

Die Rolle von $G\alpha_i$ -Proteinen für die murine Lungenfunktion

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nowacki, Andreas

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

Widmung

Meinen Eltern, die mir auf meinem bisherigen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne deren Unterstützung, auch diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	11
1.1. SIGNALTRANSDUKTION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN	11
1.1.1. <i>Allgemeine Grundzüge der Signaltransduktion</i>	11
1.1.2. <i>Komponenten der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion</i>	14
- <i>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren</i>	14
- <i>G-Proteine</i>	14
1.1.3. <i>Mechanismus der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion</i>	17
1.1.4. <i>Eigenschaften der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion</i>	19
1.1.5. <i>Gα_i-gekoppelte Signalwege</i>	21
1.2. PERINATALE ANPASSUNGSVORGÄNGE.....	23
1.2.1. <i>Grundzüge der Lungenentwicklung</i>	23
1.2.2. <i>Der erste Atemzug, physiologische Vorgänge bei der Geburt</i>	26
1.2.3. <i>Die Rolle des Surfactant für die Lungenfunktion</i>	28
1.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	32
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1. CHEMIKALIEN.....	33
2.1.1. <i>Allgemein</i>	33
2.1.2. <i>Reaktionskit</i>	34
2.1.3. <i>Zellkulturmedium</i>	34
2.2. GERÄTE.....	34
2.3. VERBRAUCHSMATERIAL	35
2.4. WIRKSTOFFE	35
2.5. MAUSHALTUNG.....	36
2.6. GENERIERUNG G α_{i2} - UND G α_{i3} -DEFIZIENTER MÄUSE.....	36
2.7. BEHANDLUNG VON MÄUSEN MIT PERTUSSISTOXIN	36
2.8. GENOTYPISIERUNG DER G α_{i2} - UND G α_{i3} -DEFIZIENTEN MÄUSE.....	37
2.8.1. <i>Isolation genomischer DNA</i>	37
2.8.2. <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	38
2.9. UNTERSUCHUNG VON MÄUSEN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN DER EMBRYONALENTWICKLUNG.....	40
2.9.1. <i>Zeitlich festgelegte Schwangerschaften und Entnahme der Mausfeten</i>	40
2.9.2. <i>Überlebensfähigkeit, Somato- und Organometrie der neonatalen Mäuse</i>	40

Inhaltsverzeichnis

2.9.3. Entnahme von Lungengewebe	41
2.10. HISTOLOGIE	41
2.10.1. Paraffin-Einbettung	41
2.10.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten	41
2.10.3. Histomorphometrische Auswertung	42
2.11. ELEKTRONENMIKROSKOPIE	42
2.11.1. Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten	42
2.12. ISOLIERT PERFUNDIERTE LUNGE DER MAUS	43
2.12.1. Apparatur der isoliert perfundierten Lunge	43
2.12.3. Ventilation	45
2.12.4. Perfusion	45
2.12.5. Perfusionsmedium	46
2.12.6. Präparation der Mäuse	46
2.12.7. Messung und Aufzeichnung der Daten	47
2.13. AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER DATEN	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1. GENOTYPISIERUNG $G\alpha_i$ -DEFIZIENTER MÄUSE	49
3.2. CHARAKTERISIERUNG NEONATALER $G\alpha_{i2}$ -DEFIZIENTER MÄUSE	50
3.2.1. Überleben und Eingrenzung des Todeszeitpunkts	50
3.2.2. Perinatale Letalität	52
3.2.3. Somato- und Organometrie	56
3.3. HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	61
3.3.1. Morphologie und Morphometrie der Lunge	61
3.3.2. Subzelluläre Untersuchungen der Lungenstrukturen	65
3.4. CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN LUNGENFUNKTION ADULTER $G\alpha_{i2}$ - DEFIZIENTER MÄUSE	68
3.5. CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN LUNGENFUNKTION ADULTER $G\alpha_{i3}$ - DEFIZIENTER MÄUSE	72
3.6. CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN LUNGENFUNKTION ADULTER PERTUSSISTOXIN-BEHANDELTER MÄUSE	75
4. DISKUSSION	79

Inhaltsverzeichnis

4.1	CHARAKTERISIERUNG NEONATALER $G\alpha_{i2}$ -DEFIZIENTER MÄUSE	79
4.1.1.	<i>Perinatale Sterblichkeit</i>	79
4.1.2.	<i>Somato- und Organometrie</i>	82
4.1.4.	<i>Mögliche Todesursache $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse</i>	83
4.2.	DIE FUNKTION $G\alpha_i$ -GEKOPPELTER SIGNALWEGE FÜR DIE ADULTE LUNGENFUNKTION DER MAUS	86
4.2.1.	<i>Die Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse</i>	87
4.2.2.	<i>Die Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse</i>	88
4.2.3.	<i>Die Lungenfunktion Pertussistoxin behandelte Mäuse</i>	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG	92
6.	LITERATUR	94
7.	ANHANG	104
8.	DANKSAGUNGEN	106
9.	LEBENS LAUF	107

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

AC	Adenylylzyklase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
Bp	Basenpaar
C	Compliance
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Schichtdicke
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
e	Embryonaltag, Tag nach Befruchtung
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure
ES	embryonale Stammzellen
G α	α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G β	β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
G $\beta\gamma$	Komplex aus G β und G γ
GDP	Guanosindiphosphat
G γ	γ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins

Abkürzungsverzeichnis

GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	entionisiertes Wasser
Ins	Inositol
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IE	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IVC	<i>individually ventilated cages</i> , individuell ventilierte Käfige
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
k.o.	<i>knockout</i> , Gen-defiziente Maus
l	Liter
L-VDCC	spannungsabhängiger L-Typ Kalzium-Kanal
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichnis

O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	pulmonalarterieller Druck
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration in wässriger Lösung
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
Ptx	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
R	Atemwegswiderstand
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
SPF	<i>specific pathogen free</i> , pathogenfreie Haltungsbedingungen
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
t	Zeit
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol

Abkürzungsverzeichnis

TV	tidal volume, Atemzugvolumen
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
U	<i>units</i> , definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen ein mmol Substrat pro min umsetzt
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

1.1.1. Allgemeine Grundzüge der Signaltransduktion

Zellen sind hochorganisierte Strukturen, eine Voraussetzung dafür, dass die Vielzahl biochemischer Prozesse in ihnen - man denke an komplexe chemische Reaktionskaskaden wie die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus, Atmungskette, Synthese und Abbau von Aminosäuren und Purinbasen etc. - effizient ablaufen können. Letztlich dienen alle biologischen Prozesse der Energiegewinnung und dem Erhalt der Ordnung, die Voraussetzung des Lebens ist (Schrödinger, 1951). Jede Zelle ist zu diesem Zweck von der Umwelt durch eine biologische Membran getrennt, die aus einer ungefähr 5 nm dünnen Lipiddoppelschicht besteht und als Barriere für hydrophile Moleküle dient. Biologische Membranen müssen jedoch weiteren Anforderungen genügen: bestimmte Moleküle wie Nährstoffe und Abbauprodukte aber auch geladene Ionen müssen die Membranen passieren können, weshalb sie mit integralen Proteinen durchsetzt sind, die die Aufgabe von Transportern, Pumpen und Ionenkanälen übernehmen. Darüber hinaus ist es für das unmittelbare Überleben von Zellen unverzichtbar, auf bestimmte Umweltreize reagieren und das Zellverhalten entsprechend anpassen zu können. In mehrzelligen Organismen kommunizieren Zellen untereinander über Botenstoffe wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Lipophile Überträgerstoffe wie beispielsweise die Gruppe der Steroidhormone oder das Triiodthyronin diffundieren dabei direkt durch die Zellmembran und vermitteln ihre Wirkung über intrazelluläre Rezeptoren. Hydrophile Signalmoleküle, wie beispielsweise die von den biogenen Aminen sich ableitenden Neurotransmitter und Mediatoren Dopamin, Histamin, Serotonin etc. sind nicht in der Lage, in ausreichender Menge die lipophile Membran zu passieren. Hier ist der kritische Schritt der Informationsübertragung die Umwandlung des extrazellulären Signalstoffes in ein intrazelluläres Signal. Diesen Umwandlungsprozess bezeichnet man als Signaltransduktion.

Einleitung

Nach klassischer Auffassung lässt sich die transmembranäre Signaltransduktion in drei Funktionsbereiche untergliedern (Birnbaumer, 2007). An der Zelloberfläche, also der Plasmamembran, müssen extrazelluläre Signale, auch „first messenger“ genannt, detektiert werden (*Reizdiskriminierung*). Diese Funktion wird von Rezeptoren ausgeübt, von denen es mehrere Klassen gibt wie z.B. die Rezeptor-Tyrosinkinasen oder die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Das extrazelluläre Signal wird intrazellulär weitergeleitet und verstärkt (*Verstärkerfunktion*). An der Reizweiterleitung sind im Falle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren G-Proteine beteiligt. Man kann sie vereinfachend als Signaltransduktoren auffassen, die das einkommende Signal des Rezeptors empfangen und es an bestimmte Zielmoleküle weiterleiten. Diese Ziel-/ oder Effektormoleküle können sehr unterschiedlich sein, wie z.B. Ionenkanäle oder Enzyme wie die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-abhängige Kinase (PI3K), Adenylylzyklase (AC) und Phospholipase C. Letztere generieren ihrerseits Signalmoleküle innerhalb der Zelle wie Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-Triphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG), welche man wegen ebendieser intrazellulären Signalfunktion als Antwort auf den extrazellulären Reiz hin als sekundäre Botenstoffe bzw. „second messenger“ bezeichnet. Eine Signalverstärkung wird im Falle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren u.a. dadurch erreicht, dass ein Ligand-aktivierter Rezeptor viele G-Proteine aktivieren kann und auf der nächsten Stufe der Signalkette ein Rezeptor-stimuliertes G-Protein die Generierung einer Vielzahl von „second-messenger“-Molekülen bewirkt. Schließlich werden sowohl durch G-Proteine als auch durch „second messenger“ Zielmoleküle wie Enzyme und Transkriptionsfaktoren moduliert, die das Zellverhalten beeinflussen (*Effektorfunktion*). Eine schematische Übersicht gibt Abbildung 1.

G-Protein-gekoppelte Signalwege spielen eine ubiquitäre Rolle bei der Vermittlung der Zellkommunikation. Eine gestörte Zellkommunikation stellt vielfach die pathogenetische Grundlage von Erkrankungen dar. Dieser Zusammenhang sowie die Tatsache, dass genetische Mutationen von Bestandteilen G-Protein-abhängiger Signalwege ursächlich für Krankheiten wie z.B. der Fibrösen Dysplasie sein können (Chapurlat *et al.*, 2000), legen nahe, wie wichtig ein fundiertes Verständnis dieser Signalwege für das Verstehen von Erkrankungen und zukünftige mögliche Therapiekonzepte ist. Dass bereits heutzutage rund 25 % der Pharmaka ihre Wirkung

Einleitung

über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln, unterstreicht nochmals die herausragende Bedeutung dieser Signalwege in der Medizin (Overington *et al.*, 2006).

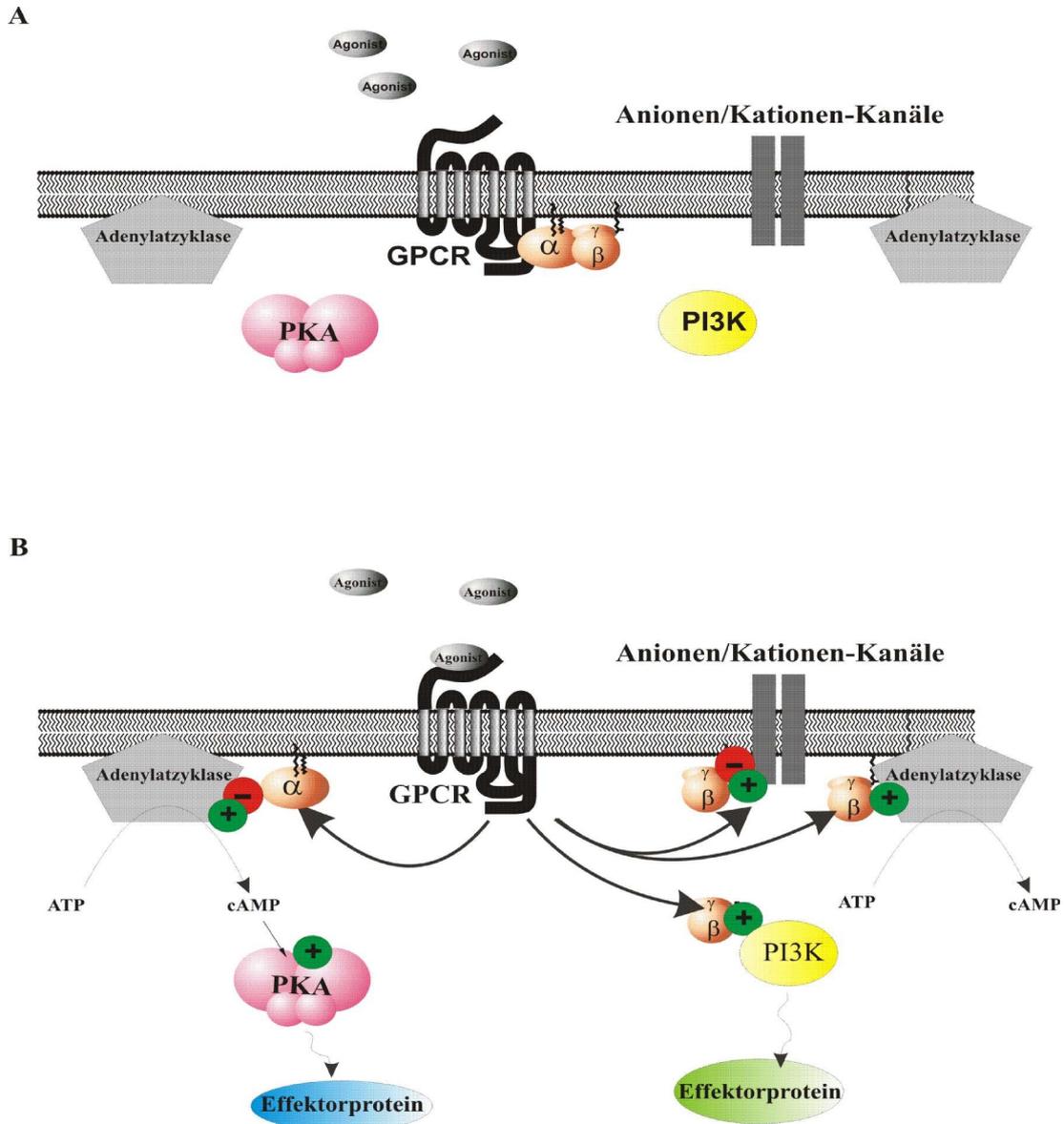


Abbildung 1: Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Im Ruhezustand liegen die heterotrimeren G-Proteine, bestehend aus der α -Untereinheit und dem $\beta\gamma$ -Komplex als trimerer Komplex vor (A). Ein Überträgerstoff (im pharmakologischen Sinne in Form eines Agonisten) bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Dieser führt zur Aktivierung der an der Innenseite der Plasmamembran lokalisierten G-Proteine, die daraufhin in die α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziieren. Beide Komponenten modulieren die Aktivität einer Vielzahl von Zielproteinen wie Adenylatzyklasen, Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) oder transmembranäre Ionenkanäle. Adenylatzyklase wird in Abhängigkeit von den einzelnen Subtypen der G-Protein-Untereinheiten in ihrer Aktivität stimuliert oder inhibiert, aus Adenosintriphosphat (ATP) den second messenger cAMP zu synthetisieren. cAMP seinerseits aktiviert die Proteinkinase A, die daraufhin wiederum eine Vielzahl von Effektorproteinen in deren Aktivität moduliert (B). Einzelheiten sind im Text genauer beschrieben.

1.1.2. Komponenten der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion

- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren. Sie besitzen alle eine ähnliche Struktur: als integrale Membranproteine durchspannen sie die Plasmamembran als einzige Polypeptidkette mit sieben hydrophoben α -Helices, weshalb sie auch als 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (7-TM-Rezeptoren) bezeichnet werden. Über 800 Gene im menschlichen Genom kodieren für 7-TM-Rezeptoren, die meisten davon für Geruchs-Rezeptoren (Pierce *et al.*, 2002). Auf der Grundlage von Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz lassen sie sich in drei Gruppen einteilen: Gruppe A ist die mit Abstand größte Gruppe und beinhaltet die Rezeptoren für Licht (Rhodopsin) und Adrenalin, sowie Odorant-Rezeptoren. Familie B (~25 Mitglieder) und C sind relativ klein und beinhalten die Rezeptoren für die gastrointestinale Peptidfamilie (Sekretin, Glukagon, VIP etc.) bzw. Geschmacksrezeptoren oder den GABA_B-Rezeptor. Es konnte u.a. bereits von Rhodopsin (Palczewski *et al.*, 2000), vom β_2 -adrenergen Rezeptor (Rasmussen *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2011) sowie vom muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptor (Kruse *et al.*, 2012) die Kristallstruktur aufgeklärt werden.

- G-Proteine

An der Innenseite der Plasmamembran sind die 7-TM-Rezeptoren an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende-Proteine (G-Proteine) gekoppelt, die je nach Aktivitätszustand entweder ein GDP oder ein GTP als Komplex mit Mg²⁺ gebunden haben. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit, da letztere als stabiles Dimer zusammen vorliegen, spricht man von der α -Untereinheit und dem $\beta\gamma$ -Komplex (Nürnberg *et al.*, 1995). Die α -Untereinheiten haben ein Molekulargewicht je nach Subtyp im Bereich von ~39-52 kDa, die $\beta\gamma$ -Komplexe je nach Zusammensetzung von ~45 kDa. Sowohl die α -Untereinheit, als auch die γ -Untereinheit sind über einen Lipidanker an die Innenseite der Membran gebunden, sodass sie ihre Funktionen im Bereich der Plasmamembranen ausüben.

Einleitung

Die α -Untereinheit gehört zu einer größeren Familie der GTPasen (Guaninnukleosidtriphosphat-spaltende Enzyme), die auch kleine monomere G-Proteine wie Ras und Ras-ähnliche GTPasen sowie Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und G (EF-G) beinhaltet (Bourne *et al.*, 1990). G-Proteine kommen in zwei Zuständen vor, dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand und mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zu einem Heterotrimer assoziiert und in einem aktiven Zustand, wenn die α -Untereinheit GTP gebunden hat und vom $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert vorliegt. Da die α -Untereinheit über eine intrinsische GTPase-Aktivität verfügt und GTP zu GDP und P_i hydrolysiert, sind G-Proteine als molekulare Schalter mit eingebauter Zeitschaltuhr aufzufassen, die - wenn einmal durch ein externes Signal angeschaltet - für eine bestimmte Dauer aktiv sind und die Aktivität von verschiedenen Zielmolekülen modulieren, um sich dann wieder selbst abzuschalten. Die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit kann zudem unter anderem durch Effektoren sowie Mitglieder der Familie der RGS-Proteine (*regulators of G protein signalling*) gesteigert werden was zu einer früheren Terminierung der Signalübertragung führt (De Vries *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000).

Die Nomenklatur der G-Proteine ist historisch entstanden und richtet sich nach der α -Untereinheit. So wurde das zuerst entdeckte $G\alpha_s$ -Protein nach der stimulierenden Wirkung seiner α -Untereinheit α_s auf das Enzym Adenylylzyklase, das kurz darauf entdeckte $G\alpha_i$ -Protein nach seiner hemmenden/ inhibitorischen Wirkung auf die Adenylylzyklase benannt (Birnbaumer, 2007). Bis heute sind 23 verschiedene α -Untereinheiten bekannt, die von 17 verschiedenen Genen codiert werden und in 4 Familien, basierend auf Sequenzhomologien, untergliedert werden können: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.*, 1991). So enthält die $G_{i/o}$ -Familie drei Haupt- G_o -Isoformen ($G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_{o3}$), drei G_i -Formen ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$), die retinalen Transduzine ($G\alpha_{tr}$ und $G\alpha_{tc}$), ein gustatorisches $G\alpha_{gust}$, sowie $G\alpha_z$. Die Mitglieder modulieren dabei die Aktivität unterschiedlicher Effektorsysteme (Tabelle 1).

Neben der beschriebenen Funktion von G-Proteinen als Elemente der Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hat man G-Proteine auch an intrazellulären Membranen nachgewiesen und ihnen eine Funktion beim intrazellulären Transport von Vesikeln u.a. in Zusammenhang mit der Endo- und Exozytose zugeschrieben (Ahnert-Hilger *et al.*, 1998; Le-Niculescu *et al.*, 2005; Nürnberg *et al.*, 1996; Valenti *et al.*, 1998). So wurde insbesondere die Isoform $G\alpha_{i3}$ an Membranen des

Einleitung

Golgi-Apparates von Nieren- und Pankreas-Zellen (Denker *et al.*, 1996; Stow *et al.*, 1993), sowie an endozytotischen Vesikeln von Nierenepithel gefunden (Lou *et al.*, 2002).

Tabelle 1: Wirkungen der α -Untereinheiten von G-Proteinen auf primäre Effektorsysteme (vereinfacht nach Wettschureck *et al.* 2005). Abkürzungen: AC, Adenylzyklase; GIRK, G protein-regulated inward rectifier potassium channel; GRK, G protein-regulated kinase; PI-3-K, phosphatidylinositol 3-kinase, PDE, phosphodiesterase; PLC, phospholipase C; RhoGEF, Rho guanine nucleotide exchange factor; VDCC, voltage-dependent Ca^{2+} -channel.

Gα-Klasse	Effektor	Intrazelluläre Hauptwirkung
G α_s	AC (alle Isoformen) \uparrow	[cAMP] \uparrow
G α_{i1-3}	AC I,III,V,VI,VIII,IX \downarrow	[cAMP] \downarrow
G α_o	VDCC \downarrow , GIRK \uparrow (durch $\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelt)	[Ca $^{2+}$] \downarrow , [K $^{+}$] \uparrow
G α_z	AC (V, VI) \downarrow	[cAMP] \downarrow
G α_{gust}	PDE ? \uparrow	[cAMP] \downarrow
G $\alpha_{t\ c/r}$	PDE 6 \uparrow	[cGMP] \downarrow
G $\alpha_{q/11}$	PLC- β 1-4 \uparrow	InsP $_3$, DAG, [Ca $^{2+}$] \uparrow
G $\alpha_{12/13}$	P115-RhoGEF PDZ-RhoGEF LARG (Leukemia associated RhoGEF) Gap1m Cadherin	

Bei der Erforschung von G-Protein-gekoppelten Signalwegen kann man sich die spezifische Wirkung bakterieller Toxine zu Nutze machen, wie z.B. das Pertussistoxin (Ptx) des Bakteriums *Bordetella Pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens. Es ADP-ribosyliert spezifisch die G α_i - und G α_o -Untereinheiten (Ausnahme: G α_z) und verhindert dadurch die Interaktion mit G-Protein-aktivierenden Rezeptoren, was zu einer Entkopplung und Inaktivierung G α_i -abhängiger Signalwege führt (Nürnberg, 2000).

Ähnlich wie bei den α -Untereinheiten, kennt man verschiedene β -Untereinheiten und γ -Untereinheiten. Fünf der sechs β -Untereinheiten zeigen eine 80 %ige Identität in ihrer Aminosäuresequenz, G β_5 spielt eine Ausnahme mit nur 53 % Übereinstimmung im

Einleitung

Vergleich zu den anderen Isoformen (Clapham *et al.*, 1997). Die 12 γ -Untereinheiten werden in 3 Subfamilien basierend auf Sequenzhomologien unterteilt (Hurowitz *et al.*, 2000). Neben den α -Untereinheiten modulieren auch die $\beta\gamma$ -Komplexe die Aktivität von einigen Zielmolekülen, wie Ionenkanäle, PI3-Kinasen, Adenylzyklen, Rezeptorkinasen und PLC- β (Wettschureck *et al.*, 2005). Eine vereinfachte Übersicht gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Wirkungen der G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf primäre Effektorsysteme (nach Wettschurek et al. 2005). Abkürzungen: AC, Adenylzyklase; GIRK, G protein-regulated inward rectifier potassium channel; GRK, G protein-regulated kinase; PDE, phosphodiesterase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC, phospholipase C; VDCC, voltage-dependent Ca^{2+} -channel.

Effektor	Wirkung
AC I	↓
AC II, IV, VII	↑
PLC- β	↑
GIRK 1-4 (Kir3.1-3.4)	↑
Kir6	↑
GRK2 und 3	↑
PI3K β, γ	↑
N-,P/Q-,R-type VDCC, T-type VDCC (Cav 2.1-2.3)	↓

1.1.3. Mechanismus der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion

G-Protein gekoppelte Rezeptoren kommen vereinfacht mindestens in zwei Zuständen vor, einem inaktiven Zustand R und einem aktiven Zustand R*. Nur der aktive Zustand R* aktiviert G-Proteine an der Innenseite der Membran. Auf der extrazellulären Seite können sie einen Liganden binden. Die Bindung erfolgt reversibel und entsprechend dem Massenwirkungsgesetz. Die Kinetik der Rezeptor-Liganden-Interaktion kann durch das mathematische Modell der Enzymkinetik der Michealis-Menten-Theorie beschrieben werden. Mit steigender Konzentration des Liganden werden mehr Rezeptoren besetzt. Fällt die Ligandenkonzentration ab, so dissoziieren Rezeptor und Ligand. Auch in Abwesenheit eines Liganden können Rezeptoren eine basale Aktivität zeigen. Derartige Rezeptoren bezeichnet man als konstitutiv aktiv. Bestimmte Punktmutationen beispielsweise im α_{2B} - und β_2 -Adrenorezeptor können die basale Aktivität steigern (Lefkowitz *et al.*, 1993; Samama *et al.*, 1993). Diese Entdeckungen

Einleitung

sprechen für ein Konzept, indem sich ein Rezeptor in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem inaktiven Zustand R und dem aktiven Zustand R* befindet und unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden zu jeder Zeit zwischen diesen Zuständen hin- und herpendelt. Das Binden eines Liganden an seinen Rezeptor führt zu einer Änderung der Konformation des Rezeptors, diese Konformationsänderung wird über die sieben transmembranären Helices an die Innenseite der Membran weitergeleitet. Einhergehend mit der Änderung der Rezeptorkonformation erfolgt eine Änderung im Aktivitätszustand des Rezeptors, so dass das dynamische Gleichgewicht vermehrt auf die Seite des aktiven Zustandes R* verschoben wird. Anders ausgedrückt bewirkt die Anwesenheit des Liganden eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, dass der Rezeptor in den aktiven Zustand übergeht. Dieses Modell erklärt auch die Wirkungsweise von Rezeptorantagonisten und inversen Agonisten, letztere scheinen das Gleichgewicht des Rezeptors mehr in die inaktive Form R zu verschieben, senken also die Aktivität über das basale Ruhenniveau hinaus (Gudermann *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu der klassischen Ansicht, nach der Rezeptoren in zwei Zuständen vorliegen, legen neuere Modelle unter Berücksichtigung der Analyse der Kristallstruktur Agonist- und Antagonist-gebundener Rezeptoren jedoch nahe, dass ein Rezeptor in mehr als zwei Konformationszuständen vorkommt (Kobilka, 2011; Kobilka *et al.*, 2007). Arbeiten über das Rhodopsin (Arnis *et al.*, 1993) und den humanen TSH-Rezeptor (Allgeier *et al.*, 1994; Parma *et al.*, 1995) lassen vermuten, dass es vom jeweiligen Zustand abhängt, welches der G-Proteine aktiviert wird, mit denen der Rezeptor interagieren kann (siehe unten).

