Shilo B, et al (2003) Tube or Not Tube : Remodeling Epithelial Tissues by Branching Morphogenesis Branching morphogenesis involves the restructuring. *Dev Cell* 4:11–18
45. Weigmann Katrin , Klapper Robert , Strasser Thomas, Rickert Christof , Technau Gerd , Jäckle Herbert JW and KC (2003) FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. In: *Trends Genet*. <http://flymove.uni-muenster.de>. Accessed 16 Oct 2019
46. Harrison JF, Waters JS, Biddulph TA, et al (2018) Developmental plasticity and stability in the tracheal networks supplying *Drosophila* flight muscle in response to rearing oxygen level. *J Insect Physiol* 106:189–198. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.006>
47. Harrison JF, Waters JS, Cease AJ, et al (2013) How locusts breathe. *Physiology* 28:18–27. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2012>
48. Samakovlis C, Hacohen N, Manning G, et al (1996) Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 122:1395–407. <https://doi.org/8223268>
49. Guillemin K, Groppe J, Dücker K, et al (1996) The pruned gene encodes the *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* 122:1353–1362. <https://doi.org/10.5167/uzh-664>
50. Manning G, Krasnow MA (1993) *The Development of Drosophila melanogaster*, 2009th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press

51. Wilk R, Weizman I, Shilo BZ (1996) *trachealess* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* 10:93–102. <https://doi.org/10.1101/gad.10.1.93>
52. Brodu V, Casanova J (2006) The RhoGAP *crossveinless-c* links *trachealess* and EGFR signaling to cell shape remodeling in *Drosophila* tracheal invagination. *Genes Dev* 20:1817–1828. <https://doi.org/10.1101/gad.375706>
53. Llimargas M, Casanova J (1999) EGF signalling regulates cell invagination as well as cell migration during formation of tracheal system in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 209:174–179. <https://doi.org/10.1007/s004270050241>
54. Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA (1996) *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87:1091–1101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81803-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81803-6)
55. Lee T, Hacohen N, Krasnow M, Montell DJ (1996) Regulated *breathless* receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev* 10:2912–2921. <https://doi.org/10.1101/gad.10.22.2912>
56. Ohshiro T, Saigo K (1997) Transcriptional regulation of *breathless* FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development* 124:3975–3986
57. Ghabrial AS, Krasnow MA (2006) Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis. *Nature* 441:746–749. <https://doi.org/10.1038/nature04829>
58. Klambt C (1993) The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* 117:163–176
59. Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, et al (1998) *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92:253–263. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80919-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80919-8)
60. Ghabrial A, Luschnig S, Metzstein MM, Krasnow MA (2003) Branching Morphogenesis of the *Drosophila* Tracheal System. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:623–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.031403.160043>
61. Lee S, Kolodziej PA (2002) The plakin *short stop* and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion. *Development* 129:1509–1520
62. Tanaka-Matakatsu M, Uemura T, Oda H, et al (1996) Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor *escargot*. *Development* 122:3697–3705
63. Samakovlis C, Manning G, Steneberg P, et al (1996) Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development* 122:3531–3536