Nach der gängigen Modellvorstellung liegt das G-Protein im Ruhezustand als $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer vor, die α -Untereinheit hat dabei GDP gebunden. Das Überführen des Rezeptors aus dem inaktiven in den aktiven Zustand dient dabei als initiale Zündung eines Aktivierungs-Deaktivierungs-Zyklus des G-Proteins: das G-Protein erfährt eine Konformationsänderung, während der es zum Austausch von GDP zu GTP kommt, das im Zytoplasma in 10-fach höherer Konzentration vorliegt. GTP stabilisiert eine Mg^{2+} -Komplexbildung mit spezifischen Aminosäure-Seitenketten im Inneren der $G\alpha$ -Untereinheit und die α -Untereinheit dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Komplex (Birnbaumer 2007). Beide Untereinheiten werden damit funktionell aktiv, indem sie die Funktion von

Einleitung

bestimmten Zielmolekülen (Effektoren) modulieren (Tabelle 1, Tabelle 2). Der entscheidende Mechanismus zur Inaktivierung der G-Proteine ist die Hydrolyse des GTP zu GDP und P_i , die von der α -Untereinheit selbst katalysiert wird. Die sehr langsam verlaufende Hydrolyse kann in ihrer Geschwindigkeit durch andere Proteine beeinflusst werden. Man bezeichnet sie als GTPase aktivierende Enzyme (GAP) bzw. als „regulators of G protein signalling“ (RGS), von denen mittlerweile über 20 Vertreter bekannt sind (Birnbaumer, 2007; Ross *et al.*, 2000). Ihre Rolle bei der Signaltransduktion liegt in der Verbesserung der zeitlichen Auflösung eines Signals (Doupnik *et al.*, 1997). Im nun wieder GDP-gebundenen Zustand reassoziert die α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Komplex zum funktionell inaktiven Heterotrimer, um erneut einen Zyklus zu durchlaufen, falls aktive Rezeptoren vorliegen. Ein Mechanismus der Signalverstärkung wird auf dieser Ebene dadurch erreicht, dass ein Rezeptor im aktiven Zustand mehrere G-Proteine aktivieren kann (Nürnberg *et al.*, 1995).

1.1.4. Eigenschaften der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion

Die Wirkungen von körpereigenen Signalüberträgerstoffen (Hormone, Neurotransmitter etc.) und Pharmaka sind höchst zellspezifisch, d.h. verschiedene Zelltypen können auf dasselbe extrazelluläre Signalmolekül unterschiedlich antworten. So wirkt beispielsweise Adrenalin am Herzen bekanntermaßen positiv chrono-, dromo-, ino- und lusitrop, am Musculus sphincter urethrae internus (innerer Blasenschließmuskel) verstärkt Adrenalin den Muskeltonus, an der glatten Muskulatur der Bronchialwand vermittelt Adrenalin wiederum eine Verringerung des Muskeltonus und wirkt bronchodilatatorisch. Eine einzelne Zelle trägt an ihrer Oberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, mit denen sie eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalen in unterschiedlichen Signalkombinationen zu jedem Zeitpunkt detektiert. Diese Signale werden integriert und das Zellverhalten daraufhin spezifisch abgestimmt. Es ist von zentraler Bedeutung, wie G-Protein-abhängige Signalwege organisiert sind, um die verschiedenen ankommenden Signale zu integrieren und zellspezifische Antworten hervorzurufen. Einige Prinzipien sollen in diesem Zusammenhang erwähnt werden. Sie verdeutlichen die enorme Komplexität G-Protein-abhängiger Signalwege, die jedoch die Grundlage für die zellspezifischen Wirkungen von Signalstoffen sind.

Einleitung

Ein Ligand (Hormon, Neurotransmitter, Pharmakon etc.) kann viele verschiedene Rezeptoren und Rezeptorsubtypen binden. So wurden 12 verschiedene Rezeptoren für Serotonin, 10 verschiedene Rezeptoren für Adrenalin, 5 Muskarin- und 5 Dopaminrezeptoren durch Klonierung entdeckt, die z.T. gewebe- und zellspezifisch exprimiert werden und unterschiedliche Signaleigenschaften aufweisen (Gudermann *et al.*, 1996). Umgekehrt kann ein einzelner Rezeptorsubtyp mehrere unterschiedliche Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten binden.

Ein Rezeptor kann an mehrere G-Proteine unterschiedlicher Familien koppeln. Diese „Promiskuität“ gegenüber verschiedenen Vertretern der G-Proteine konnte u.a. für den α_{2B} -Adrenorezeptor, β_1 -Adrenorezeptor, Somatostatinrezeptoren (SSTR), Vasopressin V_1 -Rezeptor, Angiotensin AT_1 -Rezeptor, Thrombinrezeptoren, TSH-Rezeptor u.v.m. gezeigt werden (Gudermann *et al.*, 1996; Raymond, 1995). Rezeptoren zeigen in vielen Fällen Präferenzen für bestimmte G-Proteine, so etwa der $5HT_1$ -Rezeptor für $G\alpha_{i3}$ gegenüber $G\alpha_{i2}$ (Raymond *et al.*, 1993) oder der Adenosin A_1 -Rezeptor für G_{i2} gegenüber G_o oder G_{i1} (Munshi *et al.*, 1991). Als Anmerkung muss man hinzufügen, dass es auch von der Rezeptordichte abhängt (Gudermann *et al.*, 1996), ob ein Rezeptor neben seinem Partner erster Wahl andere G-Proteine aktiviert. Insgesamt muss man davon ausgehen, dass sich die Promiskuität der Rezeptoren gegenüber verschiedenen G-Proteinen innerhalb bestimmter Grenzen abspielt. Arbeiten von Kleuss *et al.* (Kleuss *et al.*, 1991; Kleuss *et al.*, 1992) und Robinshaw (Richardson *et al.*, 1999) zeigen, dass die spezifische Rezeptor-G-Protein-Interaktion von der Komposition der α -, β -, und γ -Untereinheiten der G-Proteine abhängt. Ob diese aus Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse auch im mehrzelligen Organismus unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden.

Viele unterschiedliche Signalwege konvergieren auf dasselbe Effektorsystem. Dabei legt der genaue Subtyp des Effektorsystems die Art der Konvergenz fest: Adenylylzyklase Typ I (AC_I) wird durch $G\alpha_s$ und Ca^{2+} /Calmodulin (second messenger u.a. des $G\alpha_q$ -gekoppelten Signalweges) aktiviert und durch $G\alpha_i$ -abhängige Signalwege gehemmt, während Adenylylzyklase Typ II und IV von $G\alpha_s$ - und $G\alpha_i$ -gekoppelten Signalwegen aktiviert wird (Taussig *et al.*, 1994).

Dies deutet an, dass einzelne Komponenten der Signalkaskaden untereinander spezifisch mit anderen Elementen wie einzelne Bausteine in einem Baukasten

zusammenpassen und dem System somit Spezifität verleihen. Anders ausgedrückt bedeutet dies: welche Antwort ein bestimmter Signalstoff in einer bestimmten Zelle auslöst, hängt von der exakten Komposition der einzelnen Komponenten des Signalweges ab.

1.1.5. $G\alpha_i$ -gekoppelte Signalwege

Die Mitglieder der $G\alpha_i$ -Familie $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ inhibieren diverse Isoformen der Adenylylzyklase (Offermanns, 2003). In peripheren Geweben weisen sie ein sich partiell überlappendes Expressionsmuster auf. So wird $G\alpha_{i2}$ als prädominante und ubiquitär exprimierte Isoform vorgefunden. Während $G\alpha_{i1}$ vorwiegend neuronal exprimiert sein soll, wird $G\alpha_{i3}$ vorwiegend in nicht-neuronalem Gewebe nachgewiesen. Die Mitglieder der $G\alpha_i$ -Subfamilie weisen mit 85-95 % eine hohe Identität der Aminosäuresequenz auf (Wilkie *et al.*, 1994). Diese beiden Tatsachen - das sich überlappende Expressionsmuster in den verschiedenen Geweben und die hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der einzelnen Mitglieder der $G\alpha_i$ -Familie - deuten bereits auf ein gewisses Maß an Redundanz der jeweiligen Funktionen einzelner $G\alpha_i$ -Proteine hin, d.h. dass für bestimmte Funktionen im Organismus nicht eine einzelne, spezifische $G\alpha_i$ -Isoform benötigt wird, sondern umgekehrt formuliert, mehrere $G\alpha_i$ -Isoformen dieselbe spezifische Funktion erfüllen können. Deshalb ist es gerade für das Verständnis $G\alpha_i$ -gekoppelter Signalwege wichtig, herauszufinden, ob einzelne $G\alpha_i$ -Proteine spezifische Funktionen in den verschiedenen Geweben des Organismus erfüllen und damit Signalwege zu identifizieren, für deren ungestörtes Funktionieren eine spezifische $G\alpha_i$ -Untereinheit benötigt wird.

Um die biologische Rolle der individuellen $G\alpha_i$ -Isoformen zu analysieren und die Frage nach gemeinsamen (= redundanten) oder spezifischen Funktionen einzelner $G\alpha_i$ -Isoformen klären zu können, wurden für alle drei Isoformen $G\alpha_{i1}$ -, $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ entsprechende Gen-defiziente Mauslinien generiert (Jiang *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995). Sowohl $G\alpha_{i1}$ -, $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse sind lebensfähig und weisen ein distinktes Spektrum an Phänotypen auf, das sowohl auf gemeinsame als auch auf Gen-spezifische Funktionen hinweist. So führt der Verlust von $G\alpha_{i1}$ zu einer Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnis (Pineda *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen zeigten eine Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ bei der Insulin induzierten Hemmung der Autophagie

Einleitung

in Hepatozyten (Gohla *et al.*, 2007). Ferner zeigten Untersuchungen von Plummer *et al.* eine notwendige Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen, insbesondere aber von $G\alpha_{i3}$ bei der regelrechten Entwicklung des knorpeligen Rippenbogens und der Wirbelkörper (Plummer *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnte für $G\alpha_{i3}$ eine Rolle bei der Steuerung der Zellpolarität kochleärer Haarzellen demonstriert werden (Ezan *et al.*, 2013). $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse wiederum entwickeln in Abhängigkeit vom Hygienestatus eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, die der Colitis ulcerosa beim Menschen gleichen soll (Rudolph *et al.*, 1995; Wiege *et al.*, 2013). Nach Arbeiten von Wiege *et al.* ergeben sich darüber hinaus spezifische Funktionen von $G\alpha_{i2}$ bei der Regulation der Zellmigration von Makrophagen (Wiege *et al.*, 2012) sowie bei der Rekrutierung und transendothelialen Diapedese von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in einem Modell der Immunkomplex induzierten Lungenerkrankung der Maus (Wiege *et al.*, 2013). Auch die G-Protein-Rezeptor gekoppelte Aktivierung von Thrombozyten durch ADP scheint bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein und deutet damit auf eine spezifische Funktion dieser Isoform hin (Jantzen *et al.*, 2001).

Darüber hinaus konnte eine Beteiligung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege auch in Kardiomyozyten *in vivo* nachgewiesen werden. Die Genexpression sowohl von $G\alpha_{i2}$ als auch von $G\alpha_{i3}$ sind bei Herzinsuffizienz herauf reguliert (Mittmann *et al.*, 2003; Neumann *et al.*, 1988), was eine Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen an pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz nahe legt. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanals (L-VDCC) sowohl im Falle des β_2 -Rezeptors als auch im Falle der muskarinischen Azetylcholin-Rezeptoren durch $G\alpha_i$ -Proteine vermittelt wird (Nagata *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 1999). Dabei konnte durch eine neuere Arbeit von Dizayee *et al.* die Funktion von $G\alpha_i$ -Proteinen bei der Regulation des L-VDCC spezifiziert werden. So zeigten insbesondere $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse eine Veränderung der Leitungseigenschaften und Veränderungen in der Kinetik des L-VDCC in Kardiomyozyten (Dizayee *et al.*, 2011) und eine Prädisposition zur Entwicklung ventrikulärer Arrhythmien (Zuberi *et al.*, 2010). Da $G\alpha_{i2}$ offenbar eine vitale Rolle bei der postnatalen Lungenfunktion hat, sollen im Folgenden die Grundzüge der Lungenphysiologie dargestellt werden.

1.2. Perinatale Anpassungsvorgänge

1.2.1. Grundzüge der Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung bei Mäusen beginnt am Tag 9-9.5 (e 9-9.5) der Embryonalentwicklung durch die Abfaltung der Lungenanlage aus der Laryngotrachealrinne des endodermalen Epithels (Kauffman, 1992). Ausgehend von induktiven Signalen des zellreichen Mesenchyms entsteht ein nach ventro-dorsal auswachsender Tubus (Alescio *et al.*, 1962; Shannon *et al.*, 1999). Im Folgenden beginnt die Aufzweigung des Bronchialbaumes ebenfalls unter dem Einfluss induzierender Signale des Mesenchyms (Warburton *et al.*, 2000). Unter den vom Mesenchym ausgehenden induktiven Signalen wurden u.a. Mitglieder der *Fibroblast-Growth-Factor (FGF)*-Familie (Celli *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1994), der *Epidermal-Growth-Factor (EGF)*-Familie (Seth *et al.*, 1993; Warburton *et al.*, 1992) und der *Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)*-Familie (Souza *et al.*, 1995) identifiziert. Insbesondere Interaktionen zwischen FGF-10 und FGFR-2 spielen bei der Induktion der Bronchusverzweigung eine essentielle Rolle (Bellusci *et al.*, 1997; Celli *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1994; Sekine *et al.*, 1999). FGF-10 wird von Clustern mesenchymaler Zellen exprimiert und wirkt primär chemotaktisch auf das aussprossende Bronchialepithel, das seinerseits FGFR-2 exprimiert (Warburton *et al.*, 2000). Zahlreiche weitere mesenchymale Faktoren sind bei der Proliferation und Differenzierung des respiratorischen Epithels beteiligt, u.a. auch Bestandteile der extrazellulären Matrix (Lwebuga-Mukasa, 1991). Umgekehrt beeinflussen Faktoren, die vom Epithel ausgehen die mesenchymale Genexpression, sodass die Entwicklung der Bronchialaufzweigung auf einem komplexen Wechselspiel zwischen Bronchialepithel und Mesenchym beruht (Cardoso, 2001; Heine *et al.*, 1990; Pepicelli *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1999).

Ausgehend von der ersten Aufzweigung der Lungenanlage in die zwei Hauptbronchien beginnt ein auf beiden Seiten asymmetrischer Prozess der dichotomen (*dichótomos*, „halbgeteilt, entzweigeschnitten“) Verzweigung des Bronchialbaumes in das umgebende zellreiche Mesenchym, der die Grundlage für die spätere Untergliederung der Lungen bei der Maus in rechts vier Lungenlappen und links einen Lungenlappen darstellt. Beim Menschen erfolgt dieser Prozess in einer sowohl zeitlich als auch räumlich streng reproduzierbaren Art und Weise über die ersten 16 Generationen des

Einleitung

Bronchialbaumes. Das für diesen in zeitlich und räumlich eng festgelegten Grenzen ablaufenden Differenzierungsprozess genetisch zugrunde liegende Programm wird durch den im Englischen geprägten Begriff „hard-wiring“ zum Ausdruck gebracht (Hogan, 1999). Die weitere Aufzweigung des Bronchialbaumes von der 16. bis 23. Generation mit der Einmündung in die Alveolen scheint dagegen mehr nach Prinzipien des Zufalls als durch ein genetisch determiniertes Programm abzulaufen.

Histologisch hat man die embryonale Lungenentwicklung chronologisch in vier aufeinander folgende Stadien unterteilt, deren Übergänge fließend sind und man deshalb zu bestimmten Embryontagen in verschiedenen Lungenabschnitten auch unterschiedliche Stadien erkennen kann (Warburton *et al.*, 2000). Abbildung 2 stellt schematisch die murine Lungenentwicklung bis zur Geburt einschließlich der Terminalsackphase dar, die Alveolarphase beginnt erst postnatal (s.u.).

Für die murine prä- und postnatale Lungenentwicklung ist die folgende Einteilung allgemein akzeptiert (Warburton 2000):

1. Pseudoglanduläre Phase (e 9.5-16.6):

Die Lunge ähnelt einer tubulo-azinösen Drüse. Induziert durch ein reiches Mesenchym sprossen und teilen sich die Bronchialanlagen dichotom, jedoch ungleichmäßig auf (s.o.). Das Epithel während dieser Phase ist prismatisch und sezerniert die Lungenflüssigkeit, die den wachsenden Bronchialbaum entfaltet sowie die Zellteilung und das Lungenwachstum stimuliert (Olver *et al.*, 2004). Am Ende der *pseudoglandulären Phase* ist der gesamte später luftleitende Anteil des Bronchialbaumes einschließlich der Bronchioli terminales angelegt. Im Mesenchym entwickeln sich aus Vorläuferzellen vaskuläre Strukturen („*blood lakes*“) durch Transdifferenzierung, ein Vorgang der unter dem Begriff Vaskulogenese bekannt ist (Carmeliet, 2000). Diese erhalten durch den Prozess der Angiogenese, d.h. das Aussprossen von Kapillaren aus präexistenten Gefäßen in unterversorgte Gewebegebiete, im Verlauf Anschluss an die pulmonalen großen Gefäße (deMello *et al.*, 1997).

Einleitung

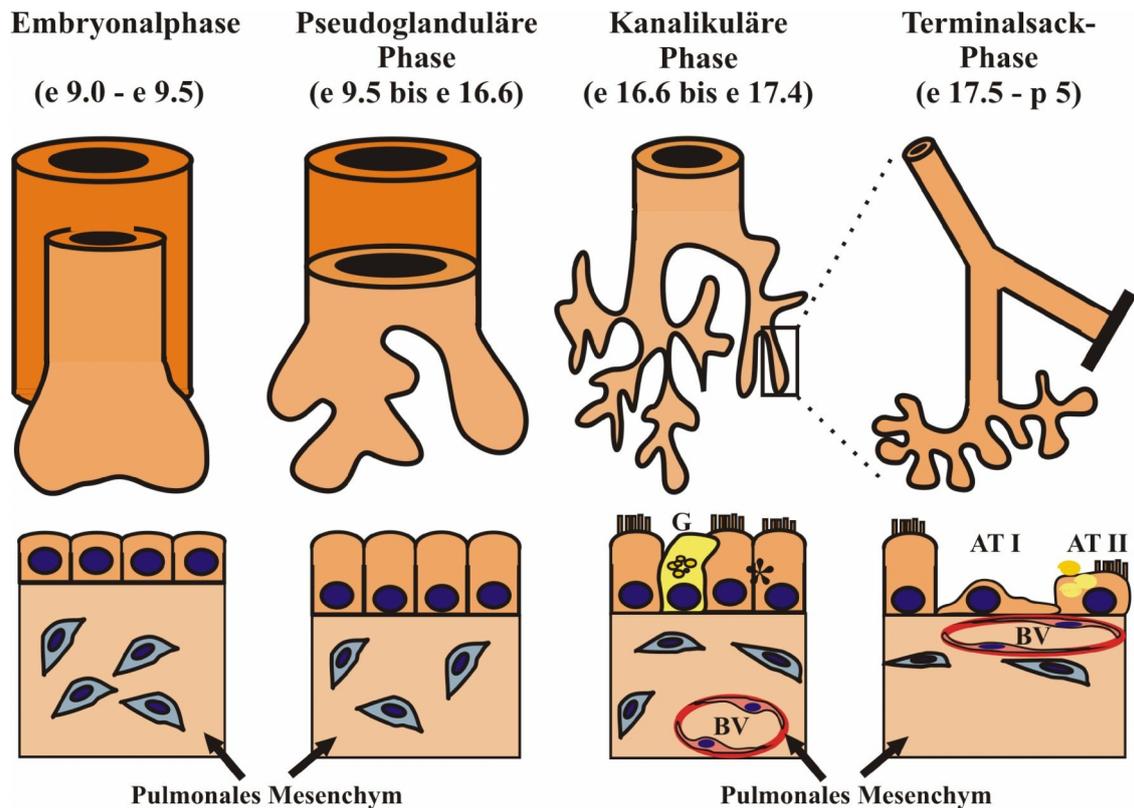


Abbildung 2: Entwicklungsstadien der murinen Lungenentwicklung bis zur Geburt. Die Lungenentwicklung bei Mäusen beginnt am Tag 9-9.5 (e 9-9.5) der Embryonalentwicklung durch die Abfaltung der Lungenanlage in ein zellreiches Mesenchym. Am Ende der *pseudoglandulären Phase* ist der gesamte später luftleitende Anteil des Bronchialbaumes einschließlich der Bronchioli terminales angelegt. Im Zentrum der kanalikulären Phase steht die Entwicklung des gasaustauschenden Abschnitts des Bronchialbaumes, sowie die Proliferation zahlreicher Blutgefäße. Die Differenzierung der für den postnatalen Gasaustausch essentiellen Blut-Luftschranke sowie der Typ I- und Typ II-Alveolarzellen erfolgt während der Terminalsackphase. (Abkürzungen: AT I: Alveolarzelle Typ I; AT II: Alveolarzelle Typ II; BV: Blutgefäß; G: Becherzelle; *: respiratorisches Epithel)

2. Kanalikuläre Phase (e 16.6-17.4)

Die ersten Anlagen der zukünftigen respiratorischen Bronchiolen sprossen unter mehrfacher dichotomer Teilung aus und liefern die Grundlage für den später dem Gasaustausch dienenden Teil des Bronchialbaumes. Ein zellreiches Mesenchym umschließt alle von einem terminalen Bronchiolus aussprossenden Tubuli zu einem zukünftigen Azinus. Die *kanalikuläre Phase* wird auch *vaskuläre Phase* genannt, da man die Aussprossung („Kanalisation“) von Kapillaren entlang des respiratorischen Epithels beobachten kann und sich ein dichtes kapilläres Netz in der Nähe der Epithelien bildet.

Einleitung

3. Terminalsack-Phase (engl.: „terminal sac stage“) (e 17.4-P5)

Die Anzahl der dem nach der Geburt zum Gasaustausch dienenden terminalen Endaufzweigungen sowie die Vaskularisierung nehmen zu, respiratorisches Epithel und Kapillaren innerhalb der terminalen Endaussackungen nähern sich an, das kubische glykogenreiche Epithel der terminalen Endaufzweigungen wandelt sich um in ein flaches Epithel, die Differenzierung der Typ-I- und -II-Alveolarzellen beginnt und damit die Differenzierung der Blut-Luft-Schranke (Burri, 2006). Für den Differenzierungsprozess der terminalen Endaussackungen und der Bildung einer dünnen Blut-Luft-Schranke sind direkte Interaktionen zwischen Epithel und Mesenchym essentiell. Die Typ-II-Alveolarzellen beginnen mit der Synthese des Surfactant (surface active agent), der ein Kollabieren der Alveolen mit dem Beginn der Atmung nach der Geburt verhindert und für die Lungenfunktion das ganze Leben hindurch unverzichtbar ist (Possmayer *et al.*, 1984).

4. Alveolarphase (p 5-30)

Die terminalen Endaussackungen differenzieren weiter in Ductus alveolares und die Alveolen der adulten Maus.

1.2.2. Der erste Atemzug, physiologische Vorgänge bei der Geburt

Am Ende der Schwangerschaft muss die Lunge strukturell und funktionell so ausgereift sein, dass sie die zentrale Aufgabe des Gasaustausches mit dem Ziel der Oxygenierung des Blutes und der CO₂-Abatmung übernehmen kann. Während der Schwangerschaft findet der Gasaustausch des Feten über die Plazenta statt und nicht wie beim Neugeborenen und Erwachsenen über die Lunge. Allein diese banale Feststellung führt zu Unterschieden in den physiologischen und anatomischen Voraussetzungen an die Gegebenheiten des kardiopulmonalen Systems. Das arterialisierte (sauerstoffreiche und kohlenstoffdioxidarme) Nabelvenenblut des Feten strömt von der Plazenta über den Ductus venosus der Leber in die V. Cava inferior. Die Strömungsverhältnisse im Herzen sind in utero anders als nach Geburt. Ursache dafür sind zum einen Kurzschlussverbindungen zwischen beiden Vorhöfen - Foramen ovale – und zwischen Pulmonalarterienhauptstamm und Aorta – der Ductus arteriosus. Andererseits herrscht intrauterin im Vergleich zu extrauterin ein erhöhter Strömungswiderstand im

Einleitung

pulmonalen Gefäßbett. Der erhöhte Widerstand bedingt in der Folge einen Druckgradienten vom rechten zum linken Herzen. Dies führt dazu, dass über den rechten Vorhof, in dem ein höherer Druck herrscht als im linken, das Blut über das Foramen ovale direkt in den linken Vorhof und von hier über den linken Ventrikel in den systemischen Kreislauf gelangt. Venöses Blut aus der oberen Körperhälfte samt Gehirn gelangt über die obere Hohlvene in den rechten Vorhof und von hier aus zum Großteil in den rechten Ventrikel (ein kleiner Teil gelangt durch das Foramen ovale erneut in den linken Vorhof). Der rechte Ventrikel treibt das Blut gegen einen hohen Widerstand aus, das Blut fließt nun gemäß dem Ohm'schen Gesetz den Weg des kleinsten Widerstands zum Großteil über den Ductus arteriosus in die Aorta und damit in den systemischen Kreislauf und nur zu einem geringen Teil in den Lungenkreislauf und danach zurück über die Lungenvenen in den linken Ventrikel. Bedingt also durch den hohen Widerstand im pulmonalen Gefäßbett wird die Lunge nur gering (ca. 10 % des Herzminutenvolumens) durchblutet und der Druck im rechten Ventrikel, sowie im rechten Vorhof übersteigen den des linken Herzens. Diese Druckverhältnisse bestimmen in der Folge die Strömungsverhältnisse im Herzen (Heymann, 1999; Rudolph, 1985).

Während der Geburt finden eine Reihe von komplexen Umstellungsprozessen im kardiorespiratorischen System statt, die es ermöglichen, den Organismus des Neugeborenen ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Höhepunkt dieses Umstellungsprozesses stellen die ersten Atemzüge dar, die den Beginn des postnatalen Lebens markieren. Während der ersten Atemzüge muss die Lunge sich ausreichend entfalten, das Lungenwasser, das *in utero* die Atemwege ausfüllt, resorbiert und durch Luft ersetzt werden, die Lungendurchblutung ausreichend gesteigert und dazu die Strömungsrichtung im Herzen und den großen Gefäßen völlig umgestellt werden. Dies sind keine voneinander unabhängig ablaufenden Einzelprozesse, sondern ein interdependentes Geschehen. Kritisch für die normale Lungenentfaltung bei Geburt ist ein ausreichender Gehalt der Lungen an Surfactant (s.u.), der die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Lungen herabsetzt. Zu den Mechanismen, die bei der Absorption des fetalen Lungenwassers eine Rolle spielen, zählen nach einer neueren Arbeit von Hooper *et al.* der hohe transpulmonale Druck, der bei den ersten tiefen inspiratorischen Atembewegungen herrscht und wohl die treibende Kraft für die Lungenwasserabsorption aus den Atemwegen in das Lungeninterstitium darstellt

Einleitung

(Hooper *et al.*, 2007). Daneben spielen auch hormoninduzierte Na^+ -abhängige sekundär-aktive Transportprozesse des Alveolar- und Bronchial-Epithels bei der Absorption eine Rolle (Barker *et al.*, 2002; Folkesson *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2006; Olver *et al.*, 2004). Unter dem synergistischen hormonellen Einfluss von Cortisol und Trijodthyronin (T_3) gegen Ende der Schwangerschaft kommt es zu einer Umstellung des primär Lungenwasser sezernierenden auf ein absorbierendes Epithel, die Absorption wird dabei (experimentell) durch β_2 -Agonisten wie Adrenalin und Isoproterenol vermittelt (Barker *et al.*, 1990; Walters *et al.*, 1978). Der Absorptionsprozess ist Na^+ -abhängig. Amilorid, ein Blocker epithelialer Na^+ -Kanäle antagonisiert die Adrenalin-induzierte Resorption des Lungenwassers (Olver *et al.*, 1986). Darüber hinaus sind transgene Mäuse, denen die Alpha-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals fehlt (α -ENaC-defiziente Mäuse), nicht in der Lage das Lungenwasser zu absorbieren und versterben nach der Geburt (Hummler *et al.*, 1996).

Mit der Entfaltung und Belüftung der Lunge sinkt der pulmonalvaskuläre Widerstand, der Druck im rechten Herzen fällt unter den im linken. Die Veränderungen in den Druckverhältnissen sowie der mit der Geburt einhergehende Verschluss des Ductus arteriosus und des Foramen ovale bewirken eine Veränderung der Strömungsrichtung im Herzen zu den adulten Verhältnissen.

1.2.3. Die Rolle des Surfactant für die Lungenfunktion

Das Epithel der terminalen respiratorischen Einheiten wird von einer oberflächenaktiven Substanz („surface active agent“ = Surfactant) bedeckt, die für die Funktion der Lunge unmittelbar nach der Geburt und das ganze Leben hinfort unverzichtbar ist (Possmayer *et al.*, 1984). Unreife Lungen frühgeborener Kinder, die vor der 37 Schwangerschaftswoche geboren werden und die mit einem Mangel an Surfactant einhergehen, führen nicht selten zum Atemnotsyndrom des Neugeborenen, englisch „infant respiratory distress syndrome“ (IRDS), eine der häufigsten Erkrankungen frühgeborener Kinder (Verma, 1995).

Surfactant ist eine heterogene Substanz, die sich leichter funktionell als strukturell definieren lässt (Rooney *et al.*, 1994). Man erhält sie durch Zentrifugieren der Flüssigkeit nach bronchoalveolärer Lavage. Bei der Lungendehnung wird eine Kraft zur Überwindung der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze innerhalb jeder

Einleitung

Alveole benötigt. Das Surfactant ist in seinen biologischen Eigenschaften einzigartig: Es hat nicht nur die niedrigste Oberflächenspannung aller biologischen Substanzen und reduziert somit bei Lungendehnung den Kraftaufwand und damit die Atemarbeit, interessanterweise nimmt die Oberflächenspannung ab, wenn die Oberfläche, die es bedeckt kleiner wird (Clements, 1962; Zuo *et al.*, 2007). Dies hat eine fundamentale Bedeutung für die Lungenfunktion: wenn die Oberflächenspannung bei Verkleinerung des Lungenvolumens und damit Verkleinerung der Alveolaroberfläche nicht abnehmen würde, käme es zum Kollaps der Alveolarräume. Der Surfactant verhindert somit das Auftreten von Atelektasen und schafft damit die Bedingung für den Gasaustausch durch das Aufrechterhalten einer ausreichend großen Diffusionsfläche (Clements *et al.*, 1961). Darüber hinaus fördern Lungenbezirke mit hoher Oberflächenspannung und damit geringer Compliance den Übertritt von Flüssigkeit aus dem Interstitium in die Alveolen. Pulmonaler Surfactant reduziert damit das Risiko eines Lungenödems (Crapo, 1993). Neben dieser fundamentalen Bedeutung des Surfactants für die Physiologie der Atemmechanik spielen einzelne Komponenten des Surfactant eine Rolle bei der Vermittlung immunologischer Prozesse des angeborenen Immunsystems gegen diverse Pathogene (Whitsett *et al.*, 2010).

Surfactant besteht zu ca. 90 % aus Lipiden, darunter machen amphiphile Phospholipide wie z.B. Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) den Hauptbestandteil aus. Ungefähr 10 % machen Proteine aus, hiervon bilden Serumproteine einen hohen Bestandteil. Daneben enthält der Surfactant vier spezifische Proteine, die „surfactant-associated proteins“ SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, welche in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals kloniert und charakterisiert wurden (Glasser *et al.*, 1990; Rooney *et al.*, 1994; Whitsett *et al.*, 1985; Whitsett *et al.*, 1995). Diese „surfactant-associated proteins“ sind für viele biologische Eigenschaften des Surfactants von Bedeutung (s.u.). Surfactant wird von Typ-II-Alveolarzellen synthetisiert und sezerniert. Dazu enthalten sie spezialisierte Organellen von 0,2 - 2 µm Durchmesser, die sog. „lamellar bodies“ (LB, deutsch: Lamellarkörper) – Speichervesikel für viele Surfactant-Bestandteile (Schmitz *et al.*, 1991) – die ihren Namen ihrer charakteristischen Struktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen verdanken. Nach der Sekretion der einzelnen Surfactant-Bestandteile kommt es extrazellulär (d.h. intraalveolär) zur strukturellen Organisation des Surfactant (Abbildung 3). Bei dieser Organisation finden sich

Einleitung

charakteristische morphologisch unterschiedliche Erscheinungsformen: Nach Sekretion der Hauptsurfactantbestandteile aus den Lamellarkörpern erscheint der Surfactant zwischen den Zellspalten als gitterartige Struktur, dem so genannten „tubulären Myelin“ (Hearn *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1992). Tubuläres Myelin repräsentiert eine Übergangsform zwischen dem frisch sezernierten Lamellarkörper und dem einschichtigen Surfactant an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht der Alveolen (Gil *et al.*, 1973). Für die intraalveoläre Ausbildung von tubulärem Myelin ist die Anwesenheit von Kalzium notwendig (Dietl *et al.*, 2005). Ein Großteil des sezernierten Surfactant unterliegt einem Prozess des Recycling mit Rezeptor-gesteuerter Wiederaufnahme von Surfactant in Typ-II-Alveolarzellen, Reinternalisation in Lamellarkörper und damit Bereitstellung zur erneuten Freisetzung. Man schätzt, dass 25-95 % des Surfactant auf diese Weise rezirkulieren (Nicholas, 1996; Schmitz *et al.*, 1991). So besitzen Typ-II-Alveolarzellen hoch-affine Rezeptoren für SP-A, das an der Wiederaufnahme von Phospholipiden und folglich dem Recycling von Surfactant beteiligt sein soll (Kuroki *et al.*, 1988; Ryan *et al.*, 1989).

SP-A und SP-D sind oberflächenaktive hydrophile Glykoproteine mit einer molaren Masse von 29-43 kDa und gehören als Untergruppe der Collectine zur C-Typ-Lektin-Superfamilie (Rooney *et al.*, 1994; Whitsett *et al.*, 1985). Sie sind an Entzündungsreaktionen und der Immunabwehr von pathogenen Keimen beteiligt. Sie dienen als Pathogen-assoziierte molekulare Mustererkennungsmoleküle und Signalmoleküle, die mit verschiedenen Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Toll-like receptors, CD 14, Calreticulin etc. interagieren und somit immunologische Prozesse modulieren (Whitsett, 2010). SP-A ist darüber hinaus an der strukturellen Organisation und an der Wiederaufnahme von Surfactant in die Typ-II-Zellen (Surfactant-Recycling) beteiligt (Rooney, 2001). SP-A und SP-D werden konstitutiv und ohne in „lamellar bodies“ gespeichert zu werden, sezerniert.

Einleitung

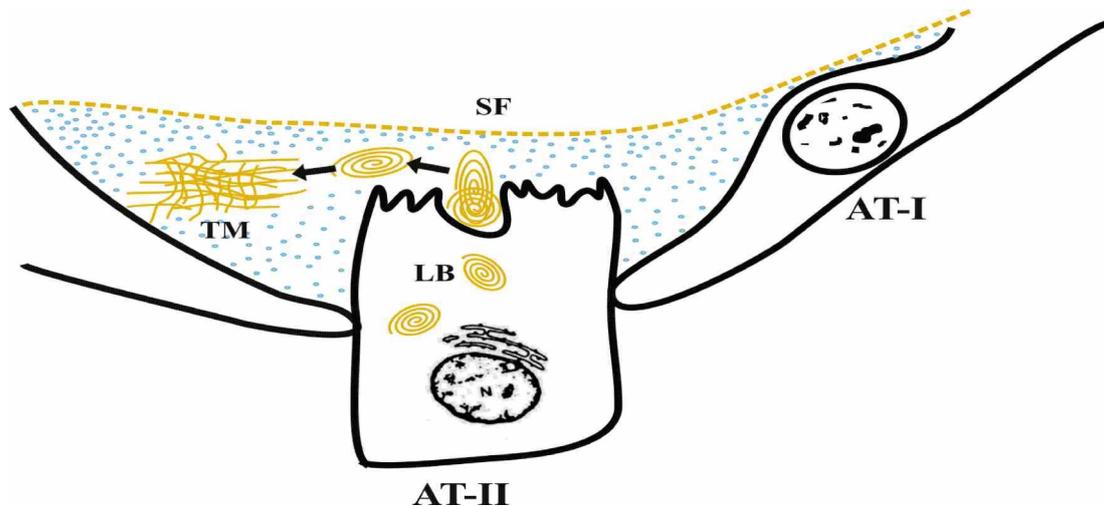


Abbildung 3: Schematische Darstellung der alveolären Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht der Lunge mit den verschiedenen strukturellen Zustandsformen des Surfactant. Das Surfactant (SF) wird in den Typ-II-Alveolarzellen (AT-II) synthetisiert und in „lamellar bodies“ (LB) intrazellulär gespeichert und alveolär sezerniert. Tubuläres Myelin (TM) bildet eine Übergangsform auf dem Weg zur Bildung des einschichtigen Surfactant an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Lungen.

SP-A interagiert in Anwesenheit von alveolärem Kalzium mit SP-B und SP-C und spielt eine Rolle bei der strukturellen Umwandlung der Lamellarkörper in tubuläres Myelin (Hawgood *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1989). SP-A-defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine Hinweise auf eine gestörte Lungenfunktion. Elektronenmikroskopisch imponiert bei ihnen dabei ein Fehlen von tubulärem Myelin (Stahlman *et al.*, 2000).

Das oberflächenaktive SP-B und SP-C dagegen sind hydrophobe Polypeptide mit einer molaren Masse von 5-18 kDa. SP-B ist beteiligt an der Ausbildung von „lamellar bodies“ und der Organisation des Surfactants und dient damit der Reduktion der Oberflächenspannung. SP-B-defiziente Mäuse versterben innerhalb der ersten 20 Minuten nach Geburt an Atemversagen (RDS=respiratory distress syndrome) aufgrund einer deutlich reduzierten Compliance der Lunge (Tokieda *et al.*, 1997). Histologisch sind die Lungen dieser Mäuse kaum entfaltet und elektronenmikroskopisch imponiert ein Fehlen ausgebildeter „lamellar bodies“ (Clark *et al.*, 1995). SP-C dagegen ist ein Transmembranprotein, das ausschließlich von Typ-II-Alveolarzellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu SP-B wird SP-C nicht für die Bildung von „lamellar bodies“ benötigt, obwohl es in ihnen ebenfalls lokalisiert ist. SP-C-defiziente-Mäuse sind lebensfähig, zeigen jedoch eine Einschränkung in der Lungenfunktion. SP-C scheint bei der Organisation und Stabilisierung des Surfactant eine Rolle zu spielen (Glasser *et al.*, 2001).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Bereits die Erstbeschreibung der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mauslinie (Rudolph et al. 1995) lies erkennen, dass nach Verpaarung heterozygoter ($G\alpha_{i2}^{+/-}$) Elterntiere die Genotypenverteilung der Nachkommen nicht nach den Mendel'schen Regeln erfolgte. Die zu erwartende Verteilung wt : heterozygot : knockout war nicht 1:2:1, sondern die Anzahl $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) war vier Wochen nach Geburt signifikant reduziert, während noch am 14. Embryonaltag die Verteilung der Genotypen der nach Mendel zu erwartenden entsprach. Warum es zu einer Abnahme der Frequenz $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse innerhalb des Zeitraumes vom 14. Embryonaltag bis vier Wochen nach Geburt der Mäuse kommt, wurde von den Autoren nicht angegeben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Ursache für die verminderte Überlebensfähigkeit von $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren zu finden. Hierbei sollte die Rolle des $G\alpha_{i2}$ -Subtyps bei der postnatalen Entwicklung der Maus untersucht werden. Zum einen sollte der Phänotyp neonataler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse näher charakterisiert werden. Hinsichtlich des Versterbens der Tiere sollte der Todeszeitraum der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse eingegrenzt und eine Ursache des Versterbens der Mäuse abgeklärt werden.

Über die Bedeutung der Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in verschiedenen Funktionssystemen des Organismus, wie z.B. dem Immunsystem und dem kardiovaskulären System wurden bereits Untersuchungen durchgeführt (s.o.). Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle der inhibitorischen $G\alpha$ -Protein-Untereinheiten für die Lungenfunktion adulter Mäuse untersucht werden, vor dem Hintergrund gemeinsame (= redundante) versus spezifische Funktionen der einzelnen G_i -Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ aufzudecken, da es sich bei diesen beiden um die prädominanten Isoformen im Lungengewebe handelt (persönliche Mitteilung Frau Novakovic, eigene Arbeitsgruppe). Hierzu sollten $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse mithilfe der Apparatur der „Isoliert Perfundierten Lunge (IPL)“ der Maus untersucht und physiologische Parameter der Lungenfunktion bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

2.1.1. Allgemein

Die während der Arbeit zur Herstellung von Lösungen und Puffer verwendeten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe pro Analyse von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), VWR International GmbH (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Das für die Versuche verwendete hochreine Wasser wurde einer Milli-Q[®]-Anlage (Merck Millipore, Darmstadt) entnommen.

Agarose	(Genaxxon BioScience, Ulm)
Albumin bovine Fraction V	(Serva GmbH, Heidelberg)
Borsäure	(Merck KGaA, Darmstadt)
Bleizitrat	(Merck KGaA, Darmstadt)
Cacodylat-Puffer	(Merck KGaA, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe))
Formaldehydlösung	(Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe))
Formvar	(Merck KGaA, Darmstadt)
Gelatine	(Calbiochem GmbH, Schwalbach)
Glutaraldehyd	(Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn)
L-Alanyl-L-Glutamin	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Osmiumtetroxid	(Polyscience Inc., Warrington, USA)
Propylenoxid	(Merck KGaA, Darmstadt)
Proteinase	(Genaxxon BioScience, Ulm)
Thermoklar	(Biomed GmbH, Oberschleißheim)
Tris base	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Material und Methoden

	Taufkirchen)
Triton X-100	(Merck KGaA, Darmstadt)
Tween 20	(Merck KGaA, Darmstadt)
Uranylazetat	(Merck KGaA, Darmstadt)

2.1.2. Reaktionskit

PCR-Kit TopTaq [®] MasterMix Kit	(Qiagen GmbH, Hilden)
-------------------------------------------	-----------------------

2.1.3. Zellkulturmedium

Zellkulturmedium RPMI 1640	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
----------------------------	---------------------------------------------

2.2. Geräte

Binokular	(Zeiss AG, Oberkochen)
Diamantmesser	(Diatome, Zürich, Schweiz)
Druckwandler Differential	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Low Transducer DLP 2.5	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Druckwandler Pressure Transducer P75 Type 379	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Elektronenmikroskop Zeiss EM 10	(Zeiss AG, Oberkochen)
Isolated Perfused Lung Size Type 839	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Kupfernetzträger	(Veco GmbH, Solingen)
Mikrotoms	(Leica GmbH, Bensheim)
Plugsys Ventilation Control Module Type 681	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Plugsys Timer Counter Module Type 686	(Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten)
Pneumotachometer	(Hugo Sachs Elektronik, March

Material und Methoden

	Hugstetten)
Rollerpumpe REGLO Digital	(Ismatec [®] , Wertheim)
Scanner	(Mirax Desk, Zeiss AG, Oberkochen)
Schlitzträger	(Veco GmbH, Solingen)
Thermocycler Mastercycler gradient	(Eppendorf AG, Hamburg)
Thermostat Lauda Ecoline E100	(Lauda GmbH, Lauda-Königshofen)
Ultramikrotom Ultracut R	(Leica GmbH, Bensheim)
Waage	Precisa 40 SM-200A, Dietikon, Schweiz)
Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop	(Zeiss AG, Oberkochen)

2.3. Verbrauchsmaterial

Deckgläser	(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
Eppendorfgefäß	(Eppendorf AG, Hamburg)
Filterpapier MN 615 ¹ / ₄	(Machery-Nagel GmbH, Düren)
Pipettenspitzen	(Eppendorf AG, Hamburg)
Objektträger	(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
Spritzen	(Braun Melsungen AG, Melsungen)

2.4. Wirkstoffe

Pentobarbital	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Heparin	(Ratiopharm GmbH, Ulm)
Pertussistoxin	(Merck KGaA, Darmstadt)

2.5. Maushaltung

Sowohl Wildtyp wie auch genetisch veränderte Mauslinien wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen des Regierungspräsidiums Tübingen in Standardhaltung unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen in ventilierten Käfigen (IVC, individually ventilated cages) unter einem künstlichen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in den Tierversuchslaboratorien des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen gehalten (Wiege *et al.*, 2012, 2013). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Tierexperimentelle Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (Tierschutzanzeige vom 21.01.2010, vom 20.09.2010 und 18.11.2010).

2.6. Generierung $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse

$G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Lutz Birnbaumer generiert. Die Inaktivierung des $G\alpha_{i2}$ -/ $G\alpha_{i3}$ -Allels geschah durch embryonale Stammzelltechnik (Gohla *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995). Rückkreuzung auf einen „reinen“ C57/Bl6-Hintergrund erfolgte für mindestens 10 Generationen und ergab die in dieser Arbeit verwendete kongene $G\alpha_{i2}$ -knock-out Linie. Die analysierten $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse und Wildtyp-Mäuse stammten aus Knockout- bzw. Wildtypinzuchtverpaarungen (Wiege *et al.* 2013).

Alle Versuche erfolgten mit Mäusen, die aus Verpaarungen homozygot $G\alpha_{i2}$ -defizienter ($G\alpha_{i2}^{-/-}$ x $G\alpha_{i2}^{-/-}$) und Wildtyp-Mäusen ($G\alpha_{i2}^{+/+}$ x $G\alpha_{i2}^{+/+}$) stammten. Für die Untersuchung der Lungenfunktion Pertussistoxin-behandelter Mäuse wurden Mäuse der Rasse C57/Bl6 der Charles River Laboratories verwendet. Es wurde darauf geachtet, Tiere gleichen Alters in Gruppen zu charakterisieren.

2.7. Behandlung von Mäusen mit Pertussistoxin

Pertussistoxin ADP-ribosyliert spezifisch $G\alpha_i$ -Untereinheiten und verhindert dadurch die Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, was zu einer Entkopplung und

Material und Methoden

Inaktivierung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege führt (vgl. 1.1.2). Durch die Behandlung von Versuchsmäusen mit Pertussistoxin (Ptx) war es möglich die (akuten) Auswirkungen der Inaktivierung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege zu untersuchen. Dazu wurden Versuchsmäusen 48 Stunden vor Versuchsbeginn intraperitoneal Pertussistoxin (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) appliziert. Als Kontrollen dienten Mäuse, denen 48 Stunden vor Versuchsbeginn die äquivalente Menge an 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert wurden.

2.8. Genotypisierung der $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse

2.8.1. Isolation genomischer DNA

Die Mäuse wurden im Alter von etwa 4 Wochen nach Geschlechtern getrennt und durch eine Stanzmarke am Ohr markiert. Die Genotypisierung erfolgte aus Ohrstanzen (adulte Tiere) bzw. einer ca. 2 mm langen Schwanzbiopsie (Neugeborene und Mäusefeten), die bis zur Verwendung in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei -20°C in einem Gefrierschrank gelagert wurde. Um die DNA zu isolieren wurden die Ohrstanzen/Schwanzspitzen über Nacht bei 55°C in 100 μl Lyse-Puffer inkubiert, bei 95°C für 15 min inaktiviert und das Lysat für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt. Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde pro Ansatz 1 μl der DNA-Lösung eingesetzt.

Lyse Puffer:

500 mM KCl

100 mM Tris-Puffer, pH 8,3

0,1 mg/ml Gelatine

1 % (V/V) Triton X-100

1 % (V/V) Tween 20

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K

Material und Methoden

2.8.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte mithilfe der PCR. Dazu wurden Primer (Biomers) verwendet, die für $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse bzw. Wildtyp Mäuse spezifisch sind. Die lyophilisierten Primer wurden in H_2O resuspendiert, um eine Stocklösung von $100 \mu M$ zu bekommen.

Primer	Sequenz
$G\alpha_{i2}$-WT-1	GAT CAT CCA TGA AGA TGG CTA CTC AGA AG
$G\alpha_{i2}$-WT-2	CCC CTC TCA CTC TTG ATT TCC TAC TGA CAC
$G\alpha_{i2}$-KO-1	CAG GAT CAT CCA TGA AGA TGG CTA C
$G\alpha_{i2}$-KO-2	GCA CTC AAA CCG AGG ACT TAC AGA AC
$G\alpha_{i3}$-WT-1	GTG GCC AAA GAT CCG AAC GAA
$G\alpha_{i3}$-1	TTC ATG CTT TCA TGC ATT CGG TTC
$G\alpha_{i3}$-KO-1	TGC CGA GAA AGT ATC CAT CAT

Primer **$G\alpha_{i2}$ -WT-1** und Primer **$G\alpha_{i2}$ -WT-2** amplifizieren ein $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp-Allel von 805 bp.

Primer **$G\alpha_{i2}$ -KO-1** und Primer **$G\alpha_{i2}$ -KO-2** amplifizieren ein $G\alpha_{i2}$ -KO-Allel von 509 bp.

Primer **$G\alpha_{i3}$ -WT-1** und Primer **$G\alpha_{i3}$ -1** amplifizieren ein $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp-Allel von 500 bp.

Primer **$G\alpha_{i3}$ -KO-1** und Primer **$G\alpha_{i3}$ -1** amplifizieren ein $G\alpha_{i3}$ -KO-Allel von 850 bp.

Für die PCR wurde das TopTaq MasterMix Kit verwendet. Der im Kit enthaltene „Master Mix“ besteht aus einem Gemisch von TopTaq Polymerase, PCR-Puffer, dNTPs sowie $MgCl_2$.