64. Llimargas M (1999) The Notch pathway helps to pattern the tips of the *Drosophila* tracheal branches by selecting cell fates. *Development* 126:2355–64
65. Centanin L, Dekanty A, Romero N, et al (2008) Cell Autonomy of HIF Effects in *Drosophila*: Tracheal Cells Sense Hypoxia and Induce Terminal Branch Sprouting. *Dev Cell* 14:547–558. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.020>
66. Jarecki J, Johnson E, Krasnow MA (1999) Oxygen Regulation of Airway Branching in *Drosophila* Is Mediated by Branchless FGF. *Cell* 99:211–220
67. Coleman S, DrÄhn B, Petersen G, et al (1995) A *Drosophila* male accessory gland protein that is a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors is transferred to females during mating. *Insect Biochem Mol Biol* 25:203–207. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00055-M](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00055-M)
68. Ravi Ram K, Ji S, Wolfner MF (2005) Fates and targets of male accessory gland proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 35:1059–1071. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.05.001>
69. Reichhart JM (2005) Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. *Trends Cell Biol* 15:659–665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.10.001>
70. Levashina EA, Langley E, Green C, et al (1999) Constitutive Activation of Toll-Mediated Antifungal Defense in Serpin-Deficient *Drosophila*. *Science* (80-) 285:1998–2000
71. Green C, Levashina E, McKimmie C, et al (2000) The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2. *Genetics* 156:1117–1127
72. Lindsay SA, Wasserman SA (2014) Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Dev Comp Immunol* 42:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.011>
73. Gubb D, Garcia-Sanchez S, Lee SY, et al (2011) Spn1 Regulates the GGBP3-Dependent Toll Signaling Pathway in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 31:2960–2972. <https://doi.org/10.1128/mcb.01397-10>
74. Leclerc V, Reichhart J-M (2004) The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 198:59–71
75. Scherfer C, Tang H, Kambris Z, et al (2008) *Drosophila* Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation. *Dev Biol* 323:189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.030>
76. Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C (2008) A Serpin that Regulates Immune Melanization in the Respiratory System of *Drosophila*. *Dev Cell* 15:617–626. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.017>
77. Gregorio E De, Han SJ, Lee WJ, et al (2002) immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade. *Dros Dev Cell* 3:581–592
78. Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, et al (2002) A serpin mutant links Toll activation to

- melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO J* 21:6330–6337. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf661>
79. Ligoxygakis P, Roth S, Reichhart JM (2003) A Serpin Regulates Dorsal-Ventral Axis Formation in the *Drosophila* Embryo. *Curr Biol* 13:2097–2102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.062>
 80. Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
 81. Del Valle Rodríguez A, Didiano D, Desplan C (2012) Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat Methods* 9:47–55. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1800>
 82. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415
 83. Liu L, Johnson WA, Welsh MJ (2003) *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2128–2133. <https://doi.org/10.1073/pnas.252785099>
 84. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene. *Nature* 391:806.
 85. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase from Phage ϕ C31. *Genetics* 166:1775–1782. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.4.1775>
 86. Hediger M, Maeda RK, Basler K, et al (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases. *Proc Natl Acad Sci* 104:3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
 87. Ni JQ, Zhou R, Czech B, et al (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Methods* 8:405–407. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1592>
 88. in vivo RNAi fly stocks and vectors. <https://fgr.hms.harvard.edu/fly-in-vivo-rnai>. Accessed 11 Sep 2019
 89. Perrimon N, Ni JQ, Perkins L (2010) In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003640>
 90. (2013) The Zurich ORFeome Project. <http://www.flyorf.ch/index.php>. Accessed 11 Sep 2019
 91. Bischof J, Bjorklund M, Furger E, et al (2013) A versatile platform for creating a comprehensive UAS-ORFeome library in *Drosophila*. *Development* 140:2434–2442. <https://doi.org/10.1242/dev.088757>
 92. Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD (2013) Measurement of Lifespan in *Drosophila*