Pro Reaktionsansatz wurden nach Herstellerprotokoll

12,5 μl Master Mix

0,5 μl Primer sense ($10 \mu M$)

0,5 μl Primer antisense ($10 \mu M$)

10,5 μl Wasser (DNase-, RNase frei)

Material und Methoden

in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Zu 24 µl dieses Ansatzes wurde 1µl DNA-Lösung hinzugefügt. Die PCR erfolgte durch einen Thermocycler mit folgendem Programm:

	Gα _{i2}		Gα _{i3}	
1. Initiale Denaturierung	94 ° C	3 min	95 ° C	15 min
2. Amplifikation (32 Zyklen)				
Denaturierung	94 ° C	30 sec	94 ° C	30 sec
Primerhybridisierung	60 ° C	30 sec	60 ° C	90 sec
Elongation	72 ° C	1 min	72 ° C	90 sec
3. Finale Elongation	72 ° C	10 min	72 ° C	10 min

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %-iges Agarose-Gel aufgetragen und anhand ihrer Größen elektrophoretisch (130 V, ca. 60 min) aufgetrennt. Um die Fragmentgrößen einordnen zu können wurde ein DNA-Größenstandard (100 bp – 1 kb) mit aufgetragen. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese mithilfe einer UV-Lampe detektiert werden.

Gel 1,5 % Agarose:

- 1,2 g Agarose
- 8,0 ml TBE-Puffer (10fach konzentriert)
- 72 ml destilliertes Wasser
- 1 µl Ethidiumbromid

TBE-Puffer:

- Tris base 89 mM
- Borsäure 89 mM
- NaEDTA x H₂O 2 mM

2.9. Untersuchung von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung

2.9.1. Zeitlich festgelegte Schwangerschaften und Entnahme der Mausfeten

Für die Untersuchung der Mausfeten zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung wurden Zuchtpaare des zu untersuchenden Stammes über Nacht verpaart, am nächsten Morgen getrennt und dieser Tag als erster Embryonaltag (e 0,5) einer potenziellen Schwangerschaft angenommen. Am 14. darauffolgenden Tag (e 14,5) wurde das Weibchen sowohl optisch als auch in Zweifelsfällen durch die dokumentierte Gewichtszunahme um mehr als 2 g im Vergleich zum Ausgangsgewicht auf Trächtigkeit geprüft. Für Versuchszwecke wurden die Feten an den entsprechenden Embryonaltagen per Kaiserschnitt entnommen. Dazu wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus samt den Feten entfernt. Die Tiere wurden sodann aus dem Uterus frei präpariert. Die Feten der Embryonaltage e 15,5 und e 17,5 wurden daraufhin mittels zervikaler Dislokation getötet und für die histologische Untersuchung in 4 %iger Formaldehydlösung für mehrere Tage fixiert.

2.9.2. Überlebensfähigkeit, Somato- und Organometrie der neonatalen Mäuse

Zur Ermittlung der Überlebensfähigkeit der neugeborenen Mäuse wurde der spontane Geburtsvorgang der Feten am Tag e 19,5 abgewartet und dann die noch nicht geborenen Feten *in utero* nach zervikaler Dislokation des Muttertieres per Kaiserschnitt entbunden. Die neugeborenen Mäuse wurden mit Papiertüchern vorsichtig abgetrocknet und unter einer Wärmelampe für drei Stunden beobachtet. Mäuse, die innerhalb dieses Zeitraums nicht spontan verstarben, wurden durch zervikale Dislokation getötet.

Mithilfe einer Schiebelehre wurde die Scheitel-Steiß-Länge der neugeborenen frisch verstorbenen Mäuse bestimmt. Zur Feststellung des Gewichts wurden die neugeborenen Mäuse in einer Wägeschale auf einer Waage gewogen. Zur Gewichtsbestimmung der einzelnen Organe Herz, Lunge, Leber und Niere wurden Thorax und Abdomen der per Exsanguination getöteten Tiere eröffnet und die einzelnen Organe vorsichtig frei präpariert und in einer Wägeschale gewogen.

2.9.3. Entnahme von Lungengewebe

Für die histologische Untersuchung der Lungen wurde der linke Lungenlappen vom linken Hauptbronchus getrennt und in 4 %iger Formaldehydlösung für mehrere Tage fixiert. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde der rechte Oberlappen der Lungen in 2,5 % Glutaraldehyd gepuffert in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und danach bei 4° C in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) bis zur Einbettung gelagert.

2.10. Histologie

2.10.1. Paraffin-Einbettung

Das in Formaldehydlösung fixierte Gewebe wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Quintanilla-Fend, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen, über eine aufsteigende Alkoholreihe mit abschließender Durchtränkung in Xylol entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträgern aufgezogen. Die Paraffinschnitte wurden 24 Stunden bei 37° C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.10.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol für 15 Minuten entparaffiniert und in Ethanol rehydriert (zweimal 100 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol, zweimal 70 % Ethanol, destilliertem Wasser, jeweils für eine Minute). Für die anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde folgendes Protokoll verwendet:

- | | | |
|----|---------------------------------|--------|
| 1. | Hämatoxylin | 4 min |
| 2. | Warmes Leitungswasser | 10 min |
| 3. | Spülen mit destilliertem Wasser | |
| 4. | Eosin | 2 min |
| 5. | kurz spülen mit 70 % Ethanol | |
| 6. | kurz spülen mit 96 % Ethanol | |

Material und Methoden

7.	100 % Ethanol	2x 2 min
8.	Xylol	3x 5 min

2.10.3. Histomorphometrische Auswertung

Die 5 µm dünnen Hämatoxylin-Eosin-(HE)-gefärbten Lungenschnitte wurden mit dem Scanner (Mirax Desk) optisch erfasst und digitalisiert. Mithilfe des Softwaremoduls MIRAX Viewer (Zeiss AG, Oberkochen) wurden entsprechende Bilddateien repräsentativer peripherer Lungenausschnitte für die weitere Auswertung erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die auszuwertenden Lungenabschnitte keine Bronchien enthielten sondern ausschließlich die kleineren Luftwege und terminalen Endaussackungen, die zusammenfassend hier als primitive Alveolarfläche bezeichnet werden sollen. Die morphometrische Auswertung der HE-gefärbten Lungenpräparate erfolgte mithilfe der Softwareprogramme Photoshop (Adobe) und ImageJ. Dabei wurden Bilddateien peripherer Lungenabschnitte mittels ImageJ in ein 8-bit-Format (schwarz-weiß) umgewandelt. Mithilfe der Option *->Adjust ->Threshold* wurde die Grenze auf 215 angepasst. Nun konnte mithilfe der Arbeitsschritte *->Analyze ->Measure* das Flächenverhältnis von Alveole (weiß) zu Mesenchym (schwarz) berechnet werden. Für die Bestimmung des Flächenverhältnisses von Alveolarfläche bzw. mesenchymalen Flächenanteils zur Gesamtfläche des Lungengewebes wurden 6-10 periphere Lungenausschnitte derselben Vergrößerungsstufe pro Tier in die Auswertung einbezogen.

2.11. Elektronenmikroskopie

Die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Wolburg, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen.

2.11.1. Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Die Gewebeproben wurden aus dem rechten Lungenflügel der Mäuse herauspräpariert und mit 2,5 %igem Glutaraldehyd, gepuffert in 0,1 M Cacodylatpuffer für vier Stunden fixiert. Anschließend wurde das Glutaraldehyd gegen reinen Cacodylatpuffer

ausgetauscht und ins Institut für Pathologie transportiert. Hier wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt aufbewahrt.

Unter einem Binokular wurden die Gewebeproben in 1-2 mm³ große Blöckchen zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 1 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer für zwei Stunden nachfixiert und kontrastiert. Anschließend wurde zweimal für 10 bis 15 Minuten mit Cacodylatpuffer gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte durch Inkubation mit 3 % Uranylazetat in 70 %igem Alkohol über Nacht. Danach wurden die Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe und in Propylenoxid entwässert und in Araldit eingebettet. Dies erfolgte in mehreren Schritten über Araldit-Propylenoxid-Mischungen von 1:3, 1:1, und 3:1, schließlich über Nacht in reinem Araldit. Schließlich wurden die Gewebeproben mit frischem Araldit in Flacheinbettungsformen eingelegt und ausgerichtet. Die Polymerisation fand bei 60° C im Wärmeschrank über 30 bis 48 Stunden statt. Semidünnschnitte (0,2-0,5 µm) wurden mit Glasmessern an einem Ultramikrotom, Ultradünnschnitte (50 nm) mit einem Diamantmesser angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit Formvar beschichtete Kupfernetz- oder -Schlitzträger aufgezogen, getrocknet und mit Bleizitrat für fünf Minuten kontrastiert. Zur Auswertung wurden die Schnitte an einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert. Die Bilder wurden anschließend mit 600 dpi eingescannt und mit Adobe Photoshop (Adobe) weiter verarbeitet.

2.12. Isoliert perfundierte Lunge der Maus.

2.12.1. Apparatur der isoliert perfundierten Lunge

Zur Bestimmung physiologischer Parameter der Lunge, wie Atemzugvolumen (T_V), dynamischer Compliance (C) und Atemwegswiderstand (R) sowie des pulmonal-arteriellen Druckes (PAP) wurde die Apparatur Isolated Perfused Lung Size 1 (IL-1) Type 839 verwendet (Mays *et al.*, 2013). Die *in situ*-Methode wurde 2010 in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Ammon-Treiber am Institut für Pharmakologie und Experimentelle Therapie der Universität Tübingen entsprechend der Beschreibungen von Prof. Dr. Uhlig, Aachen (Uhlig, 1998) in unserer Abteilung etabliert. Die Methode soll im Folgenden zusammenfassend beschrieben werden:

Material und Methoden

Die Apparatur (Abbildung 4) besteht aus einer Kammer, deren Größe so bemessen ist, dass eine ausgewachsene Maus darin fixiert und präpariert werden kann. Die Kammer sowie der passende luftdicht abschließende Deckel sind aus Plexiglas und ummanteln, hochreines, entmineralisiertes Wasser, das von einem Thermostat auf 37° C erwärmt wird und in der Kammer zirkuliert. Diese Konstruktion dient dem Zweck, die isoliert perfundierte Lunge im physiologischen Temperaturbereich zu halten.

Vor und nach jedem Experiment wurde die Apparatur für ca. eine Stunde mit hochreinem Wasser durchgespült. Dem Wasser im Thermostat-Kreislauf wurde Thermoklar, ein Zusatz zur Verhinderung von Algenwachstum, beigefügt und im Abstand von vier Wochen ausgetauscht.

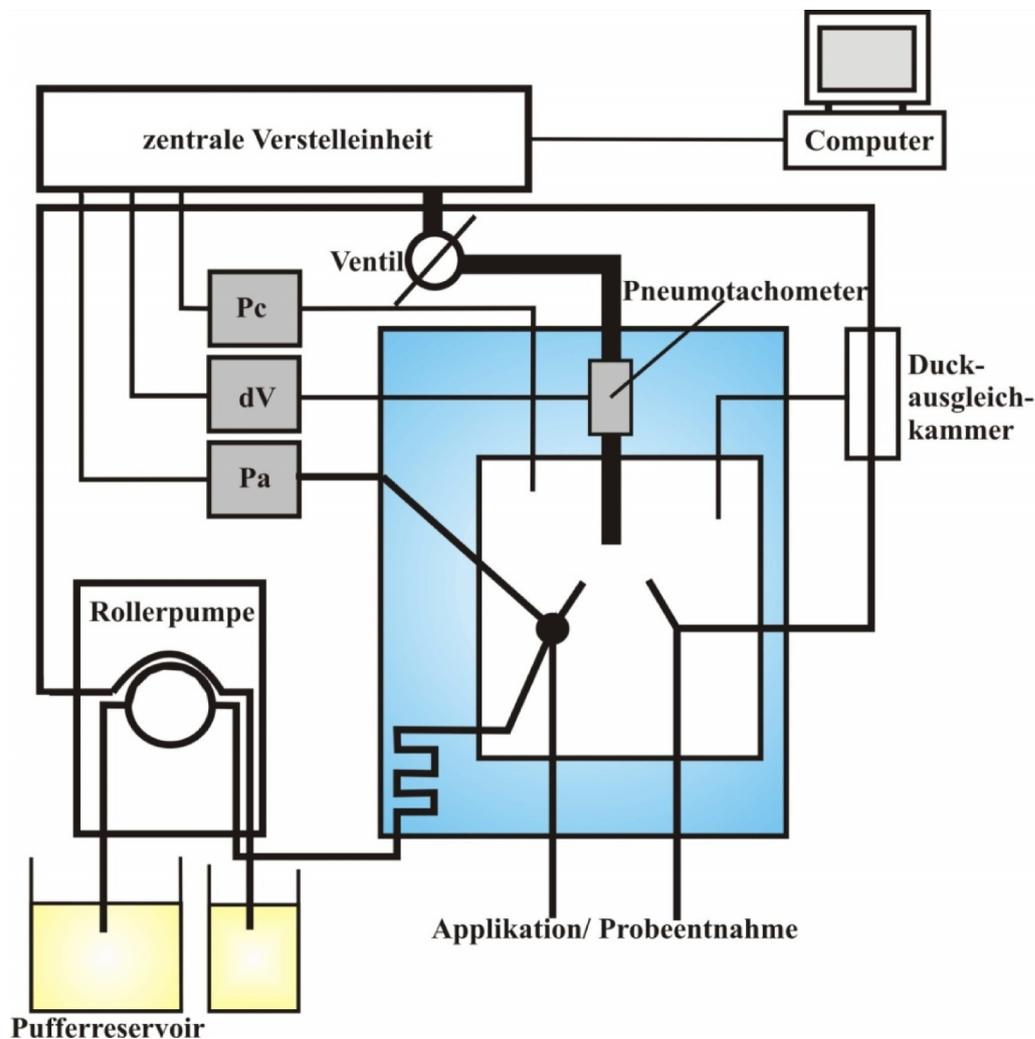


Abbildung 4: Apparatur der isoliert perfundierten Lunge. Beschreibung siehe Text. Abkürzungen: Pc = Kammerdruck; dV = Flussgeschwindigkeit; Pa = Perfusionsdruck. Abbildung modifiziert nach Uhlig (Uhlig, 1998).

2.12.3. Ventilation

Die Ventilation der Lunge konnte sowohl bei Über- als auch in Unterdruckbeatmung durchgeführt werden. Während der Präparation der Maus, bei der die Kammer offen war, wurde die Maus mit einem auf die Atmosphäre bezogenen positiven Atemwegsdruck beatmet, in der Messphase - bei geschlossener Kammer - wurde mithilfe eines Ventils der Modus der Beatmung so umgestellt, dass in der Kammer ein auf die Atmosphäre bezogener negativer Druck entsteht. Die Steuerung der Ventilation erfolgte durch ein Ventilation Control Module mit integrierter Luftdruckpumpe.

Der negative Kammerdruck während der experimentellen Phase spiegelt dabei den negativen intrapleurale Druck bei Spontanatmung von Maus und Mensch wider, ahmt also *in-vivo*-Bedingungen nach. Die für die Versuche vorgegebenen endinspiratorischen und -expiratorischen Drücke (Kammerdruck am Ende der Ein- bzw. Ausatmung) wurden vorab eingestellt (-8,5 cm H₂O bzw. -3,0 cm H₂O), die Atemfrequenz auf 90/min und der Anteil der Inspiration an der Gesamtdauer eines Atemzyklus auf 50 % eingestellt und während der gesamten Versuchsdauer konstant gehalten. Um dem Auftreten von Mikroatelektasen bei ruhiger Atmung entgegen zu wirken, treten bei Mensch und Tier alle 5 bis 20 Minuten unwillkürliche tiefe Atemseufzer auf. Auch bei der isoliert perfundierten Lunge ist zu diesem Zweck ein Modul am VCM installiert, das Plugsys Timer Counter ModuleType 686, das automatisch tiefe Atemzüge (in diesem Fall mit endinspiratorischen Drücken von -25 cm H₂O; im Intervall von 5 Minuten) durchführt. Die Atemluft wird durch eine Fritte angefeuchtet und bei ihrer Passage zur Trachea erwärmt. Die Fritte sowie ein Pneumotachometer zur Messung des Atemflusses, waren direkt proximal der Trachealkanüle angebracht. Das Pneumotachometer war dazu mit einem Druckwandler verbunden.

2.12.4. Perfusion

Die Perfusion der Lungen erfolgte bei konstantem Fluss von 1 ml/min nicht-rezirkulierend, d.h. das Effluat wurde aufgefangen und dem Kreislauf nicht erneut zur Verfügung gestellt. Die Flussrate wurde an einer Rollerpumpe eingestellt. Ein Tygenschlauch (0,89 mm Innendurchmesser) führte das Perfusionsmedium von der Rollerpumpe zu einem Wärmeaustauscher, der in der Plexiglaskammer integriert war. Vor der Mündung in den pulmonalerteriellen Katheter befand sich eine Blasenfalle,

Material und Methoden

über die im Perfusat befindliche Luftblasen mittels Spritze angesaugt werden konnten, wodurch das Auftreten von Luftembolien in der Lunge vermieden wurde. Mit dem pulmonalarteriellen Katheter waren neben dem Perfusat zuführenden Schlauch zwei weitere Zugänge verbunden, ein Tygonschlauch (0,25 mm Innendurchmesser) für die Applikation von Wirkstoffen und ein Silikonschlauch (1,2 mm Innendurchmesser), der zu einem Druckwandler (Pressure Transducer P75 Type 379) zur Messung des pulmonalarteriellen Perfusionsdruck führte. Proben des Perfusates konnten am venösen Katheter über einen Tygonschlauch (0,25 mm Innendurchmesser) und einer damit verbundenen Spritze entnommen werden. Nachdem das Effluat die Kammer verließ wurde es in eine Druckausgleichskammer geleitet, die in Verbindung zur Beatmungskammer stand. Diese Konstruktion sollte möglichst physiologische Bedingungen schaffen, indem sie den venösen Druck an den Kammerdruck und damit den intrapleurale Druck anglich (Culver *et al.* 1980).

2.12.5. Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet, dem zum Versuchszweck 1 % L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM), 4 % Albumin und zur Steigerung der Osmolarität der Lösung 0,12 % NaCl hinzugefügt wurden. Nach Hinzufügen aller Bestandteile wurde die Lösung für die Perfusion im Wasserbad auf 37° C erwärmt und gefiltert.

2.12.6. Präparation der Mäuse

Vor der Präparation der Mäuse wurden diese mit einer letalen Dosis von 120 mg/kg KG Pentobarbital durch intraperitoneale Applikation betäubt. Mit der Präparation wurde begonnen, sobald die Tiere keine Schmerzreflexe nach Kompression der Pfoten mit einer Pinzette mehr zeigten. Hierzu wurde die Haut über Abdomen, Thorax und Hals durch eine Inzision eröffnet. Die Trachea wurde mit Pinzetten stumpf freipräpariert und mit Hilfe einer kleinen Federschere inzidiert und über die Inzision mit einer eingebrachten Kanüle intubiert. Das proximale Ende der Trachealkanüle wurde an die Apparatur angeschlossen und die Maus während der weiteren Präparation mit einer Atemfrequenz von 90/min bei positivem Druck beatmet.

Material und Methoden

Als nächstes wurde das Abdomen eröffnet und das Zwerchfell vorsichtig reseziert. Mithilfe einer Kanüle wurden 500 IE/100 g Körpergewicht Heparin in den rechten Ventrikel des Herzens gespritzt und die Maus nach 30 Sekunden mittels Durchtrennung der Nierengefäße ausgeblutet. Daraufhin wurde subphrenisch die untere Körperhälfte der Maus abgesetzt. Der Thorax wurde eröffnet und die beiden Thoraxhälften fixiert, der Thymus wurde entfernt.

Es erfolgte eine kleine Inzision am rechten Ventrikel sowie eine zweite tiefere am linken Ventrikel. Die pulmonalarterielle Kanüle wurde über den rechten Ventrikel in die A. pulmonalis vorsichtig eingeführt und mit einer vorbereiteten Ligatur fest fixiert. Als nächstes wurde die venöse Kanüle über den linken Ventrikel vorsichtig in den linken Vorhof geführt bis das Perfusat venös drainiert wurde. Der Kammerdeckel wurde luftdicht verschlossen und die Beatmung am 3-Wegehahn auf Unterdruckbeatmung umgestellt.

2.12.7. Messung und Aufzeichnung der Daten

Der pulmonalarterielle Perfusionsdruck wurde kontinuierlich über einen Druckwandler gemessen und aufgezeichnet. Vor jedem Experiment wurde der Druckwandler auf den Umgebungsdruck kalibriert.

Alle Daten wurden verstärkt und durch die Software PulmoDyn (Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten) an einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet und ausgewertet. Die Bestimmung des Atemzugvolumen (TV) wurde durch Integration der Atemflussgeschwindigkeit $I = \frac{\Delta V}{\Delta t}$ über einen Atemzyklus von der Atemruhelage V_{Residual} bis zum endinspiratorischen Volumen V_{TV} bestimmt. Die Bestimmung von dynamischer Compliance C und dynamischer Resistance R erfolgte nach der Formel:

$$P = \frac{1}{C} * V + R * \frac{\Delta V}{\Delta t}$$

Für die Berechnung der dynamischen Compliance (C) ermittelt PulmoDyn bei den Nullwerten der Flussignale ($I = \frac{\Delta V}{\Delta t} = 0$) die korrespondierenden Werte des Atemzugvolumens V und des und des Pleuradruckes P und errechnet entsprechend C .

Material und Methoden

Für die Berechnung des Atemwegswiderstands (R) ermittelt PulmoDyn bei 70 % der Amplitude von V_{TV} die korrespondierenden Werte für den Pleuradruck P und den pulmonalen Luftstrom $I = \frac{\Delta V}{\Delta t}$ und errechnet entsprechend R (Uhlig, 1998).

2.13. Auswertung und Darstellung der Daten

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Exel 2007 (Microsoft) und Prism (GraphPad). In dieser Arbeit wurden ausschließlich jeweils zwei Gruppen verglichen, es kam der Student t-Test für unverbundene Gruppen zur Anwendung. Für alle statistischen Tests galt als Signifikanzniveau ein p-Wert von $p < 0,05$.

Die in der Arbeit verwendeten Graphiken der erhobenen Daten wurden mithilfe der Programme Exel (Microsoft) erstellt und mit Corel Draw (Corel) bearbeitet. Abbildungen von Lungenschnitten wurden mit Hilfe von MIRAX Viewer (Zeiss AG, Oberkochen) erstellt und mit Photoshop (Adobe) und Corel Draw (Corel) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung $G\alpha_i$ -defizienter Mäuse

Um die in den Versuchen untersuchten Mäuse zuordnen zu können, wurden die Mäuse genotypisiert. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte im Alter von etwa vier Wochen anhand der DNA aus einer Ohrstanze sowie bei neugeborenen oder fetalen Mäusen aus einer ca. 2 mm langen Schwanzbiopsie. Die DNA wurde mithilfe der PCR-Technik aufgearbeitet und auf 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Das $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp-Allel ergab die erwartete Bande bei 805 bp. Das deletierte $G\alpha_{i2}$ -KO-Allel zeigte die erwartete Bande bei 509 bp (Abbildung 5). Entsprechend ergab das $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp-Allel die erwartete Bande bei 500 bp, das $G\alpha_{i3}$ -KO-Allel bei 850 bp.

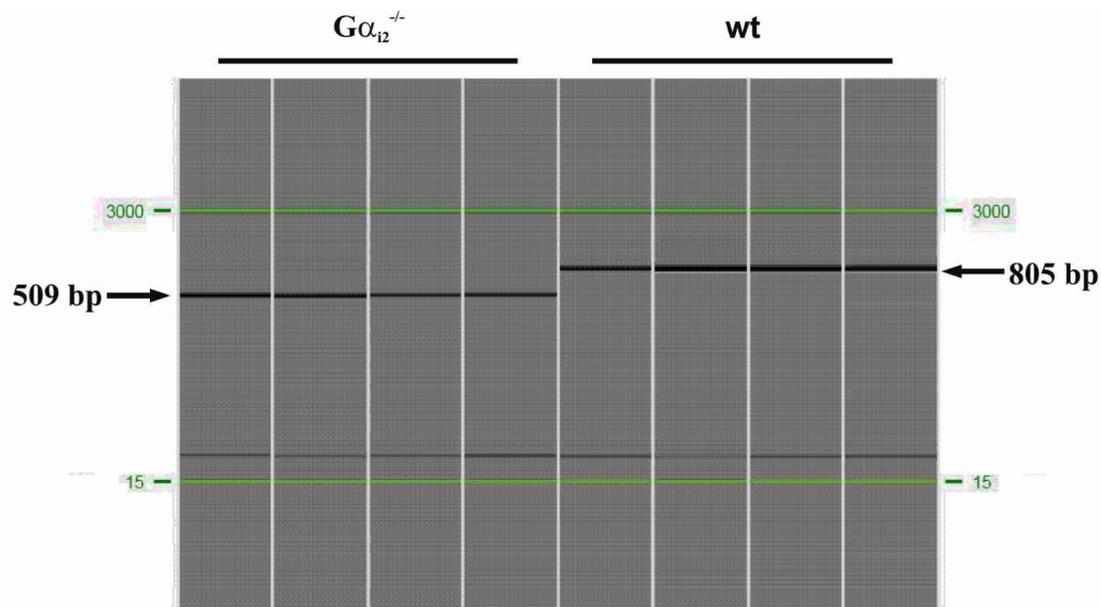


Abbildung 5: Genotypisierungs-PCR gereinigter DNA aus Schwanzbiopsien von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ - und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ - (wt) Mäusen. Das $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Allel zeigt die erwartete Bande bei 805 bp (rechts), das deletierte $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Allel zeigt die erwartete Bande bei 509 bp (links).

Ergebnisse

3.2. Charakterisierung neonataler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

3.2.1. Überleben und Eingrenzung des Todeszeitpunkts

Befunde der eigenen Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Universität Düsseldorf legten nahe, dass etwa die Hälfte der $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse zwischen embryonalem Tag 18 und postnatalem Tag 5 bis 10 versterben (Tabelle 3). Die genetische Verteilung von Mäusefeten an den Tagen e 14 und e 18 der Embryonalentwicklung, die aus Verpaarungen $G\alpha_{i2}$ -heterozygoter ($G\alpha_{i2}^{+/-}$) Zuchtpaare stammten, entsprach etwa der nach der Mendel'schen Regel zu erwartenden Verteilung (1:2:1). Um den fünften bis zehnten postnatalen Tag zeigte sich jedoch eine deutlich reduzierte Anzahl lebender $G\alpha_{i2}$ -defizienter Tiere. Ihr Anteil sank auf 11 % von insgesamt 509 untersuchten Tieren und blieb bis zum 21. postnatalen Tag konstant (ca. 10 % von 1174 untersuchten Tieren). Dabei zeigte sich die Reduktion $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse in der genetischen Verteilung unabhängig vom genetischen Hintergrund sowohl bei C57/Bl6- als auch bei Sv129-Mäusen.

Tabelle 3: Genetische Verteilung (Mendel) von Embryonen und Mäusen $G\alpha_{i2}$ -heterozygoter Verpaarungen (Daten von von Katja Pexa, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II Düsseldorf). Postnatal (p 21) zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der Mendelfrequenz.

E: Stadium der Embryonalentwicklung in Tagen

P: Postnatales Alter

%: Prozentsatz an Tieren erwartet nach Mendel

Genotyp	e 14 (C57/Bl6)	e 18 (C57/Bl6)	p 5-10 (C57/Bl6)	p 21 (C57/Bl6)	p 21 (Sv129)	% erwartet
$G\alpha_{i2}^{+/+}$	7 (15,9 %)	13 (22 %)	137(26,9 %)	365 (31,1%)	177 (29,9%)	25
$G\alpha_{i2}^{+/-}$	29 (66 %)	34 (57,7 %)	316 (62,1%)	695 (59,2%)	356 (60,1%)	50
$G\alpha_{i2}^{-/-}$	8 (18,1 %)	12 (20,3 %)	56 (11 %)	114 (9,7 %)	59 (10 %)	25
	44 (6 Würfe)	59 (8 Würfe)	509 (92 Würfe)	1174 (210 Würfe)	592 (116 Würfe)	

Die erhobenen Befunde der genetischen Verteilung der Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten während der Embryonalentwicklung und in den ersten Wochen nach der Geburt wiesen auf einen

Ergebnisse

perinatalen Todeszeitpunkt hin. Zur näheren Eingrenzung des Todeszeitpunkts dokumentierte Frau Katja Pexa (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Universität Düsseldorf) das Überleben neugeborener Mäuse nach Kaiserschnittentbindung. Hierzu wurden homozygot $G\alpha_{i2}$ -defiziente Männchen mit heterozygot $G\alpha_{i2}$ -defizienten Weibchen verpaart. Dabei verstarb ein Anteil von ca. 40 % aller $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse innerhalb der ersten Stunden nach Geburt während nur 14,6 % der heterozygoten Tiere die erste postnatale Stunde nicht überlebten (Frau Katja Pexa, persönliche Mitteilung).

Durch unseren amerikanischen Kooperationspartner erfolgte die Herstellung Paraffin gebetteter Hämatoxylin-Eosin gefärbter Schnitte von verstorbenen und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen sowie Wildtyp-Kontrollen für eine mikroskopische Analyse. Allerdings wurden keine Auffälligkeiten beobachtet. Eine weitere Analyse erfolgte zunächst nicht.

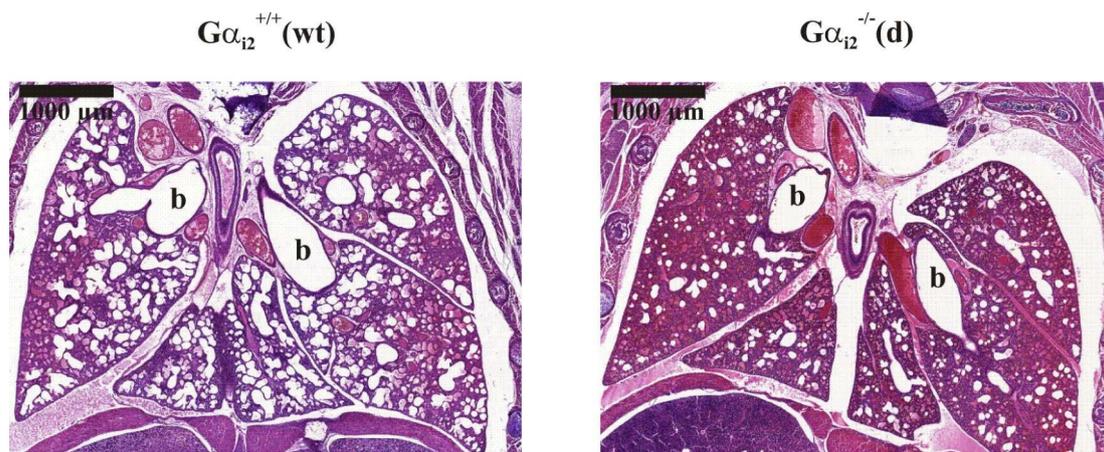


Abbildung 6: Repräsentative HE-gefärbte, 5 µm dünne Schnitte der Lunge von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (d)-Mäusen am Embryonaltag e 19,5. Während die Lungen der $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Tiere expandiert und belüftet erscheinen, imponiert die Lungenstruktur von verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen verdichtet und spärlich entfaltet. (b = Hauptbronchus, Maßstab 1000 µm).

Mit Unterstützung von Prof. Dr. med. L. Quintanilla-Fend, Pathologisches Institut Universität Tübingen, haben wir die histologischen Präparate weiter untersucht. Hierbei fanden sich Auffälligkeiten der Lungenmorphologie von verstorbenen Mäusen mit spärlich entfalteteten, kompakten Lungen ohne Hinweise auf Veränderungen der Architektur des Bronchialsystems (Abbildung 6).

Ergebnisse

Bei der histomorphometrischen Analyse konnte der Eindruck der kompakten Lungenstruktur bestätigt und quantifiziert werden (Abbildung 7). Während der Anteil der primitiven Alveolarfläche bei Wildtyp-Kontrolltieren bei $38,6 \pm 2,7$ % ($n = 5$) und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen bei $35,6 \pm 3,7$ % ($n = 5$) lag, zeigten verstorbene $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse einen signifikant reduzierten Anteil der primitiven Alveolarfläche (s.S. 41) von $17,6 \pm 6,4$ % ($n = 5$). Darüber hinaus fanden sich bei der mikroskopischen Untersuchung keine Unterschiede weiterer Organe wie Leber, Darm, Niere, Thymus oder muskuloskelettalem System (Abbildung 30 im Anhang).

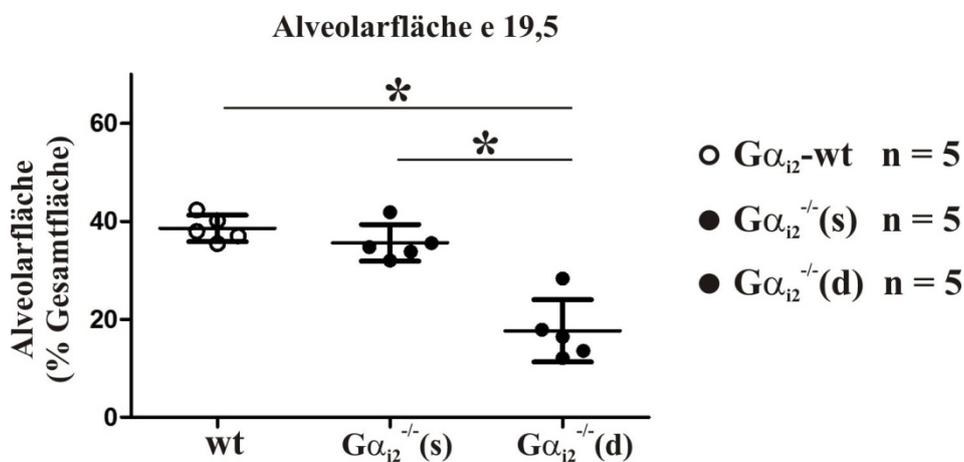


Abbildung 7: Anteil der primitiven Alveolarfläche zur Gesamtfläche der Lunge von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)-, überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (s)- und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (d)-Mäusen am Embryonaltag 19,5. Verstorbene $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäuse zeigen mit $17,6 \pm 6,4$ % einen signifikant reduzierten Anteil der primitiven Alveolarfläche im Vergleich zu überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen mit $35,6 \pm 3,7$ % und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen ($n = 5$) mit $38,6 \pm 2,7$ % (Punktediagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), * $p < 0,05$).

3.2.2. Perinatale Letalität

Nach dem Wechsel der Arbeitsgruppe von Düsseldorf nach Tübingen sowie dem Transfer der Mauslinien und Rückkreuzungen auf definierte genetische Hintergründe, sollten zunächst die Befunde der Vorarbeiten aus Düsseldorf zur perinatalen Sterblichkeit reproduziert werden. Alle folgenden Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich ausschließlich auf Versuchstiere, die aus Verpaarungen $G\alpha_{i2}$ -defizienter homozygoter ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Verpaarungen ($G\alpha_{i2}^{-/-} \times G\alpha_{i2}^{-/-}$) und $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp ($G\alpha_{i2}^{+/+}$) Verpaarungen ($G\alpha_{i2}^{+/+} \times G\alpha_{i2}^{+/+}$) stammten.

Ergebnisse

Um den Todeszeitpunkt neugeborener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse näher einzugrenzen, wurde die Spontaneinleitung der Geburt von Mäusefeten am Tag e 19,5 abgewartet und die verbleibenden Feten per Kaiserschnitt entbunden. Die auf diese Weise erhaltenen neugeborenen Mäuse wurden für einen Zeitraum von etwa drei Stunden beobachtet und der Todeszeitpunkt durch das Sistieren der Atemtätigkeit und des Schmerzreflexes am Schwanz der Mäuse bestimmt. Von insgesamt 49 untersuchten $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen, die aus der Verpaarung homozygoter $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Zuchtpaare stammten, verstarben 10 innerhalb der ersten drei Stunden nach Geburt, was einer Sterberate von ca. 20 % entspricht (Tabelle 4, Abbildung 8).

Der Großteil der Tiere verstarb innerhalb der ersten halben Stunde nach Geburt. Der mediane Zeitpunkt des Todeseintritts betrug dabei ca. 22 Minuten (Mittelwert \pm Standardabweichung: 29 ± 21 min; Abbildung 8). Die 49 untersuchten Tiere entstammten aus 6 Würfen bei einer Wurfgröße von 7 bis 10 Neugeborenen (Mittelwert \pm Standardabweichung: $8,8 \pm 1,2$ Mäuse/Wurf). Im Gegensatz dazu überlebten 16 der 17 untersuchten $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Kontrollen den Untersuchungszeitraum von zwei bis drei Stunden. Die Todesursache der verstorbenen Wildtyp-Maus wurde nicht bestimmt, sie zeigte bereits unmittelbar postnatal keine Lebenszeichen und wurde daher nicht in die Statistik einbezogen. Hier stammten die Mäuse aus 4 Würfen, bei Wurfgrößen mit 4 bis 5 Neugeborenen (Mittelwert \pm Standardabweichung: $4,25 \pm 0,5$ Mäuse/Wurf) waren diese damit kleiner als bei den $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren. Eine geschlechtsspezifische Verteilung der verstorbenen Mäuse wurde in diesem Fall nicht überprüft.

Die verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse zeigten dabei Zeichen eines Atemnotsyndroms mit Schnappatmung in Form von tiefen Atemzügen, subkostalen und abdominellen Einziehungen; immer wieder einsetzenden längeren (bis zu einer Minute dauernden) Atempausen und einer Zyanose (Abbildung 9). Dagegen zeigten neugeborene Wildtyp-Tiere in keinem der untersuchten Fälle sowie überlebende $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse bis auf wenige Ausnahmen keine Auffälligkeiten der Atemaktivität. Hier erfolgte ein rascher Wechsel von den ersten tiefen Schnappatemzügen unmittelbar nach Entbindung zu einem hochfrequenten Atemmuster innerhalb der ersten Minuten nach Geburt.

Ergebnisse

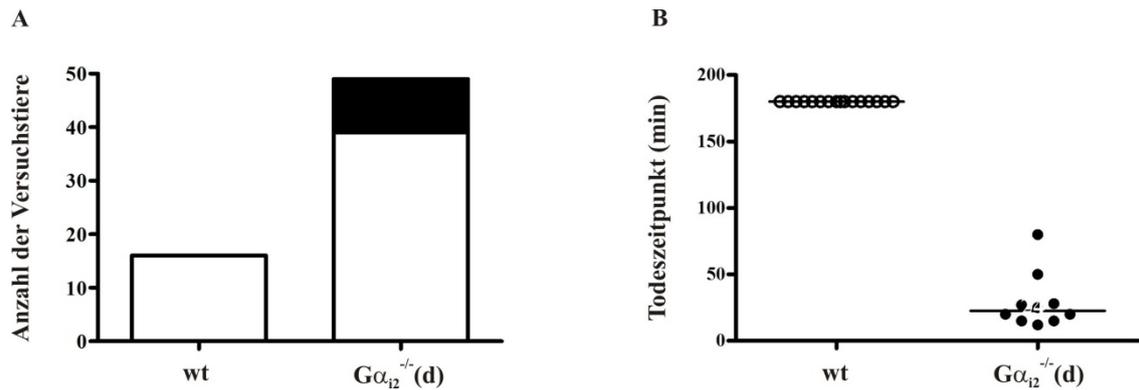


Abbildung 8: Letalität (A) und Todeszeitpunkt (B) $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäuse am Tag der Geburt (p 0).

A: Von 49 untersuchten $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen sind 10 (schwarzer Anteil des Balkens) innerhalb der ersten 3 Stunden nach Geburt verstorben, 39 (weißer Anteil des Balkens) haben in diesem Zeitraum überlebt. Der prozentuale Anteil verstorbenen $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäuse beträgt demnach ca. 20 %. Von den 16 untersuchten Wildtyp-Kontrollen (wt), haben alle den Beobachtungszeitraum von 180 Minuten überlebt.

B: Todeszeitpunkt der verstorbenen $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäuse. Der mediane Todeszeitpunkt (schwarze Linie) beträgt ca. 22 Minuten nach Entbindung. Von den 16 untersuchten Wildtyp-Kontrollen (wt), haben alle den Beobachtungszeitraum von 180 Minuten überlebt.

Tabelle 4: Perinatale Letalität $G\alpha_{12}^{-/-}$ - Mäuse. Die Mäuse stammten aus homozygoten $G\alpha_{12}^{-/-}$ - und $G\alpha_{12}^{+/+}$ - Inzuchtverpaarungen.

Mäuse mit offensichtlichen Dysplasien, oder zum Zeitpunkt der Entbindung bereits eingetretenem intrauterinem Tod wurden aus der Wertung ausgeschlossen.

Genotyp	$G\alpha_{12}^{+/+}$	$G\alpha_{12}^{-/-}$
Anzahl der untersuchten Mäuse (n)	17	49
Anzahl der innerhalb der ersten drei Stunden nach Geburt verstorbenen Mäuse (x)	0	10
Sterblichkeitsrate ($\frac{x}{n} * 100 \%$)	0 %	20,4 %

Bei genauer Betrachtung der ateminsuffizienten neugeborenen $G\alpha_{12}$ -defizienten Mäuse konnte man die Lungengrenzen und damit die Ausdehnung der Lungen unter der dünnen Haut erkennen. Hierbei zeigte sich, dass die Lungen von Mäusen, die später verstarben, initial entfaltet erschienen (Abbildung 10).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein Anteil von ca. 20 % der $G\alpha_{12}$ -defizienten Mäuse postnatal versterben. Der mediane Todeszeitpunkt beträgt ca. 22 Minuten nach Geburt. Phänotypisch imponiert bei den versterbenden Mäusen ein Atemnotsyndrom, wobei interessanterweise die Lungen der Mäuse primär entfaltet erscheinen.

Ergebnisse

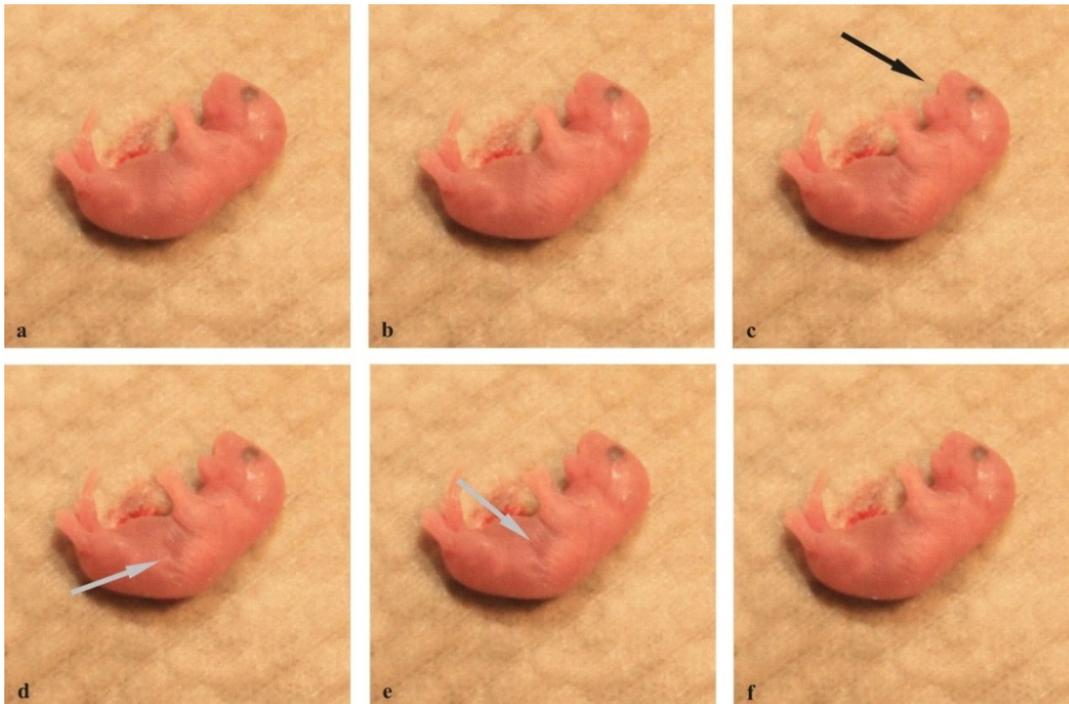


Abbildung 9 a-f: Chronologische Aufnahmen eines Atemzyklus einer verstorbenen $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Maus nach Geburt. Gut zu erkennen ist das pathologische Atemmuster mit der weiten Öffnung des Mundes zu Beginn der Atmung (schwarzer Pfeil in c) sowie der abdominellen Einziehung unterhalb des Rippenbogens (graue Pfeile in d und e) während der tiefen Inspiration. Diese Maus verstarb zwölf Minuten nach Geburt.

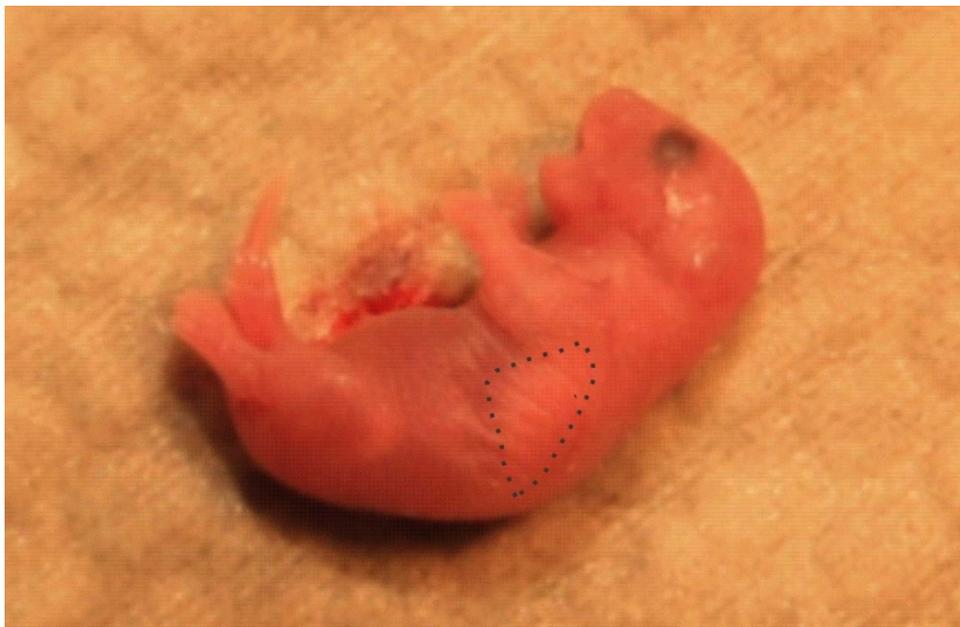


Abbildung 10: Großaufnahme einer verstorbenen $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Maus nach der Geburt. Die unterhalb der Haut durchscheinenden Lungengrenzen sind mit einer gepunkteten Linie umzeichnet. Die Lunge erscheint nicht kollabiert. Die Maus zeigte die im Text beschriebenen Anzeichen eines Atemnotsyndroms. Diese Maus verstarb zwölf Minuten nach Geburt.

Ergebnisse

3.2.3. Somato- und Organometrie

Zur basalen Charakterisierung der für die Erfassung der perinatalen Sterblichkeit in 3.2.2 verwendeten neugeborenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse wurden die Körperlänge (Scheitel-Steiß-Länge), das Körpergewicht sowie die Organgewichte von Herz, Lunge, Leber und Niere der Neugeborenen bestimmt und mit den Daten von $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Mäusen verglichen. Eine zusätzliche Differenzierung der überlebenden und verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen erfolgt im Anschluss und ist separat weiter unten dargestellt. Nicht alle der in 3.2.2 angegebenen Mäuse wurden aus technischen Gründen für die Somato- und Organometrie verwendet. Die Mäuse wurden direkt im Anschluss an den Todeseintritt bzw. im Anschluss an den Gesamtbeobachtungszeitraum von drei Stunden für die Organentnahme präpariert.

Während sich kein Unterschied der Scheitel-Steiß-Länge zeigte, konnte ein um 9 % signifikant reduziertes Körpergewicht bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($1,3 \pm 0,1$ g; $n = 25$) gegenüber den $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Tieren ($1,43 \pm 0,12$ g; $n = 12$; $p < 0,01$) nachgewiesen werden (Abbildung 11).

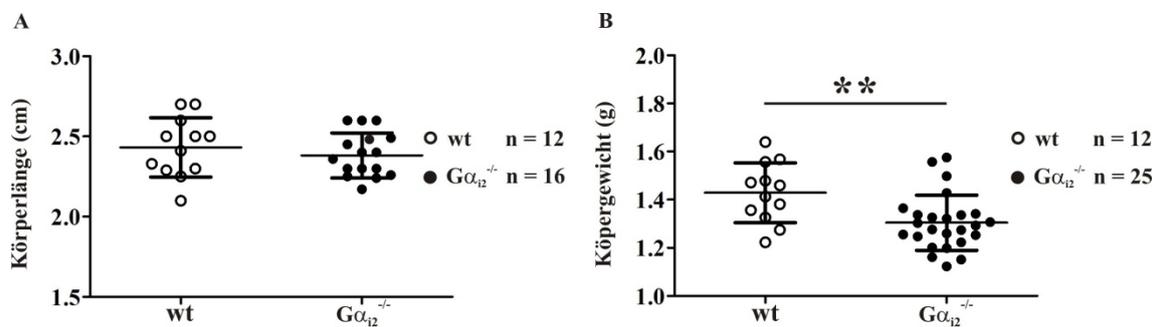


Abbildung 11: Körperlänge (A) und Körpergewicht (B) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen am Tag der Geburt (p 0). Während die Körperlänge bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen ($2,43 \pm 0,19$ cm) und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($2,38 \pm 0,14$ cm) keine Unterschiede ergab, ist das Körpergewicht von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($1,3 \pm 0,1$ g) signifikant reduziert gegenüber den $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen ($1,43 \pm 0,12$ g; Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * $p < 0,01$).

Auch bei einzelnen Organgewichten zeigten sich signifikante Unterschiede: Das Herzgewicht aller untersuchter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($8,1 \pm 1,4$ mg; $n = 16$) war im Mittelwert um 25 % niedriger als bei Wildtyp-Kontrolltieren ($10,8 \pm 2,9$ mg; $n = 11$; $p < 0,02$). Die Nieren wogen im Mittel 13,5 % weniger bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($13,4 \pm 2,3$ mg; $n = 18$) im Vergleich zu den Wildtyp Kontrolltieren ($15,5 \pm 2,8$ mg;

Ergebnisse

n = 12; p < 0,03). Das Lungengewicht $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($29,4 \pm 5,8$ mg; n = 25) war um 19,7 % signifikant leichter als bei den Wildtyp Tieren ($36,6 \pm 6,5$ mg; n = 12, p < 0,003). Das Lebergewicht bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen war mit $59,1 \pm 8,4$ mg (n=14) ebenfalls reduziert im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit $66,7 \pm 11,1$ mg (n = 12), erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p = 0,07; Abbildung 12).