- melanogaster. *J Vis Exp* 1–9. <https://doi.org/10.3791/50068>
93. (2019) <https://www.scireq.com/inexpose/>. <https://www.scireq.com/inexpose/>. Accessed 2 Sep 2019
 94. Wingrove JA, O’Farrell PH (1999) Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* 98:105–114. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80610-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80610-8)
 95. Vermehren-Schmaedick A, Ainsley JA, Johnson WA, et al (2010) Behavioral responses to hypoxia in *drosophila* larvae are mediated by atypical soluble guanylyl cyclases. *Genetics* 186:183–196. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.118166>
 96. Rosen KL, Olcott MH, Henkels MD, et al (2010) Lethality and Developmental Delay in *Drosophila melanogaster* Larvae after Ingestion of Selected *Pseudomonas fluorescens* Strains. *PLoS One* 5:e12504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012504>
 97. Jones TA, Metzstein MM (2013) Examination of *Drosophila* Larval Tracheal Terminal Cells by Light Microscopy. *J Vis Exp* 1–6. <https://doi.org/10.3791/50496>
 98. Hansel NN, Diette GB (2007) Gene Expression Profiling in Human Asthma. *Proc Am Thorac Soc* 4:32–36. <https://doi.org/10.1513/pats.200606-132jg>
 99. Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 10:1845–1864. <https://doi.org/10.1101/gr.1478R>
 100. Garrett M, Fullaondo A, Troxler L, et al (2009) Identification and analysis of serpin-family genes by homology and synteny across the 12 sequenced *Drosophilid* genomes. *BMC Genomics* 10:489. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-489>
 101. Sarov M, Barz C, Jambor H, et al (2016) A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *Elife* 5:1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.12068>
 102. Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD (2011) Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform* 12:449–462. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>
 103. Fisher, B., Weiszmann, R., Frise, E., Hammonds, A., Tomancak, P., Beaton, A., Berman, B., Quan, E., Shu, S., Lewis, S., Rubin, G., Barale, C., Laguertas, E., Quinn, J., Ghosh, A., Hartenstein, V., Ashburner, M., Celniker S (2012) Berkeley *Drosophila* Genome Project. <https://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>. Accessed 12 Sep 2019
 104. Chen GC, Gajowniczek P, Settleman J (2004) Rho-LIM kinase signaling regulates ecdysone-induced gene expression and morphogenesis during *Drosophila* metamorphosis. *Curr Biol* 14:309–313. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(04\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(04)00065-X)
 105. Appel LF, Prout M, Abu-Shumays R, et al (1993) The *Drosophila* Stubble-stubblويد gene encodes an apparent transmembrane serine protease required for epithelial morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4937–4941.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.4937>
106. Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA (1996) branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87:1091–1101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81803-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81803-6)
 107. Samakovlis C, Hacohen N, Manning G, et al (1996) Development of the Drosophila tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* 122:1395–1407
 108. Chung SY, Chavez C, Andrew DJ (2011) Trachealess (Trh) regulates all tracheal genes during Drosophila embryogenesis. *Dev Biol* 360:160–172. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.014>
 109. Beitel GJ, Krasnow MA (2000) Genetic control of epithelial tube size in the Drosophila tracheal system. *Development* 127:3271–3282
 110. Wu VM, Beitel GJ (2004) A junctional problem of apical proportions: Epithelial tube-size control by septate junctions in the Drosophila tracheal system. *Curr Opin Cell Biol* 16:493–499. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.008>
 111. Luschnig S, Bätz T, Armbruster K, Krasnow MA (2006) serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in Drosophila. *Curr Biol* 16:186–194. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.072>
 112. Wang S, Jayaram SA, Hemphälä J, et al (2006) Septate-junction-dependent luminal deposition of chitin deacetylases restricts tube elongation in the Drosophila trachea. *Curr Biol* 16:180–185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.074>
 113. Hemphälä J, Uv A, Cantera R, et al (2003) Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signalling. *Development* 130:249–258. <https://doi.org/10.1242/dev.00218>
 114. Barker JSF (2009) Defining Fitness in Natural and Domesticated Populations. *Adapt Fit Anim Popul* 3–14
 115. Locke M (1966) The structure and formation of the cuticulin layer in the epicuticle of an insect, *Calpodes ethlius* (Lepidoptera, HesperIIDae). *J Morphol* 118:461–494. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051180403>
 116. Wigglesworth VB (1973) The Role of the Epidermal Cells in Moulding the Surface Pattern of the Cuticle in *Rhodnius* (Hemiptera). *J Cell Sci* 12:683–703
 117. Seong KM, Coates BS, Sun W, et al (2017) Changes in Neuronal Signaling and Cell Stress Response Pathways are Associated with a Multigenic Response of *Drosophila melanogaster* to DDT Selection. *Genome Biol Evol* 9:3356–3372. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx252>
 118. Nam HJ, Jang IH, You H, et al (2012) Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Haya protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *EMBO J* 31:1253–1265. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.476>

119. Neretti N, Wang PY, Brodsky AS, et al (2009) Long-lived Indy induces reduced mitochondrial reactive oxygen species production and oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2277–2282. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812484106>
120. Arking R, Burde V, Graves K, et al (2000) Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Exp Gerontol* 35:167–185. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(99\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00094-7)
121. Tang S, Le PK, Tse S, et al (2009) Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 4:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004492>
122. Peck LS, Maddrell SHP (2005) Limitation of Size by Hypoxia in the Fruit Fly.pdf. *J Exp Zool* 303:968–975. <https://doi.org/10.1002/jez.a.211.OXYGEN>
123. Callier V, Shingleton AW, Brent CS, et al (2013) The role of reduced oxygen in the developmental physiology of growth and metamorphosis initiation in *drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 216:4334–4340. <https://doi.org/10.1242/jeb.093120>
124. Callier V, Nijhout HF (2011) Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14664–14669. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106556108>
125. Uday Bandyopadhyay, Dipak Das RKB (1999) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. *Immun Inflamm Heal Dis* 77:658–666. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805417-8.00004-4>
126. Parkes TL, Hilliker AJ, Phillips JP (1999) Motorneurons, reactive oxygen, and life span in *Drosophila*. *Neurobiol Aging* 20:531–535. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00086-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00086-X)
127. Kruska P, Kerner T (2011) Akute respiratorische Insuffizienz – Präklinische Therapie obstruktiver Ventilationsstörungen. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerztherapie* 46:726–734. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297179>
128. Ali SS, Hsiao M, Zhao HW, et al (2012) Hypoxia-adaptation involves mitochondrial metabolic depression and decreased ROS leakage. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036801>
129. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275:25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>
130. Callier V, Hand SC, Campbell JB, et al (2015) Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 218:2927–2934. <https://doi.org/10.1242/jeb.125849>

131. Lavista-Llanos S, Centanin L, Irisarri M, et al (2002) Control of the Hypoxic Response in *Drosophila melanogaster* by the Basic Helix-Loop-Helix PAS Protein Similar. *Mol Cell Biol* 22:6842–6853. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.19.6842-6853.2002>
132. Englund C, Uv AE, Cantera R, et al (1999) *adrift*, a novel *bnl*-induced *Drosophila* gene, required for tracheal pathfinding into the CNS. *Development* 126:1505–1514
133. Hellmut Heering V (1956) Zur Biologie, Ukologie und zum Massenwechsel des Buchenpracht-Kafers (*Agrilus viridis* L.). *J Appl Entomol* 39:76–114
134. Krieg A (1955) Untersuchungen über die Polyedrose von *Neodiprion sertifer* (Geoffr). *Arch Gesamte Virusforsch* 6:163–174. <https://doi.org/10.1007/BF01247066>
135. Frazier MR, Woods HA, Harrison JF (2001) Interactive effects of rearing temperature and oxygen on the development of *Drosophila melanogaster*. *Physiol Biochem Zool* 74:641–650. <https://doi.org/10.1086/322172>
136. Colombani J, Bianchini L, Layalle S, et al (2005) Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* (80-) 310:667–670. <https://doi.org/10.1126/science.1119432>
137. Wong DM, Shen Z, Owyang KE, Martinez-Agosto JA (2014) Insulin- and warts-dependent regulation of tracheal plasticity modulates systemic larval growth during hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 9:1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115297>
138. Yoko Honda SH (2002) Oxidative Stress and Programmed Cell Death in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann NY Acad Sci* 959:466–474
139. Zhang Y, Shao Z, Zhai Z, et al (2009) The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PLoS One* 4:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006348>
140. Mehta R, Steinkraus K a, Sutphin GL, et al (2009) Proteasomal Regulation of the Hypoxic Response Modulates Aging in *C. elegans*. *Science* (80-) 324:1196–1198
141. Jensen KS, Binderup T, Jensen KT, et al (2011) FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *EMBO J* 30:4554–4570. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.323>
142. Bakker WJ, Harris IS, Mak TW (2007) FOXO3a Is Activated in Response to Hypoxic Stress and Inhibits HIF1-Induced Apoptosis via Regulation of CITED2. *Mol Cell* 28:941–953. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.035>
143. Salih DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20:126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.02.005>
144. Yamamoto R, Tatar M (2011) Insulin receptor substrate chico acts with the transcription factor FOXO to extend *Drosophila* lifespan. *Aging Cell* 10:729–732. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00716.x>