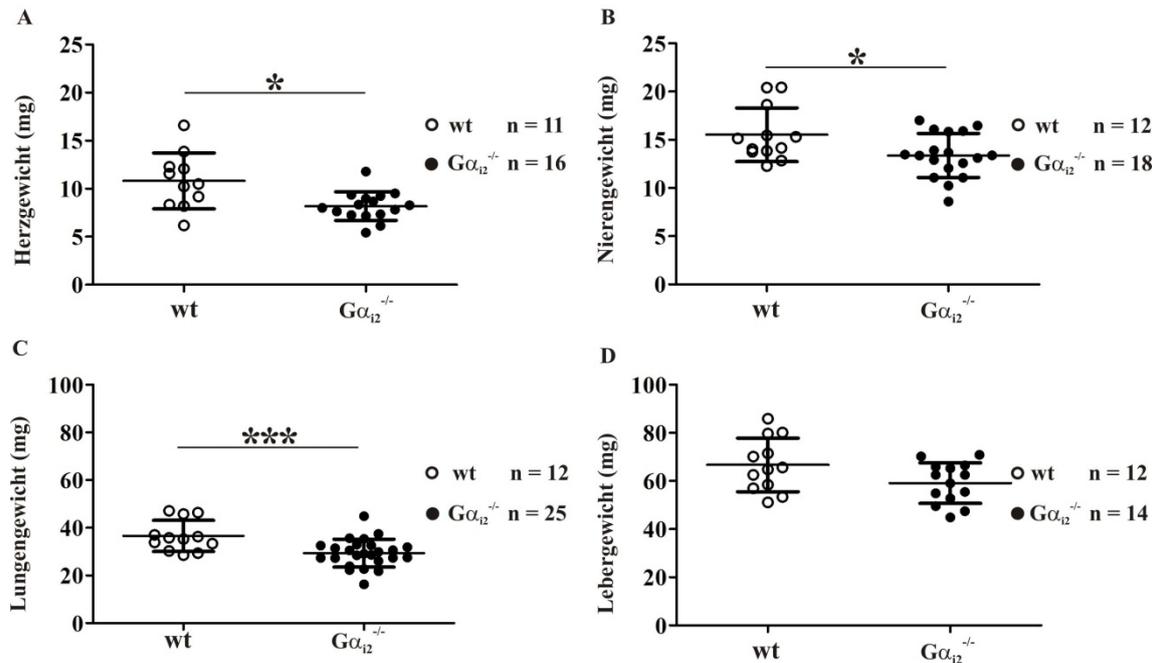


Abbildung 12: Vergleich von Herz- (A), Nieren- (B), Lungen- (C) und Lebergewicht (D) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen am Tag der Geburt (p 0). Das Gewicht von Herz, Nieren sowie Lungen war bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen. Ebenfalls war das Lebergewicht von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($59,1 \pm 8,4$ mg) geringer als bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen ($66,7 \pm 11,1$ mg) erreichte jedoch mit p = 0,07 keine statistische Signifikanz (Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * p < 0,05).

Um zu prüfen, ob sich $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse, die die ersten Stunden nach Geburt überleben ($G\alpha_{i2}^{-/-}$ (s)), von denen, die innerhalb dieses Zeitraumes versterben ($G\alpha_{i2}^{-/-}$ (d)), unterscheiden, wurden diese entsprechend statistisch ausgewertet. Dabei fanden sich keine Unterschiede in der Scheitel-Steiß-Länge und im Körpergewicht zwischen verstorbenen und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen (Abbildung 13).

Ergebnisse

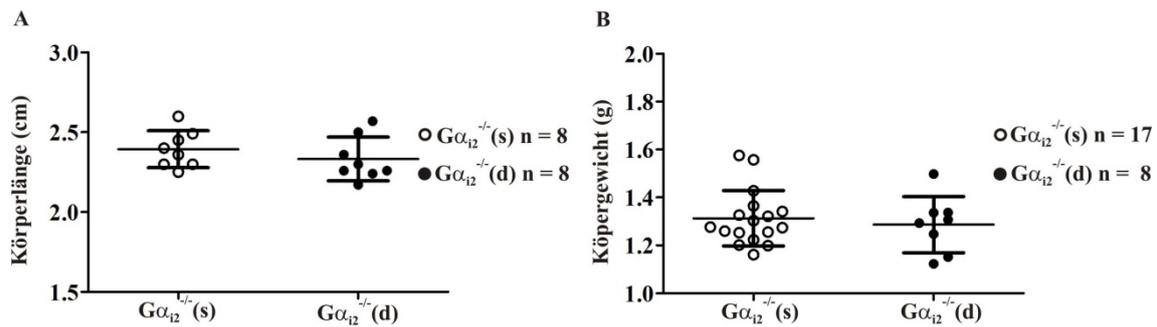


Abbildung 13: Körperlänge (A) und Körpergewicht (B) von überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/-(s)}$) und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/-(d)}$) am Tag der Geburt (p 0) (Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD). A: Die Körperlänge betrug bei überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen $2,39 \pm 0,12$ cm, bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen $2,33 \pm 0,14$ cm ($p = 0,19$). B: Das Körpergewicht betrug bei überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen $1,31 \pm 0,12$ g, bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen $1,29 \pm 0,12$ g ($p = 0,61$).

Der Vergleich der Organ Gewichte verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse mit denen überlebender $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse (Abbildung 14) ergab für die Nieren einen signifikanten Unterschied. Die Nieren verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($14,7 \pm 1,8$ mg; $n = 6$) waren 15,7 % signifikant schwerer als bei überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($12,0 \pm 1,8$ mg, $n = 8$; $p < 0,01$). Jedoch war das Nierengewicht verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($14,7 \pm 1,8$ mg; $n = 6$) nicht unterschiedlich von dem von Wildtyp-Tieren ($15,5 \pm 2,8$ mg; $n = 12$) ($p = 0,47$).

Da sowohl das Körpergewicht als auch die Gewichte der jeweiligen Organe bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen reduziert waren, sollte überprüft werden, ob einzelne Organe ein überproportional verringertes Gewicht im Vergleich zu den $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Mäusen aufwiesen. Dazu wurden die Organ Gewichte auf das jeweilige Körpergewicht bezogen (spezifisches Organ Gewicht, Abbildung 15). Nachgewiesen wurde ein signifikanter Unterschied für das spezifische Herzgewicht zwischen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($6,2 \pm 1,2$ mg/g KG, $n = 16$) und $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Mäusen ($7,6 \pm 1,7$ mg/g KG, $n = 11$, $p < 0,05$). Das spezifische Lungengewicht zwischen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($22,6 \pm 4,6$ mg/g KG, $n = 25$) und $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Mäusen ($25,6 \pm 4,0$ mg/g KG, $n = 12$) war ebenfalls reduziert, jedoch verfehlten die Werte knapp eine statistische Signifikanz ($p = 0,051$).

Ergebnisse

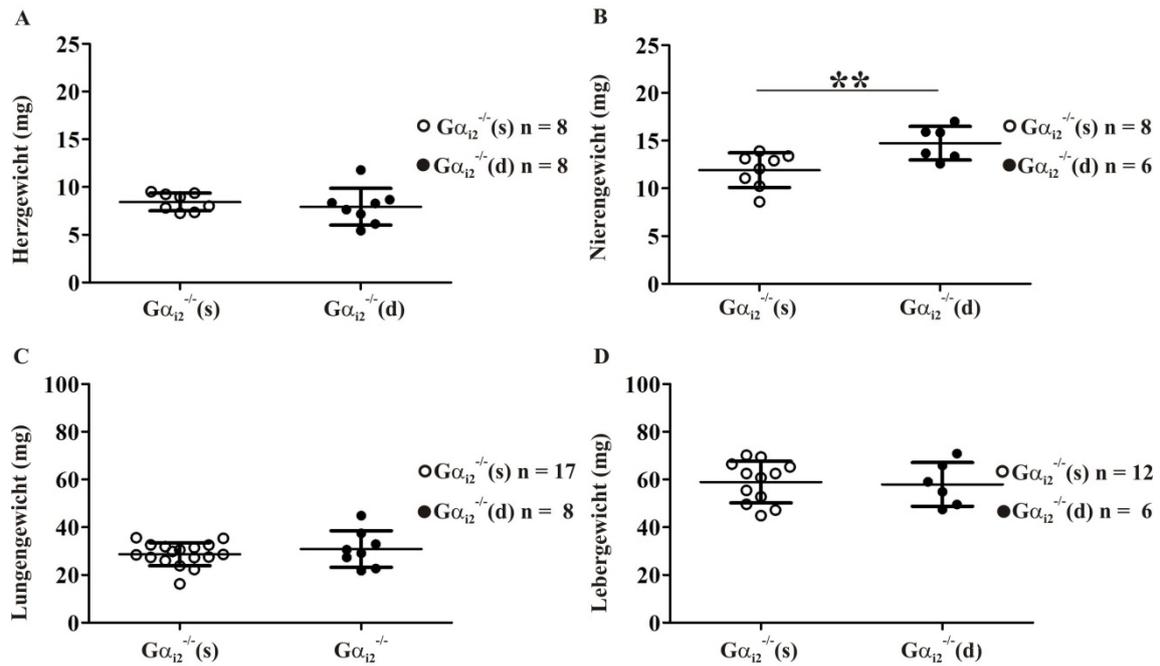


Abbildung 14: Vergleich des (A) Herz-, (B) Nieren-, (C) Lungen- und (D) Lebergewichts (jeweils in mg) von überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/-}(s)$) und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/-}(d)$) Mäusen am Tag der Geburt (p 0). Das Nierengewicht von überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen war mit $12,0 \pm 1,8$ mg signifikant reduziert im Vergleich zu verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen mit $14,7 \pm 1,8$ mg. Das Gewicht von Herz ($8,4 \pm 0,9$ mg bei überlebenden und $7,9 \pm 1,9$ mg bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen), Lungen ($28,7 \pm 4,8$ mg bei überlebenden und $30,9 \pm 0,8$ mg bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen) sowie der Leber ($58,9 \pm 8,7$ mg bei überlebenden und $57,9 \pm 9,2$ mg bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen) wies keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen auf (Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$).

Vergleich man darüber hinaus das jeweilige spezifische Organgewicht (mg/gKG) der verstorbenen und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen, so ergab sich ein signifikanter Unterschied beim spezifischen Nierengewicht. Dieses war bei verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($11,0 \pm 1,2$ mg/g KG, n = 6) um 16 % signifikant erhöht im Vergleich zu überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen ($9,5 \pm 1,5$ mg/g KG, n = 12, $p < 0,05$). Das spezifische Nierengewicht von verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen war vergleichbar mit dem der Wildtyp-Kontrollen ($10,8 \pm 1,3$ mg/g KG, n = 8, $p = 0,75$).

Ergebnisse

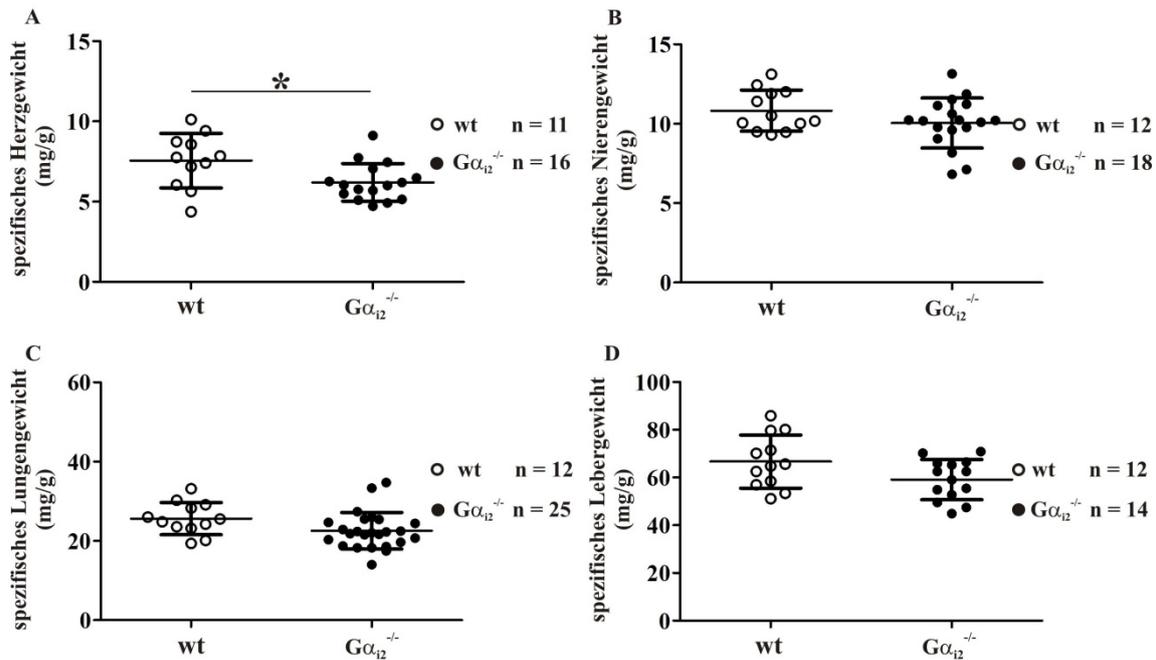


Abbildung 15: Spezifisches Organgewicht von Herz (A), Lunge (B), Leber (C) und Niere (D) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen am Tag der Geburt (p 0). Das spezifische Herzgewicht ist signifikant reduziert bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($6,2 \pm 1,2$ mg/g KG) im Vergleich zu den $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen ($7,6 \pm 1,7$ mg/g KG). Das spezifische Nierengewicht ($10,8 \pm 1,3$ mg bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen und $10,0 \pm 1,6$ mg bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen), Lungengewicht ($25,6 \pm 4,0$ mg; bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen und $22,6 \pm 4,6$ mg bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen) sowie Lebergewicht ($47,0 \pm 8,8$ mg bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen und $45,4 \pm 5,6$ mg bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen) waren tendenziell geringer bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen, ohne signifikant zu sein (Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$).

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl das Körpergewicht (signifikant), als auch die einzelnen Organgewichte von Herz, Lunge, Nieren (allesamt signifikant) und Leber (tendenziell) bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen verringert waren. Darüber hinaus fanden sich keine Unterschiede in der Somato- und Organometrie zwischen verstorbenen und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen außer beim Nierengewicht, das interessanterweise signifikant bei verstorbenen Mäusen erhöht war. Das spezifische Herzgewicht war bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen verringert gegenüber Wildtyp-Kontrollen. Sonst waren die auf das Körpergewicht bezogenen Organgewichte (d. h. das spezifische Organgewicht) zwischen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen und Wildtyp-Kontrollen nicht verändert.

3.3. Histologische Untersuchungen

3.3.1. Morphologie und Morphometrie der Lunge

Da die neugeborenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse Anzeichen einer pathologischen Atmung zeigten, wurden die Lungen der Mäuse histologisch zu verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung sowie am Tag der Geburt analysiert. An 5 μm dünnen, mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Paraffinschnitten der Lunge wurde das Verhältnis aus der Fläche der zukünftig, d. h. postnatal, luftleitenden und dem Gasaustausch dienenden Abschnitte des Bronchialbaumes („primitive Alveolarfläche“) und der Fläche des mesenchymalen Zellanteils zur Gesamtfläche der untersuchten Lungenabschnitte bestimmt. Histomorphologisch sowie morphometrisch zeigten sich dabei keine auffälligen Unterschiede zwischen den Lungen $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse und den $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Tieren über den untersuchten Zeitraum der Embryonalentwicklung (Abbildung 16 und 17).

Am Tag e 15,5 der Embryonalentwicklung befanden sich die Lungen im pseudoglandulären Stadium (s. S. 23 ff.). Histologisch zeigte die Lungenstruktur der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse ein zellreiches Mesenchym mit zahlreichen primitiven Bronchien und Bronchusaufzweigungsstellen. Der Anteil der Fläche primitiver Bronchien lag bei $6,7 \pm 0,6 \%$ ($n = 7$) und damit signifikant höher als bei Wildtyp-Kontrollen mit $5,5 \pm 0,5 \%$ ($n = 7$); $p < 0,05$ Abbildung 17 A). Der Anteil der Fläche primitiver Bronchien steigerte sich bis zum Tag e 17,5 der Embryonalentwicklung auf $14 \pm 2,9 \%$ bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusefeten ($n = 7$) und unterschied sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr von Wildtyp-Kontrollen ($13,5 \pm 5,5 \%$; $n = 5$). Auch histomorphologisch entsprachen die Lungen der kanalikulären Phase der Lungenentwicklung. Ein Unterschied im mesenchymalen Zellanteil war weder am Tag e 15,5 noch e 17,5 festzustellen (Abbildung 17 B, D).

Ergebnisse

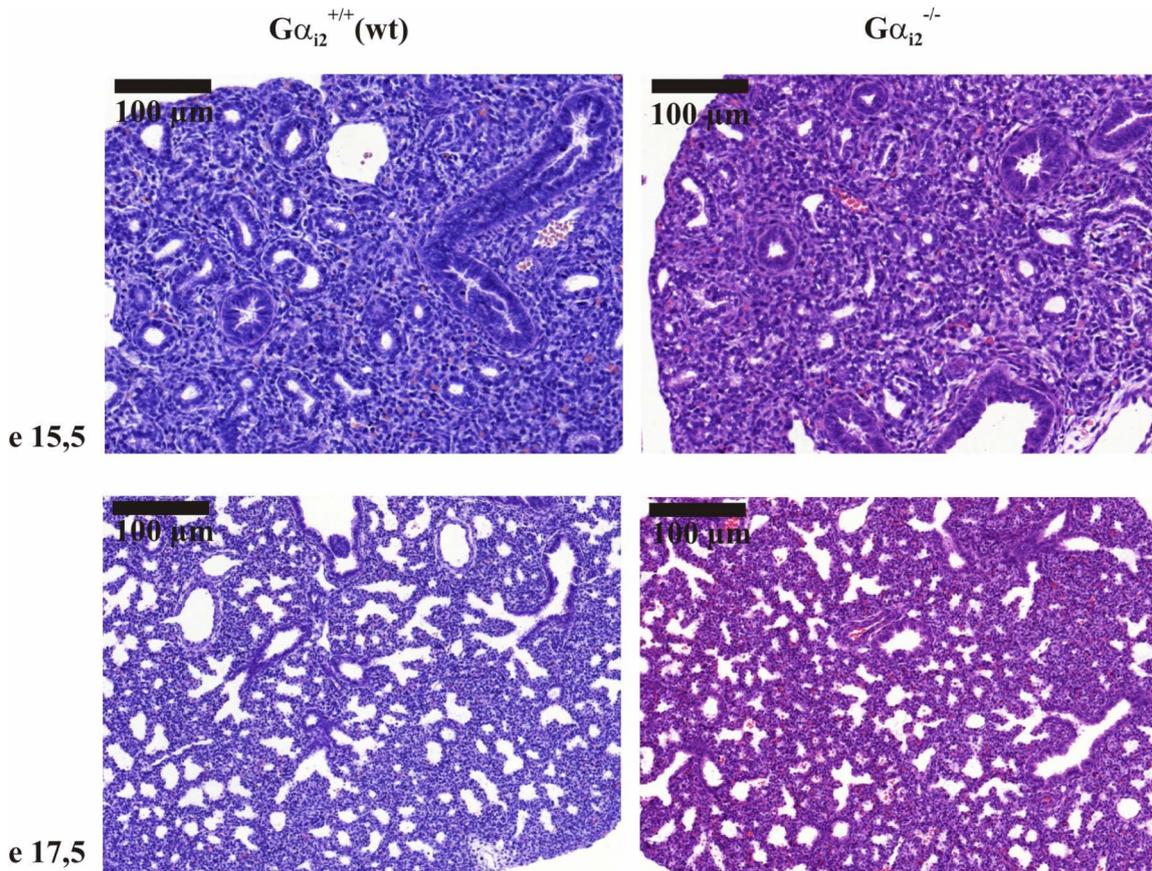


Abbildung 16: Repräsentative HE-gefärbte, 5 µm dünne Schnitte der Lunge von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen zu den Embryonaltagen e 15,5 und e 17,5 (Maßstab 100 µm). Histologisch zeigte die Lungenstruktur sowohl bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen als auch bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen am Tag e 15,5 das typische Erscheinungsbild der pseudoglandulären Phase der Lungenentwicklung. Am Tag e 17,5 sind ebenfalls keine morphologischen Veränderungen der Lungenstruktur beider Vergleichsgruppen auszumachen, die Lungen haben das für die kanalikuläre Phase der Lungenentwicklung typische Erscheinungsbild.

Am Tag der Geburt (p 0) entfalteten sich die Lungen der $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Tiere sowie der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse, die die ersten Stunden nach Geburt überlebten (Abbildung 18 und 19). Der Anteil der primitiven Alveolarfläche nahm auf $44,4 \pm 9,4 \%$ bei $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Tieren (n = 6) und $39,0 \pm 10 \%$ bei überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen (n = 6) zu (p = 0,36). Die Lungen verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse waren dagegen spärlich entfaltet und wiesen einen sowohl gegenüber Wildtyp- als auch gegenüber verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen signifikant reduzierten Anteil der primitiven Alveolarfläche auf ($24,3 \pm 8,3 \%$; n = 4, p < 0,05) bei verdickt erscheinenden interalveolären Septen.

Ergebnisse

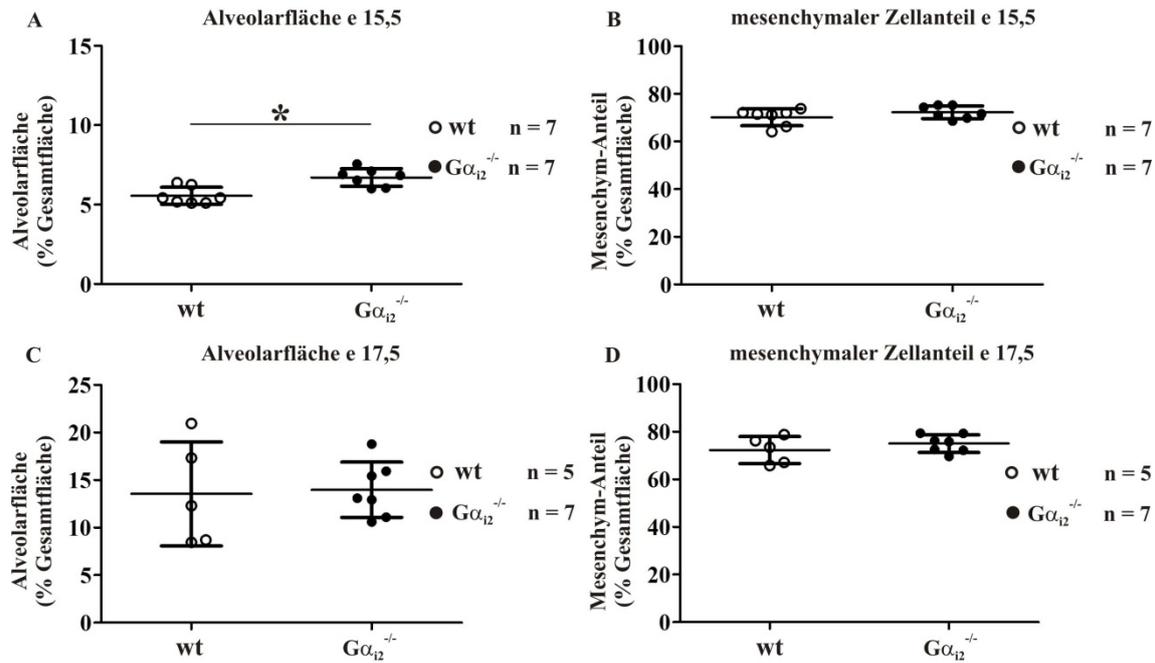


Abbildung 17: Quantifizierung der primitiven Alveolarfläche (A, C) und des mesenchymalen Anteils (B, D) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen zu den Embryontagen e 15,5 und e 17,5. Der Anteil der Fläche primitiver Bronchien lag an e 15,5 bei $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen bei $6,7 \pm 0,6$ % im Vergleich zu $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen mit $5,5 \pm 0,5$ %. Am Tag e 17,5 lag der Anteil primitiver Bronchien von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen bei $14 \pm 2,9$ % und bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen bei $13,5 \pm 5,5$ %. Dargestellt ist die jeweilige Fläche bezogen auf die Gesamtfläche eines Bildausschnittes(Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$).

Entsprechend war der mesenchymale Zellanteil bei verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen mit $67,8 \pm 9$ % ($n = 4$) signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp Tieren mit $48,6 \pm 9,3$ % ($n = 6$, $p < 0,05$). Der mesenchymale Zellanteil überlebender $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse lag bei $54 \pm 9,4$ % ($n = 6$) und verpasst mit einem p-Wert von 0,054 knapp das Signifikanzniveau beim statistischen Vergleich mit den verstorbenen Tieren (Abbildung 19). Der mesenchymale Zellanteil ist bei überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen tendenziell größer als bei Wildtyp Tieren ($p = 0,35$). Man beachte, dass demnach überlebende $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäusen mit einem gegenüber Wildtyp Tieren tendenziell verringerten Alveolarflächenanteil und höherem mesenchymalen Zellanteil leichte Veränderungen der Lungenstruktur aufweisen.

Ergebnisse

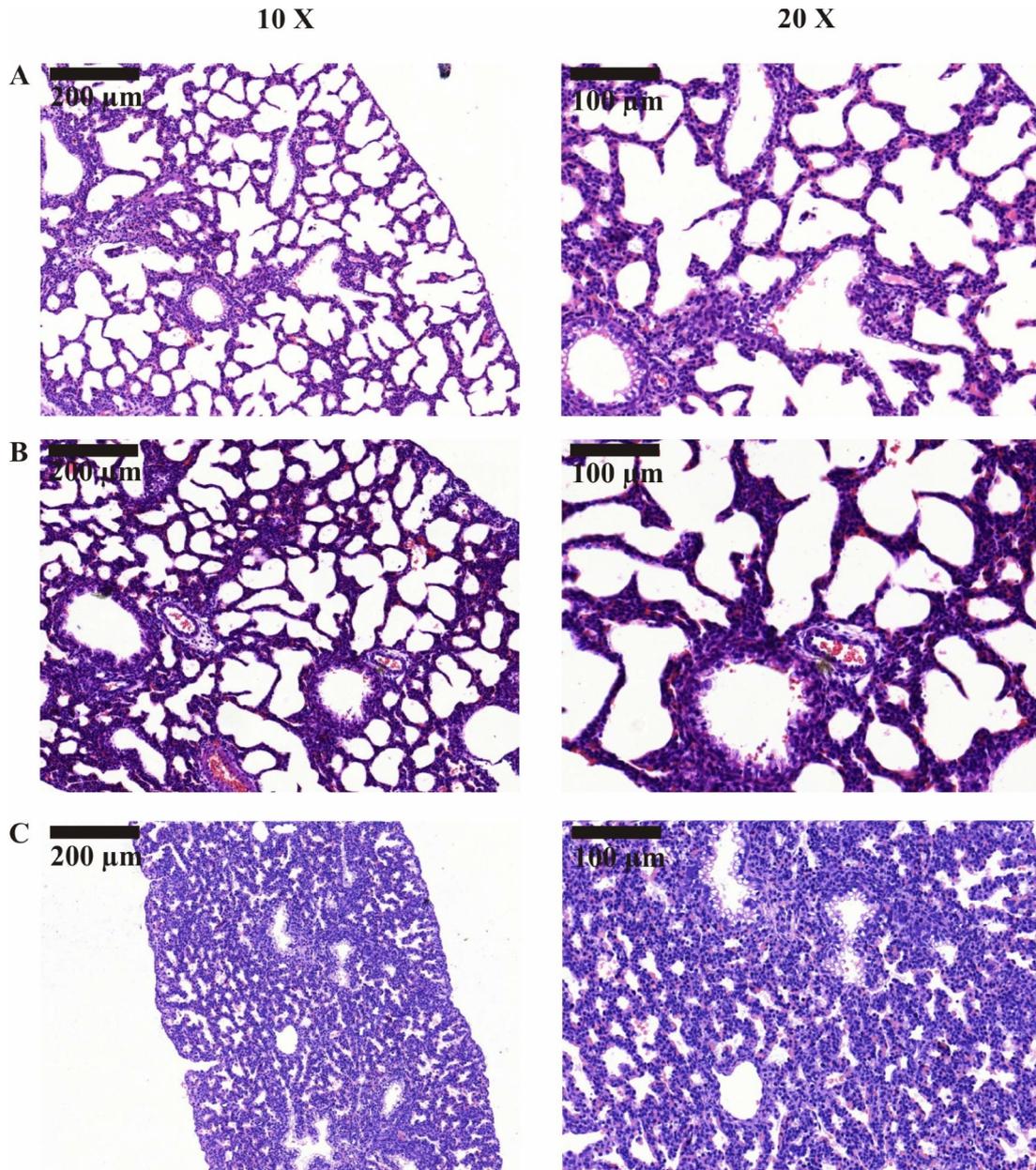


Abbildung 18: Repräsentative HE-gefärbte, 5 µm dünne Schnitte der Lunge von (A) $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -, (B) überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (s)- und (C) verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (d)-Mäusen am Tag der Geburt (p 0) bei 10facher (links) und 20facher (rechts) Vergrößerung (Maßstab 200 µm bzw. 100 µm). Es imponiert die kompakte, spärlich entfaltete Lungenstruktur verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse (C) während die Lungen von überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen und $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Tieren weitgehend gleichmäßig, gut expandierte Lungen aufweisen.