145. Mabon ME, Scott BA, Crowder CM (2009) Divergent mechanisms controlling hypoxic sensitivity and lifespan by the DAF-2/insulin/IGF receptor pathway. *PLoS One* 4:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007937>
146. Barbara A. Scott, Michael S. Avidan CMC (2003) Regulation of hypoxic death in *C. elegans* by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2. *Science* (80-) 296:23988–23991. <https://doi.org/10.1126/science.1072302>
147. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, et al (2004) Long-lived *Drosophila* with over-expressed dFOXO in adult fat body. *Science* (80-) 305:361. <https://doi.org/10.1126/science.1098219>
148. Gary N. Landis, Diana Abdueva, Dmitriy Skvortsov, Junsheng Yang, Beth E. Rabin, James Carrick, Simon Tavaré and JT (2004) Similar gene expression patterns characterized aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7663–7668. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4343>
149. Le Bourg É (2001) Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 498:183–186. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02457-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02457-7)
150. Greenberg S, Ar A (1996) Effects of chronic hypoxia, normoxia and hyperoxia on larval development in the beetle *Tenebrio molitor*. *J Insect Physiol* 42:991–996. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(96\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00071-6)
151. Heinrich EC, Farzin M, Klok CJ, Harrison JF (2011) The effect of developmental stage on the sensitivity of cell and body size to hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 214:1419–1427. <https://doi.org/10.1242/jeb.051904>
152. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E (2004) Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J* 24:822–833. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00039004>
153. Mcleish AC, Zvolensky MJ (2010) Asthma and cigarette smoking: A review of the empirical literature. *J Asthma* 47:345–361. <https://doi.org/10.3109/02770900903556413>
154. Velazquez-Ulloa NA (2017) A *Drosophila* model for developmental nicotine exposure. *PLoS One* 12:1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177710>
155. Prange R, Thiedmann M, Bhandari A, et al (2018) A *Drosophila* model of cigarette smoke induced COPD identifies Nrf2 signaling as an expedient target for intervention. *Aging (Albany NY)* 10:2122–2135. <https://doi.org/10.18632/aging.101536>
156. Huang MF, Lin WL, Ma YC (2005) A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air* 15:135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2005.00330.x>
157. Bai TR, Knight DA (2005) Structural changes in the airways in asthma: Observations and consequences. *Clin Sci* 108:463–477. <https://doi.org/10.1042/CS20040342>
158. Gubb D, Sanz-Parra A, Barcena L, et al (2010) Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:1749–1759. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.004>

159. Gelbart, W.M., Emmert DB (2013) Gelbart and Emmert, 2013, FlyBase High Throughput Expression Pattern Data. In: FlyBase Anal. <http://flybase.org/reports/FBrf0221009.html>. Accessed 1 Oct 2019
160. Stümpges B, Behr M (2011) Time-specific regulation of airway clearance by the Drosophila J-domain transmembrane protein Wurst. *FEBS Lett* 585:3316–3321. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.018>
161. Matthias B, Wingen C, Wolf C, Hoch M (2007) Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control. *Nat Cell Biol* 9:847–853. <https://doi.org/10.1038/ncb1611>
162. Nelson KS, Khan Z, Molnár I, et al (2012) Drosophila Src regulates anisotropic apical surface growth to control epithelial tube size. *Nat Cell Biol* 14:518–525. <https://doi.org/10.1038/ncb2467>
163. Robbins RM, Gbur SC, Beitel GJ (2014) Non-canonical roles for Yorkie and Drosophila inhibitor of apoptosis 1 in epithelial tube size control. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101609>
164. DeVeale B, Brummel T, Seroude L (2004) Immunity and aging: The enemy within? *Aging Cell* 3:195–208. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00106.x>
165. Libert S, Chao Y, Chu X, Pletcher SD (2006) Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFκB signaling. *Aging Cell* 5:533–543. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00251.x>
166. Allee JP (2011) Imp-L2 represses insulin signaling in response to hypoxia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
167. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP (2009) Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 124:37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.04.045>
168. Richer SL, Conley DB, Vermylen D, et al (2008) Epithelial Genes in Chronic Rhinosinusitis with and without Nasal Polyps. *Am J Rhinol* 22:228–234. <https://doi.org/10.2500/ajr.2008.22.3162>

Anhang

Tabelle 1: Liste aller Orthologe von SerpinB3 in *Drosophila melanogaster* ausgegeben vom Homologie-Tool der Datenbank Flybase.

SerpinB3-Ortholog	Protein Domäne	Homologie-Wert der AS-sequenz (BLAST-Analyse)
Spn28Dc	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	26%
Spn43Aa	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	32%
Spn88Ea	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	29%
Spn27A	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	32%
Spn42Dd	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	36%
Spn55B	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	34%
Spn42De	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	34%
Spn42Db	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	33%
Spn42Dc	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	31%
Dmel\nec (Spn43Ac)	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	28%
Spn42Da	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	37%
Spn77Ba	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	\
Spn88Eb	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	28%
Spn28B	Serpin-konservierte Domäne;	29%
Spn28Da	Serpin-konservierte Domäne;	30%
Spn28F	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	31%
Spn38F	Serpin-konservierte Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	31%
Spn28Db	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin

SerpinB3-Ortholog	Protein Domäne	Homologie-Wert der AS-sequenz (BLAST-Analyse)
Spn47C	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn43Ab	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn31A	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
CG43366	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn100A	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn43Ad	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn53F	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn75F	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Spn85F	keine Protease-Aktivität; nicht-inhibierendes Serpin	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin

Tabelle 2: Liste aller Orthologe von SPINK5 in *Drosophila melanogaster* ausgegeben vom Homologie-Tool der Datenbank Flybase.

Spink5-Ortholog	Protein Domäne	Homologie-Wert der AS-sequenz (BLAST-Analyse)
CG14933	Kazal-Domäne	34%
CG42486	Kazal-Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	44%
CG32354	Kazal-Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	45%
CG1077	Kazal-Domäne	\
CG12716	Kazal-Domäne	\
Kaz-m1	Kazal-Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	\
Sfp33A3	Kazal-Domäne	\
CG31704	Kazal-Domäne	45%
CG44008	Kazal-Domäne; Serinpeptidase-Inhibitor-Aktivität	35%

Spink5-Ortholog	Protein Domäne	Homologie-Wert der AS-sequenz (BLAST-Analyse)
CG45011	Kazal-Domäne	45%
CG45012	Kazal-Domäne	\
CG42370	Metallopeptidase-katalytische Domäne	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
CG4580	Metallopeptidase-katalytische Domäne	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
Amalgam	Immunoglobulin Subtype 2; Antigenbindend	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
CG31814	Immunoglobulin Subtype 2; Antigenbindend	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
CG6867	Immunoglobulin Subtype 2; Antigenbindend	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin
DIP- α	Immunoglobulin Subtype 2; Antigenbindend	nicht durchgeführt, da nicht-inhibitorisches Serpin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Die funktionelle Relevanz zweier Asthma-assoziiertes Serpine in den Atemwegen von *Drosophila melanogaster*“ unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt zu haben. Die Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht. Überdies versichere ich, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Borstel, den _____
(Datum)

(Hanna Angstmann)

Danksagung

Nun ist es an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Thomas Roeder und Prof. Dr. Holger Heine, die stets als Ansprechpartner bereitstanden und sich bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

Ganz herzlich möchte ich auch Frau Dr. Christina Wagner danken, dass sie mich als Doktorandin in ihre fantastische und liebenswerte Gruppe geholt hat und mir die Gelegenheit gegeben hat, dieses Thema nicht nur zu bearbeiten, sondern auch mit ihm zu wachsen.

Bei Dr. Karin Uliczka und Dr. Stephanie Papenmeier möchte ich mich außerdem dafür bedanken, dass sie nicht nur für endlose Diskussionen von Ergebnissen und Versuchen parat standen, sondern mich auch aus den berühmten Frustrationslöchern geholt haben.

Ein großes Dankeschön geht an Karo und Johanna, die selbst und mit mir gelitten haben und dabei eine große Unterstützung waren. Vielen Dank Karo, dass du in mein Büro gezogen bist und die Arbeit dadurch noch schöner gemacht hast!

Vielen Dank auch an Beate Höschler für die Unterstützung im Labor, die Naschereien und das offene Ohr.

Außerdem vielen Dank an alle Mitglieder der Gruppen „Asthma-Exazerbation & -Regulation“, „Experimentelle Pneumologie“ und „Frühkindliche Asthmaprägung“, die stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Meinen Eltern, die mich wenig gesehen haben, dafür aber bei kleinen und großen Problemen umso mehr von mir hören mussten. Und meinen Brüdern, Benedikt und Jonas, die immer hinter mir standen und ohne die das Leben nur halb so schön wäre.