Ergebnisse

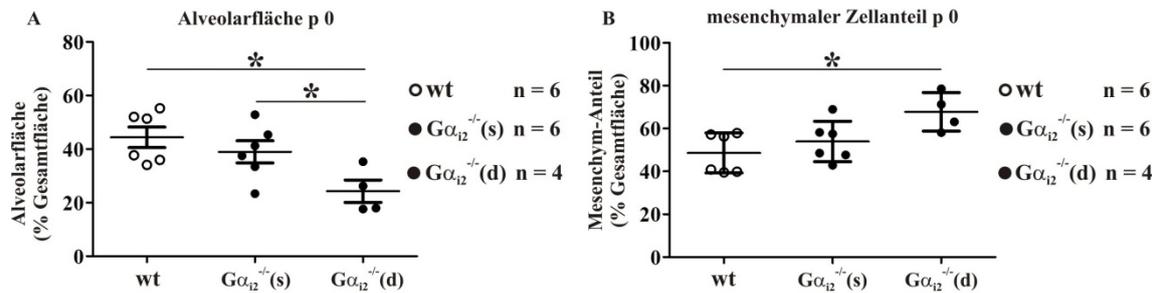


Abbildung 19: Quantifizierung der primitiven Alveolarfläche (A) und des mesenchymalen Zellanteils (B) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)-, überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/(s)}$) und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen ($G\alpha_{i2}^{-/(d)}$) am Tag der Geburt p 0. Der Anteil der primitiven Alveolarfläche lag bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen bei $44,4 \pm 9,4$ % und $39,0 \pm 10$ % bei überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen, dagegen war er bei verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen signifikant reduziert bei $24,3 \pm 8,3$ %. Dargestellt ist die jeweilige Fläche bezogen auf die Gesamtfläche eines Bildausschnittes (Punktediagramme mit Mittelwert \pm SD, * p < 0,05).

3.3.2. Subzelluläre Untersuchungen der Lungenstrukturen

Zur genaueren Charakterisierung der Lungenstruktur erfolgte die elektronenmikroskopische Beurteilung von Ultradünnschnitten der Mäuselungen. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Wolburg, Pathologisches Institut Universität Tübingen, durchgeführt.

Sowohl bei den $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp als auch bei überlebenden und verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen fanden sich regulär ausgebildete Blut-Luft-Schranken mit Typ-I-Alveolarzellen in räumlich enger Nachbarschaft zu Kapillaren sowie Typ-II-Alveolarzellen mit den charakteristischen Lamellarkörperchen (Abbildung 20).

Unterschiede zeigten sich jedoch in der Struktur des intraalveolären Surfactants. Während bei $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp- und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen das Surfactant intraalveolär gitterartig strukturiert als so genanntes tubuläres Myelin organisiert vorlag, war die Organisation des Surfactant bei verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen zu tubulärem Myelin deutlich reduziert. Hier lag das Surfactant zum überwiegenden Teil in Form von zwiebelschalenförmigen, runden Strukturen vor und sah damit ähnlich wie die intrazellulären Lamellarkörperchen aus (Abbildung 21).

Ergebnisse

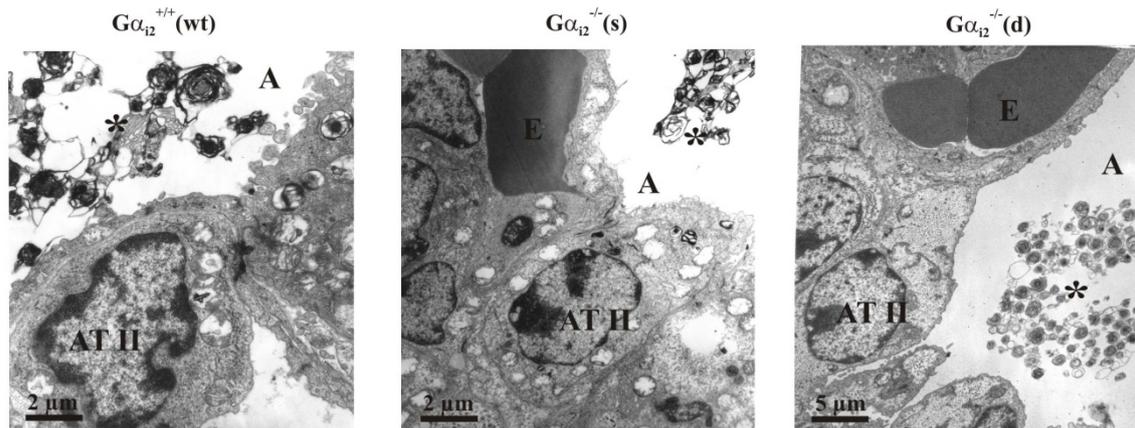


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $G\alpha_{i2}^{+/+}(wt)$ -, überlebenden $G\alpha_{i2}^{-/-}(s)$ - und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}(d)$ -Mäusen am Tag der Geburt. Sowohl bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Mäusen als auch überlebenden und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen zeigt sich eine regelrecht differenzierte Blut-Luft-Schranke mit Kapillaren, welche Erythrozyten (E) enthalten und in enger räumlicher Anordnung zu den Alveolarräumen (A) stehen. Ebenfalls ersichtlich sind die Typ-II-Alveolarzellen (AT), welche das Surfactant (*) synthetisieren. Maßstab 2 μm bzw. 5 μm .

Zusammenfassend kann man anhand der licht- und elektronenmikroskopischen Befunde feststellen, dass die postnatale Lungenstruktur von verstorbenen $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen kompakt und spärlich entfaltet erscheint (Abbildung 18). Dieser Eindruck lässt sich auch quantitativ anhand des morphometrisch bestimmten, signifikant verringerten primitiven Alveolaranteils und entsprechend erhöhten mesenchymalen Zellanteils bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen bestätigen (Abbildung 19). Die elektronenmikroskopischen Befunde deuten darüber hinaus auf einen Zusammenhang der mangelnden Lungenentfaltung mit einer Fehlorganisation des Surfactant hin (Abbildung 21). Dagegen finden sich keine Hinweise auf eine gestörte Embryonalentwicklung der Lunge bis Embryonaltag e 17,5 (Abbildung 16 und 17).

Ergebnisse

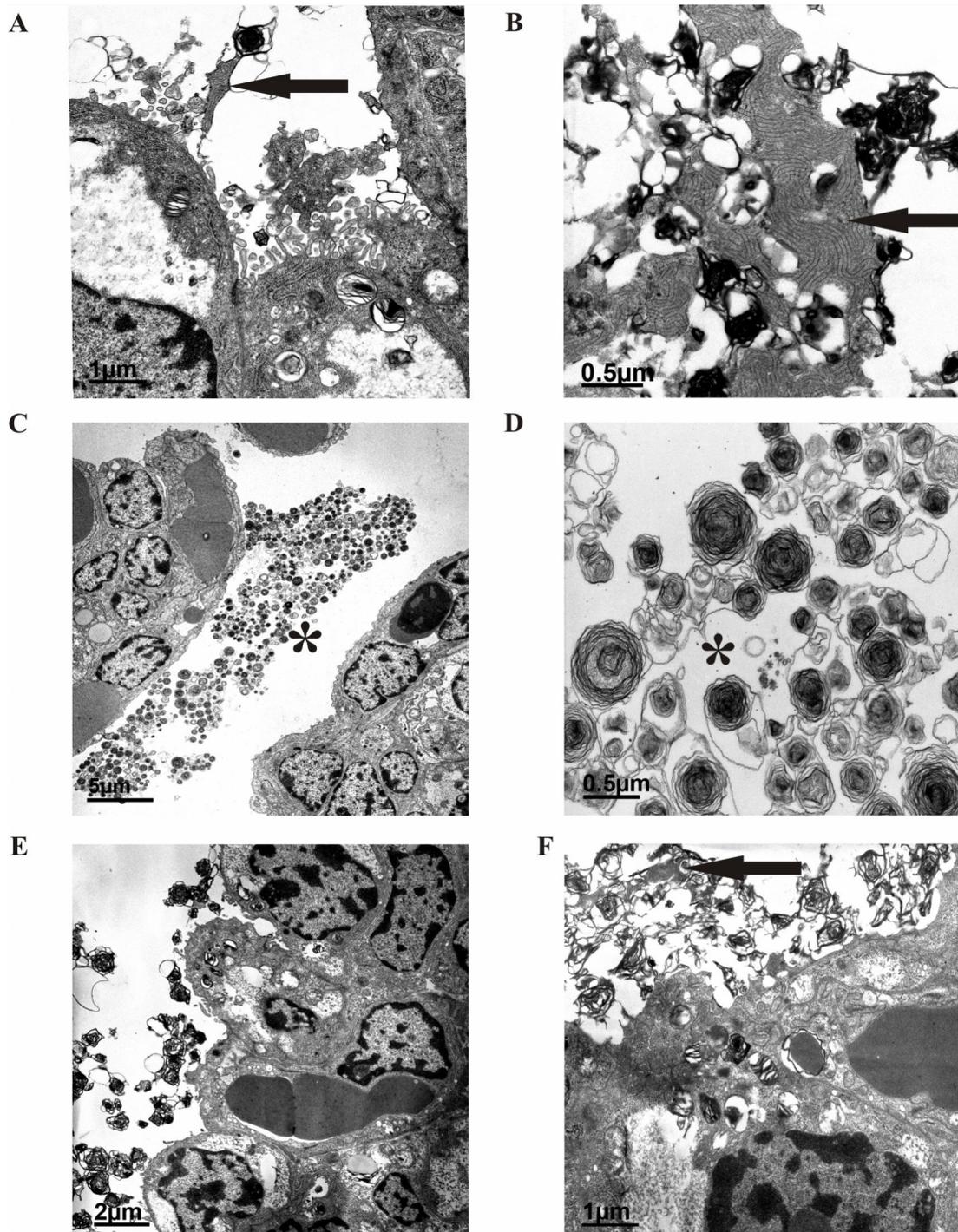


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $G\alpha_{12}^{+/+}$ (wt)- (A, B) und verstorbenen $G\alpha_{12}^{-/-}$ (d)-Mäusen(C, D) und überlebenden $G\alpha_{12}^{-/-}$ (s)-Mäusen (E, F) am Tag der Geburt. Während bei $G\alpha_{12}^{+/+}$ -Mäusen und überlebenden $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen das Surfactant intraalveolär gitterartig strukturiert als tubuläres Myelin organisiert vorliegt (Pfeile), erscheint die Organisation des Surfactant bei verstorbenen $G\alpha_{12}$ -defizienten Mäusen weitgehend zwiebelschalenförmig konfiguriert (*). Repräsentative Aufnahmen von Untersuchungen an $G\alpha_{12}^{-/-}$ - und $G\alpha_{12}^{+/+}$ -Tieren. Maßstab 0.5 μm , 1 μm , 2 μm bzw. 5 μm .

3.4. Charakterisierung der murinen Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

Das bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen perinatal auftretende pathologische Atemmuster sowie die beschriebenen sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch erhobenen Befunde bei der Analyse der Lungenstruktur deuten möglicherweise auf eine mangelnde Entfaltung der Lungen verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse hin. Auch die überlebenden Tiere zeigten Hinweise auf eine tendenziell veränderte Lungenstruktur (Abbildung 19). Vor diesem Hintergrund interessierte als nächstes die Frage, ob die überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse als adulte Tiere Veränderungen in der Lungenfunktion oder der Lungenstruktur im Vergleich zu Wildtyp Mäusen zeigten.

Dazu wurde die Lungenfunktion von Mäusen männlichen Geschlechts mit vergleichbarem Gewicht und Alter mit Hilfe dem Modell der „isoliert perfundierten Lunge“ (IPL) untersucht (Abbildung 31 im Anhang). So betrug das durchschnittliche Alter von Wildtyp-Tieren 13 ± 4 (n = 12) Wochen, von $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen 10 ± 0 (n = 9) Wochen ($p < 0,05$) und das durchschnittliche Gewicht von Wildtyp-Tieren $27 \pm 3,4$ g (n = 12) und von $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen $24 \pm 1,6$ g (n = 9; $p < 0,05$).

Die Lungen und das Herz der Mäuse wurden zu diesem Zweck frei präpariert und mit einem künstlichen, Albumin-haltigen Medium perfundiert und in einer Unterdruckkammer aus Plexiglas ventiliert. Mithilfe von verschiedenen Druckwandlern und der Software Pulmodyn konnten die Werte für die Beatmungsdrücke in der Kammer, die Atemstromstärke (I), das Atemzugvolumen (TV), der Atemwegswiderstand (R), die Compliance (C) sowie der mittlere pulmonalarterielle Druck (PAP) kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden. Die Lungenparameter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse wurden auf diese Weise über einen Zeitraum von 120 Minuten unter konstanten Beatmungsdrücken ermittelt. Zur Auswertung wurde die „Fläche unter der Kurve“ (AUC; „area under the curve“) für die einzelnen Parameter über den Versuchszeitraum von zwei Stunden bestimmt. Als Kontrollen dienten $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Mäuse. Es wurden ausschließlich Mäuse zu Versuchszwecken verwendet, welche aus Verpaarungen $G\alpha_{i2}$ -homzygoter ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) Zuchtpaare ($G\alpha_{i2}^{-/-} \times G\alpha_{i2}^{-/-}$) und $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp ($G\alpha_{i2}^{+/+}$) Zuchtpaare ($G\alpha_{i2}^{+/+} \times G\alpha_{i2}^{+/+}$) stammten.

Ergebnisse

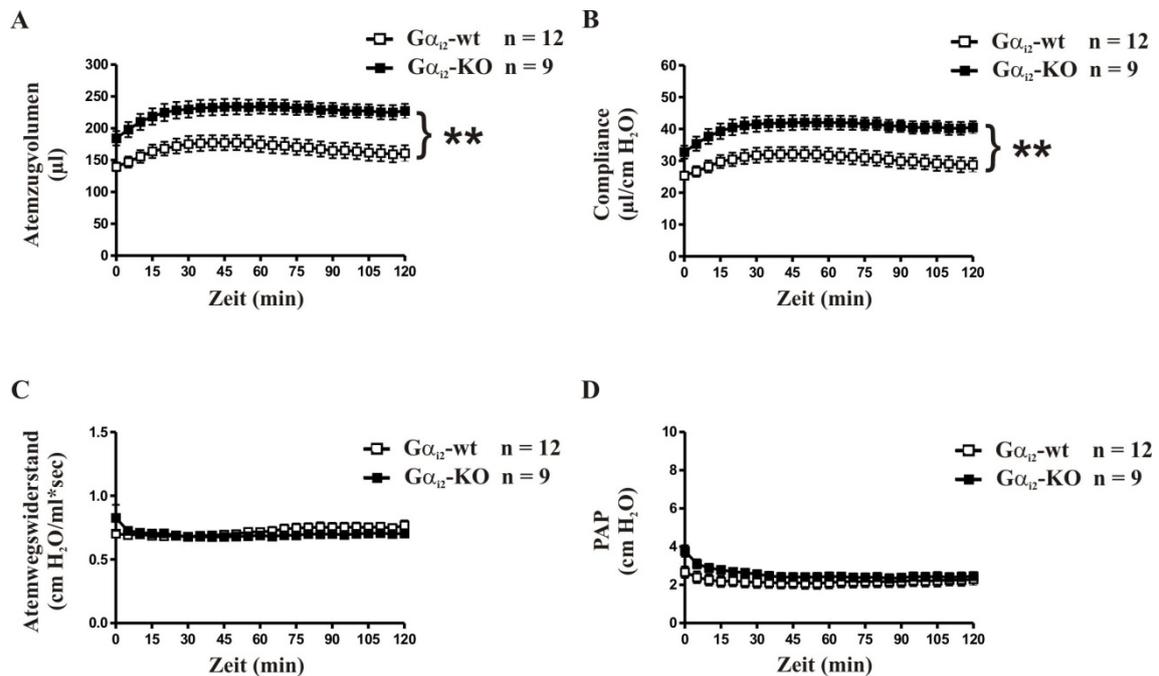


Abbildung 22: Darstellung des (A) Atemzugvolumens, der (B) Compliance, des (C) Atemwegswiderstands und des (D) mittleren pulmonalarteriellen Druckes (PAP) von $G\alpha_{12}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ (KO)-Mäusen über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse). Das Atemzugvolumen und die Compliance sind signifikant erhöht bei $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen über die Gesamtversuchsdauer (** $p < 0,01$).

Es zeigte sich, dass $G\alpha_{12}$ -defiziente Mäuse ein signifikant größeres Atemzugvolumen bei einer höheren Compliance aufwiesen (Abbildung 22, Tabelle 5). $G\alpha_{12}$ -defiziente Mäuse zeigten darüber hinaus signifikant erhöhte in- und expiratorische Atemflussgeschwindigkeiten sowie einen tendenziell erhöhten pulmonalarteriellen Druck. Der Atemwegswiderstand über die Zeit zeigte keine Unterschiede (Tabelle 5). Analyierte man darüber hinaus die Parameter Atemzugvolumen, Compliance, Resistance und den pulmonalarteriellen Druck gesondert zu festen Zeitpunkten (30, 60, 90, 120 min nach Versuchsbeginn) bei $G\alpha_{12}$ -defizienten- und Wildtyp-Tieren, so zeigte sich auch hier ein signifikant erhöhtes Atemzugvolumen und Compliance zu den Messzeitpunkten (Abbildung 23).

Ergebnisse

Tabelle 5: Fläche unter der Kurve während einer 120-minütigen Versuchsdauer (AUC 0-120 min: Mittelwerte \pm SEM, n= 7-9) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen, unpaired T-Test. Die Werte erreichen für keinen der bestimmten Parameter statistisch das Signifikanzniveau $p < 0,05$ (max. insp/exp. flow = maximaler inspiratorischer/ expiratorischer Fluss, n.s. nicht signifikant).

AUC (0-120min)	wt	$G\alpha_{i2}^{-/-}$	p-Wert
max. insp. Flow [(μ l/sec) min]	356600 \pm 18100	411000 \pm 58700	$p < 0,05$
max. exp. Flow [(μ l/sec) min]	274400 \pm 11900	326000 \pm 10700	$p < 0,05$
Atemzugvolumen (TV) [μ l min]	20100 \pm 1400	26800 \pm 1400	$p < 0.01.$
Atemwegswiderstand (Res[(cmH ₂ O/ml/sec) min]	86200 \pm 2300	83500 \pm 1500	n.s
Compliance [(μ l/cmH ₂ O) min]	3600 \pm 300	4800 \pm 300	$p < 0.01$
mittlerer pulmonalarterieller Druck [cmH ₂ O min]	262.3 \pm 34.3	379.6 \pm 79.6	n.s.

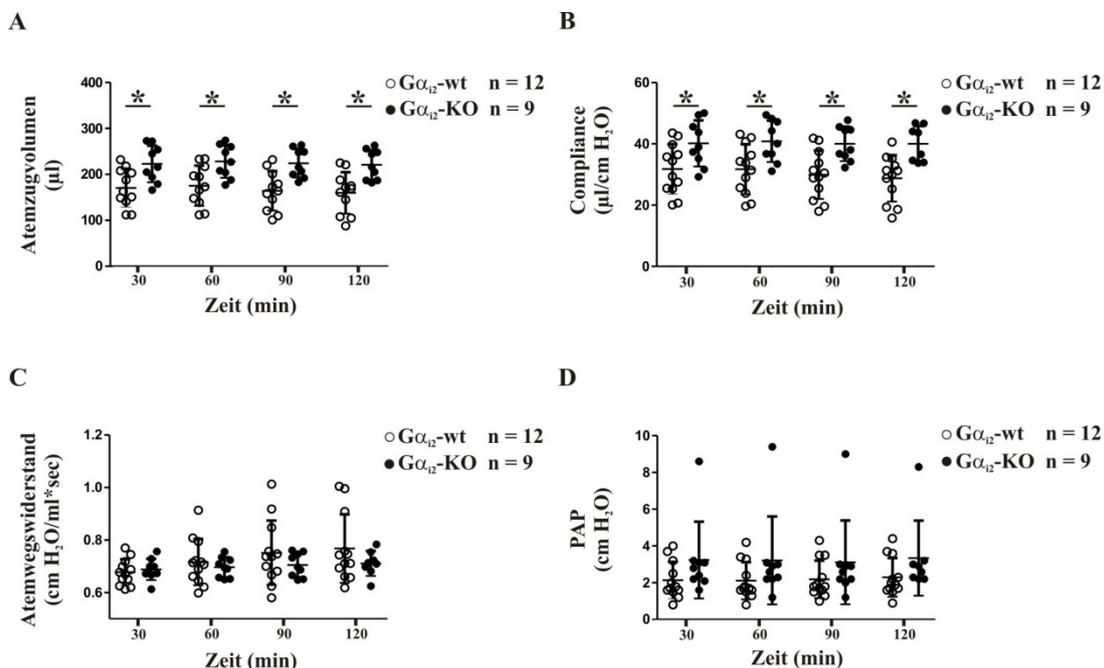


Abbildung 23: Bestimmung des Atemzugvolumens (A), der Compliance (B), des Atemwegswiderstands (C) und des pulmonalarteriellen Drucks (PAP; D) zu den jeweiligen Zeitpunkten 30 min, 60 min, 90 min, 120 min nach Versuchsbeginn von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ (KO)-Mäusen. Das Atemzugvolumen und die Compliance erreichen zu allen untersuchten Zeitpunkten statistische Signifikanz. Für die anderen Parameter ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind Punktediagramme mit den Einzelwerten von $G\alpha_{i2}$ -wt (weiße Punkte) bzw. $G\alpha_{i2}$ -KO-Mäusen (schwarze Punkte) mit den jeweiligen Mittelwerten \pm SD zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; * $p < 0,05$).

Ergebnisse

Während das durchschnittliche Atemzugvolumen von $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp-Tieren nach beispielsweise 30 Minuten Versuchsdauer bei $170,6 \pm 41,7 \mu\text{l}$ lag, erreichten $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse ein signifikant erhöhtes Atemzugvolumen von $222,7 \pm 40 \mu\text{l}$ ($p < 0,05$). Entsprechend war die durchschnittliche Compliance der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse nach 30 Minuten Versuchsdauer mit $40,2 \pm 7,5 \mu\text{l}/\text{cm H}_2\text{O}$ signifikant erhöht gegenüber den Wildtyp-Kontrollen ($31,8 \pm 8,2 \mu\text{l}/\text{cm H}_2\text{O}$; $p < 0,05$).

Mikroskopisch fanden sich keine Unterschiede in HE-gefärbten Schnittpräparaten der Lungen adulter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse im Vergleich zu den $G\alpha_{i2}$ -Wildtyp Tieren (Abbildung 24). In beiden Versuchsgruppen zeigte sich eine regelrechte Anatomie des luftleitenden und gasaustauschenden Bronchialsystems ohne Hinweise auf bronchiale Verdickungen und entzündliche Veränderungen, es fanden sich darüber hinaus keine Hinweise auf strukturelle Veränderungen im Bereich der Alveolen.

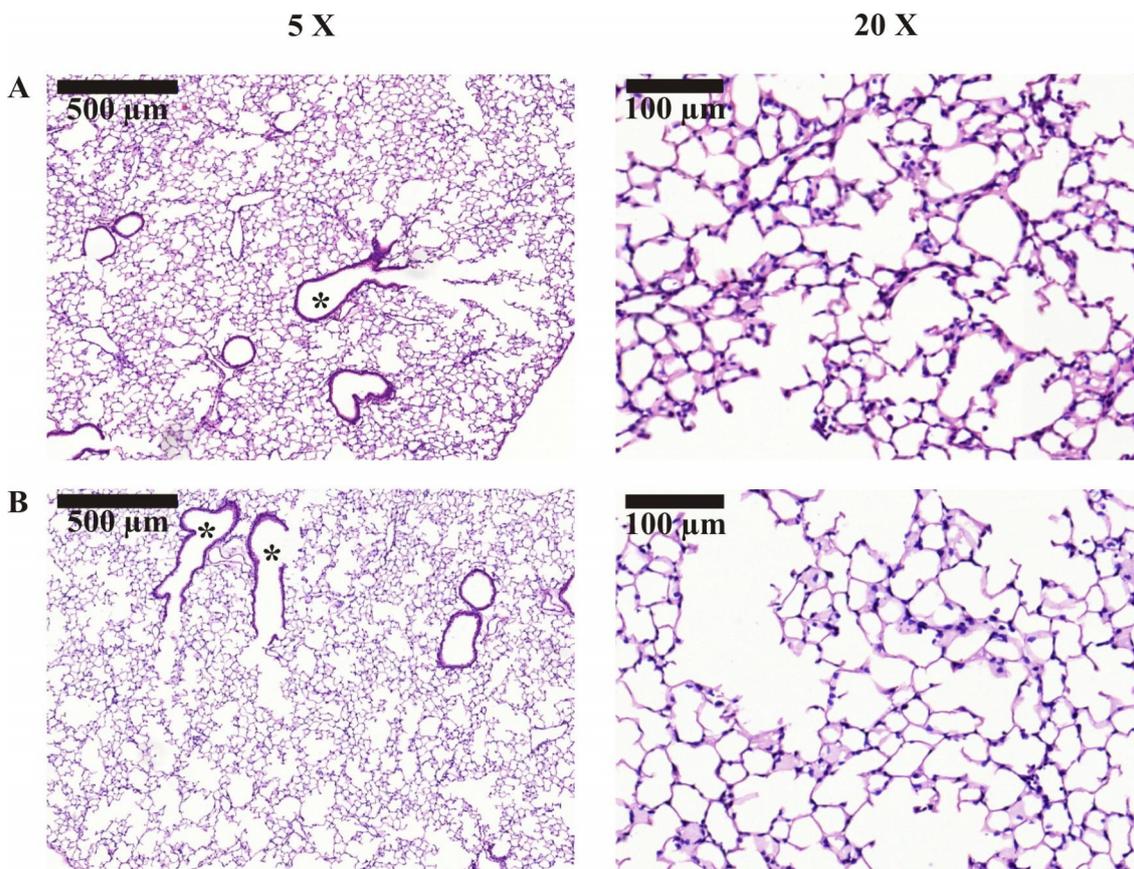


Abbildung 24: Repräsentative HE-gefärbte, 5 μm dünne Schnitte der Lunge von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ - (A) und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen (B) bei 5facher (links) und 20facher (rechts) Vergrößerung (Maßstab 500 μm bzw. 100 μm). Es finden sich keine Hinweise auf morphologische Veränderungen zwischen den Vergleichsgruppen. *: Bronchiolus terminalis.

3.5. Charakterisierung der murinen Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse

Da die $G\alpha_{i3}$ -Isoform nach $G\alpha_{i2}$ -Proteinen in peripheren Geweben die quantitativ vorherrschend exprimierte Isoform der G_i -Unterfamilie von $G\alpha$ -Untereinheiten darstellt, wurde im Folgenden die Lungenfunktion $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse mit Hilfe dem Modell der IPL untersucht und mit $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen verglichen. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse vergleichbaren Alters und Gewichts für die Versuche verwendet (Abbildung 32 im Anhang). So betrug das durchschnittliche Alter von Wildtyp-Tieren $13 \pm 1,5$ (n = 6) Wochen, von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen $14 \pm 1,5$ (n = 7) Wochen, das durchschnittliche Gewicht von Wildtyp-Tieren $26 \pm 1,6$ g (n = 6) und von $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen $26 \pm 1,3$ g (n = 7). Für beide Werte ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (p = 0,32 respektive p = 0,67).

Es zeigte sich, dass $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse einen signifikant erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu den $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen aufwiesen (Abbildung 25, Tabelle 6). Passend dazu waren die maximalen Flussgeschwindigkeiten der Atemstromstärke bei Inspiration und Expiration signifikant verringert bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen (Abbildung 26, Tabelle 6). Der mittlere pulmonalarterielle Druck bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren war tendenziell geringer, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Das Atemzugvolumen (TV) sowie die Compliance der Lungen zeigten keine Unterschiede zwischen $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen.

Analysierte man analog zu den $G\alpha_{i2}$ -Mäusen (s.o.) die Parameter Atemzugvolumen, Compliance, Resistance und den pulmonalarteriellen Druck gesondert zu festen Zeitpunkten (30, 60, 90, 120 min nach Versuchsbeginn) bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten- und Wildtyp-Tieren, so zeigte sich, dass der Atemwegswiderstand zu allen vier Zeitpunkten bei den $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren signifikant erhöht war gegenüber den Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 27).

Ergebnisse

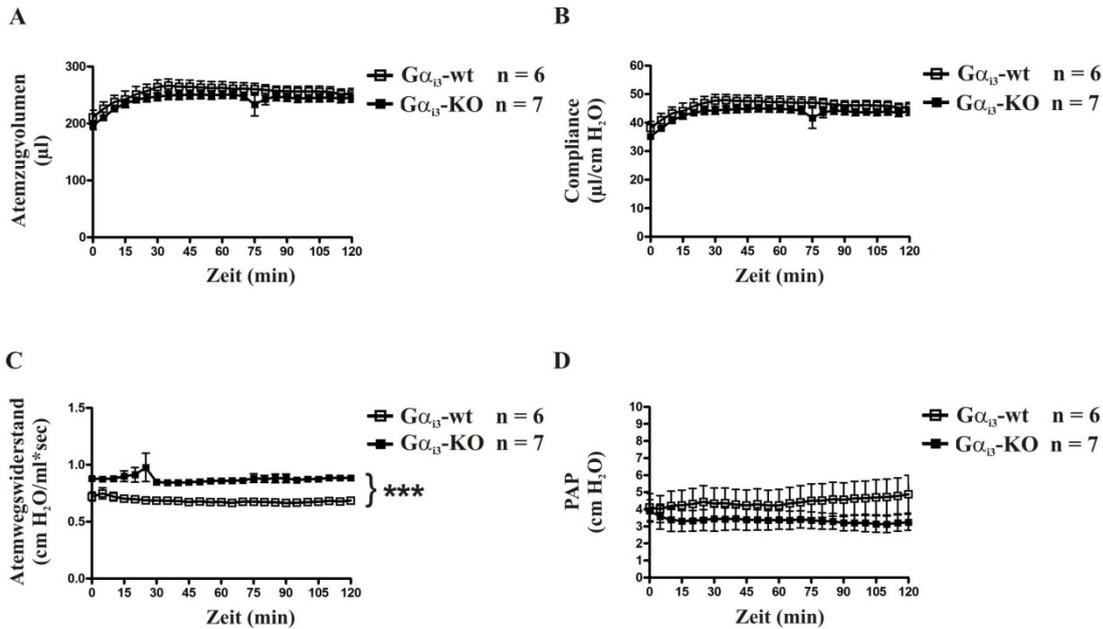


Abbildung 25: Darstellung des (A) Atemzugvolumens, der (B) Compliance, des (C) Atemwegwiderstands und des (D) mittleren pulmonalarteriellen Druckes (PAP) von $G\alpha_{13}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{13}^{-/-}$ (KO)-Mäusen über den Versuchszeitraum von 120 Minuten. $G\alpha_{13}$ -KO-Mäuse weisen einen über den Gesamtbeobachtungszeitraum signifikant erhöhten Atemwegwiderstand im Vergleich zu den $G\alpha_{13}^{+/+}$ -Mäusen auf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; *** p < 0,0001).

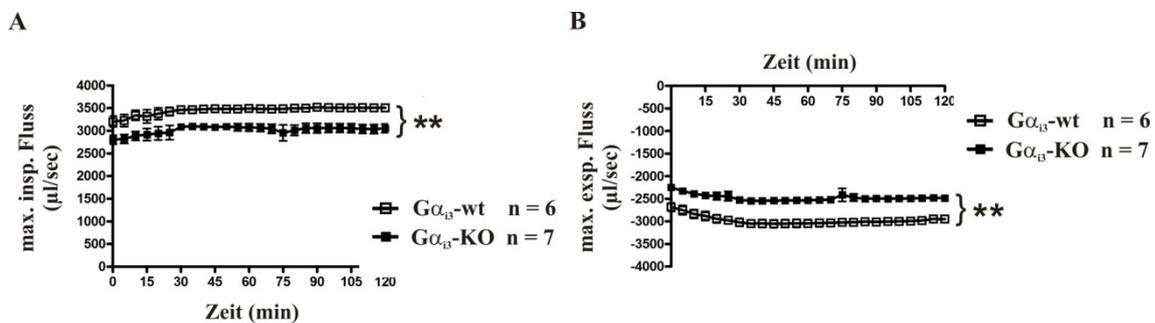


Abbildung 26: Maximaler (A) inspiratorischer und (B) expiratorischer Fluss von $G\alpha_{13}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{13}^{-/-}$ (KO)-Mäusen über den Versuchszeitraum von 120 Minuten. Die maximalen Flussgeschwindigkeiten der Atemstromstärke bei Inspiration und Expiration waren signifikant verringert bei $G\alpha_{13}$ -KO-Mäusen im Vergleich zu $G\alpha_{13}^{+/+}$ -Mäusen über den Gesamtbeobachtungszeitraum. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; ** p < 0,01).

Ergebnisse

Tabelle 6: Fläche unter der Kurve während einer 120-minütigen Versuchsdauer (AUC 0-120 min: Mittelwerte \pm SEM, n= 7-9), T-Test nicht gepaart. Der Atemwegswiderstand (R) ist signifikant erhöht bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen; $p < 0,05$ (max. insp/exsp. flow = maximaler inspiratorischer/ expiratorischer Fluss; n.s. nicht signifikant).

AUC (0-120min)	wt	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	p-Wert
max. insp. Flow [(μ l/sec) min]	414588 \pm 7225	362636 \pm 10258	$p < 0.01$
max. exsp. Flow [(μ l/sec) min]	357658 \pm 8534	297345 \pm 6833	$p < 0.01$
Atemzugvolumen (TV) [μ l min]	30609 \pm 1211	29088 \pm 812	n.s.
Atemwegswiderstand (Res) [(cmH ₂ O/ml/sec) min]	82,0 \pm 1,32	105 \pm 2,76	$p < 0,0001$
Compliance [(μ l/cmH ₂ O) min]	5526 \pm 221	5211 \pm 143	n.s.
mittlerer pulmonalerarterieller Druck[cmH ₂ O min]	531 \pm 112	401 \pm 66,2	n.s.

So liegt zum Beispiel nach 60 Minuten der mittlere Atemwegswiderstand von $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen bei $0,69 \pm 0,03$ cmH₂O/ml * sec, bei den $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen bei $0,85 \pm 0,03$ cmH₂O/ml * sec ($p < 0,0001$). Für die anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den beobachteten Zeitpunkten. So lag die durchschnittliche Compliance nach 60 Minuten Versuchsdauer von $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen bei $47,3 \pm 4,9$ μ l/cm H₂O (n=6) und bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren bei $44,9 \pm 3,3$ μ l/cm H₂O (n = 7); entsprechend das durchschnittliche Atemzugvolumen nach 60 Minuten Versuchsdauer von $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen bei $262,5 \pm 27,0$ μ l (n=6), bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren bei $250,7 \pm 18,1$ μ l/cm H₂O (n = 7); der durchschnittliche pulmonalerarterielle Druck nach 60 Minuten von $G\alpha_{i3}$ -Wildtyp Mäusen bei $4,2 \pm 2,3$ cm H₂O (n = 6) und bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren bei $3,4 \pm 1,4$ cm H₂O (n = 7).

Ergebnisse

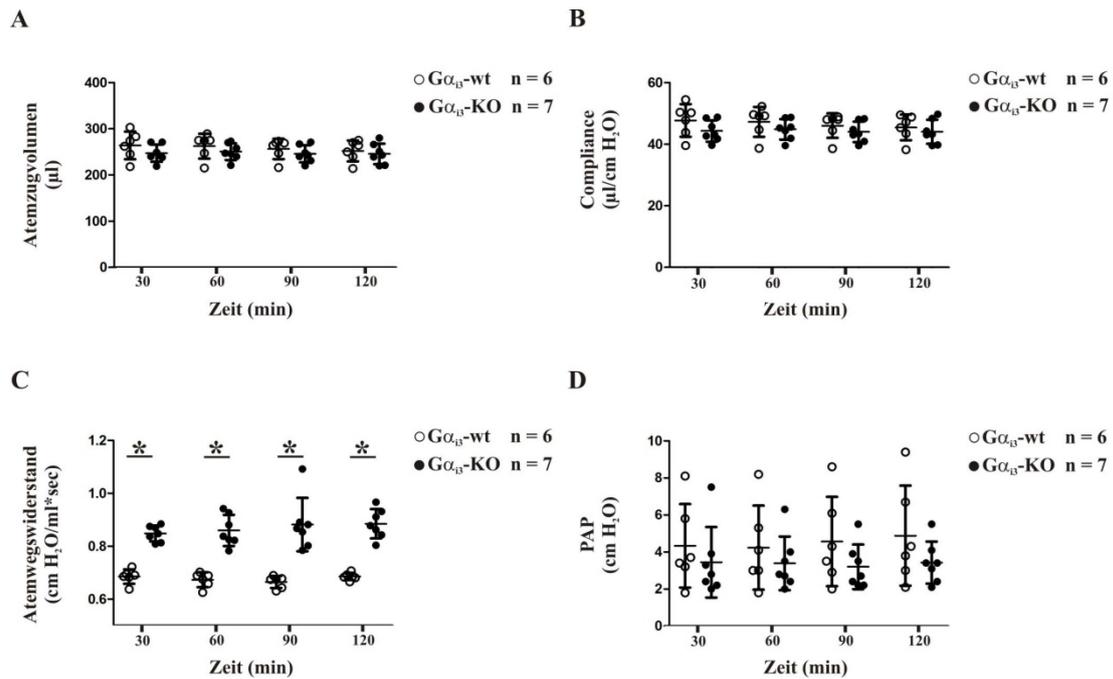


Abbildung 27: Bestimmung des Atemzugvolumens (A), der Compliance (B), des Atemwegwiderstands (C) und des pulmonalarteriellen Drucks (PAP; D) zu den jeweiligen Zeitpunkten 30 min, 60 min, 90 min, 120 min nach Versuchsbeginn von $G\alpha_{13}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{13}^{-/-}$ Mäusen. Der Atemwegwiderstand bei $G\alpha_{13}^{-/-}$ -Mäusen ist signifikant erhöht gegenüber den $G\alpha_{13}^{+/+}$ -Mäusen. Für die anderen Parameter ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind Punktediagramme mit den Einzelwerten von $G\alpha_{13}^{+/+}$ -Mäusen (weiße Punkte) bzw. $G\alpha_{13}^{-/-}$ -Mäusen (schwarze Punkte) mit den jeweiligen Mittelwerten \pm SD zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; * $p < 0,0001$).

3.6. Charakterisierung der murinen Lungenfunktion adulter Pertussistoxin-behandelter Mäuse

Pertussistoxin (Ptx) ADP-ribosyliert spezifisch die $G\alpha_i$ -Untereinheiten und verhindert dadurch die Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, was zu einer Inaktivierung G_i -abhängiger Signalwege führt (Nürnberg, 2000). Durch die Behandlung von Versuchsmäusen mit Pertussistoxin (Ptx) war es möglich die (akuten) Auswirkungen der Inaktivierung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege auf die Lungenfunktion mit Hilfe der IPL zu untersuchen. Dazu wurden Mäusen der Rasse C57/Bl6 48 Stunden vor Versuchsbeginn intraperitoneal Pertussistoxin (150 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) appliziert. Als Kontrollen dienten Mäuse, denen 48 Stunden vor Versuchsbeginn die äquivalente Menge an 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert wurden. Die analysierten Mäuse

Ergebnisse

waren zwischen 10-12 Wochen alt und wogen 22-26 g. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse für die Versuche benutzt.

Ptx-behandelte Mäuse wiesen dabei einen signifikant erhöhten pulmonalarteriellen Druck (PAP) auf (Abbildung 28, Tabelle 7). Ptx-behandelte Mäuse zeigten darüber hinaus ein tendenziell verringertes Atemzugvolumen bei entsprechend ebenfalls tendenziell verringerter Compliance auf. Beide Werte erreichten jedoch nicht das Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$. Der Atemwegswiderstand zeigte keine Unterschiede zwischen Pertussis-Toxin behandelten Mäusen und den Kontrollen.

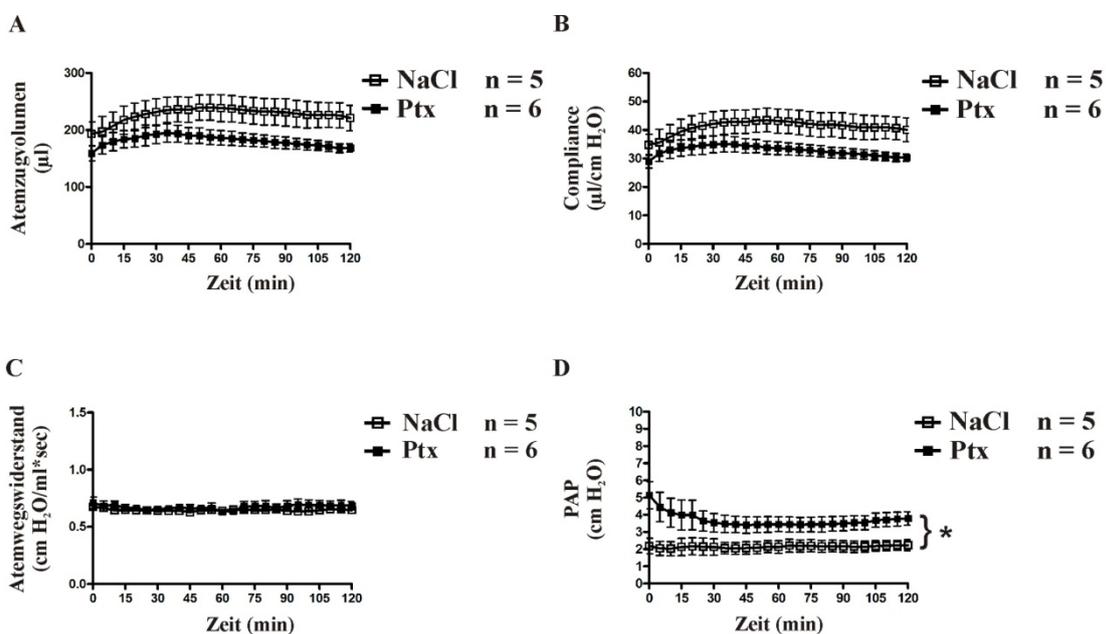


Abbildung 28: Darstellung des (A) Atemzugvolumens, der (B) Compliance, des (C) Atemwegswiderstands und des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP) von Pertussistoxin (Ptx) behandelten Mäusen und Placebo behandelten Kontrollen (NaCl) über den Versuchszeitraum von 120 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; * $p < 0,05$).

Auch hier wurden in Analogie zu 3.4 und 3.5 darüber hinaus die Parameter Atemzugvolumen, Compliance, Resistance und den pulmonalarteriellen Druck gesondert zu festen Zeitpunkten (30, 60, 90, 120 Minuten nach Versuchsbeginn) bei Ptx-behandelten Tieren und mit NaCl-behandelte Kontrollen analysiert (Abbildung 29). Es zeigte sich, dass der pulmonalarterielle Druck nach 30 Minuten bei Ptx-behandelten Tieren mit durchschnittlich $3,53 \pm 1,34$ cm H₂O tendenziell höher lag als bei Kontrollen mit $2,12 \pm 1,08$ cm H₂O ($p = 0,085$).

Ergebnisse

Tabelle 7: Fläche unter der Kurve während 120 Minuten Versuchsdauer (AUC 0-120 min: Mittelwerte \pm SEM, n = 7-9), unpaired t-test. Der mittlere pulmonalarterielle Druck ist signifikant erhöht bei Ptx-behandelten Mäusen. $P < 0,05$ (max. insp/exsp. flow = maximaler inspiratorischer/ expiratorischer Fluss, n.s. nicht signifikant).

AUC (0-120min)	Kontrollen	PTX-behandelt	p-Wert
max. insp. Flow [(μ l/sec) min]	441856 \pm 24738	378448 \pm 19901	n.s.
max. exsp. Flow [(μ l/sec) min]	345480 \pm 18457	309973 \pm 16534	n.s.
Atemzugvolumen (TV) [μ l min]	27353 \pm 2754	21796 \pm 1468	n.s.
Atemwegswiderstand (Res) [(cmH ₂ O/ml/sec) min]	78 \pm 1,6	81 \pm 3,1	n.s.
Compliance [(μ l/cmH ₂ O) min]	4952 \pm 502	3947 \pm 263	n.s.
mittlerer pulmonalarterieller Druck [cmH ₂ O min]	256 \pm 42	438 \pm 61	p < 0,05

Nach 60 Minuten lag der durchschnittliche Wert Ptx-behandelter Tiere bei $3,45 \pm 1,05$ cm H₂O und damit signifikant höher als bei Kontroll-Tieren mit $2,12 \pm 0,82$ cm H₂O ($p < 0,05$). Auch nach 90 Minuten ($3,48 \pm 1,05$ cm H₂O bei Ptx-behandelten Mäusen vs. $2,16 \pm 0,74$ cm H₂O bei Kontrollen, $p < 0,05$) sowie nach 120 Minuten Versuchsdauer ($3,78 \pm 0,97$ cm H₂O bei Ptx-behandelten Mäusen vs. $2,22 \pm 0,7$ bei Kontrollen, $p < 0,05$) erreichten die Unterschiede des pulmonalarteriellen Drucks zwischen Ptx-behandelten Tieren und Kontrollen das Signifikanzniveau. Die übrigen Werte für die weiteren Parameter Atemzugvolumen, Compliance und Atemwegswiderstand erreichten zu keinem der bestimmten Zeitpunkte signifikante Unterschiede. Tendenziell waren das Atemzugvolumen und die Compliance verringert bei Ptx-behandelten Tieren. So erreichte beispielsweise die durchschnittliche Compliance nach 60 Minuten Versuchsdauer bei Ptx-behandelten Tieren Werte von $33,6 \pm 5,5$ μ l/cm H₂O und $43,1 \pm 10,0$ μ l/cm H₂O bei Kontrollen. Entsprechend ergaben sich für das Atemzugvolumen nach 60 Minuten tendenziell verringerte Werte bei Ptx-behandelten Tieren ($186,2 \pm 32,6$ μ l, n = 6) im Vergleich zu Kontrollen ($238,4 \pm 52,8$ μ l).

Ergebnisse

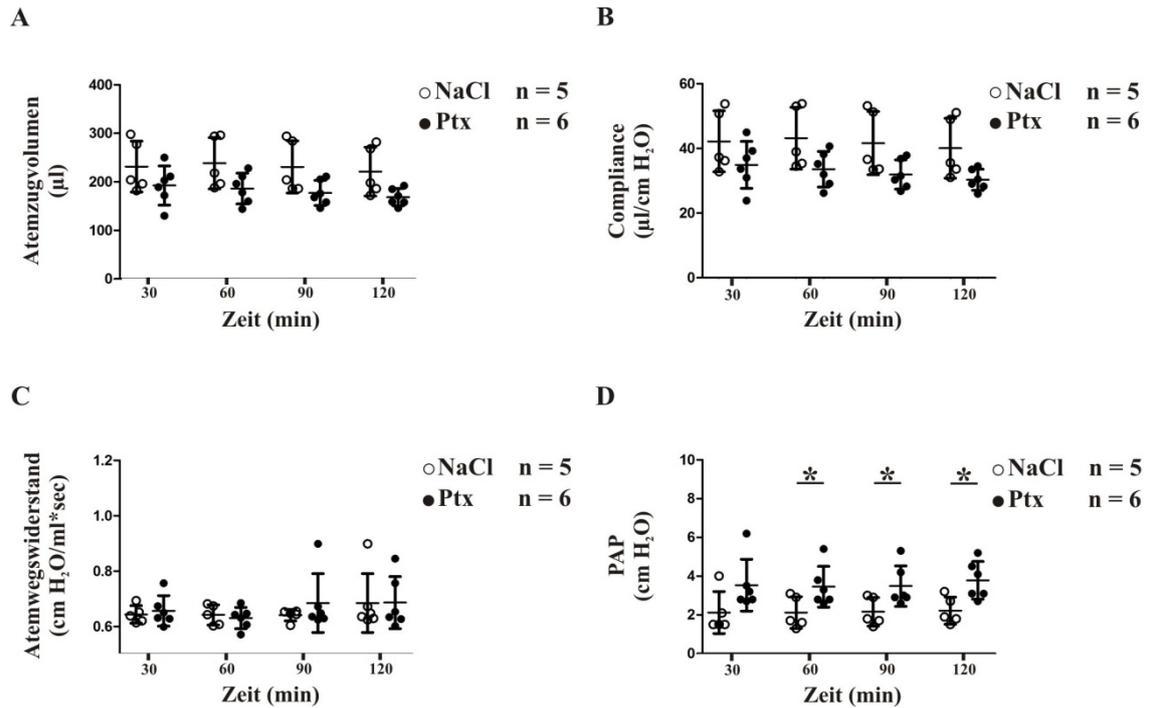


Abbildung 29: Darstellung des Atemzugvolumens (A), der Compliance (B), des Atemwegswiderstands (C) und des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (PAP, D) von Pertussistoxin (Ptx)-behandelten Mäusen und Placebo-behandelten Kontrollen (NaCl) zu den Versuchszeitpunkten 30, 60, 90 und 120 Minuten. Der pulmonalarterielle Druck (PAP) bei Ptx-behandelten Mäusen ist nach jeweils 60, 90, und 120 Minuten signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Für die anderen Parameter ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind Punktediagramme mit den Einzelwerten von Kontrollen (weiße Punkte) bzw. Ptx-behandelten Mäusen (schwarze Punkte) mit den jeweiligen Mittelwerten \pm SD zu den verschiedenen Messzeitpunkten (n = Anzahl der untersuchten Mäuse; * $p < 0,05$).

4. Diskussion

Es ist für das Verständnis von $G\alpha_i$ -abhängigen Signalwegen von zentraler Bedeutung zu klären, ob die einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen gemeinsame, d.h. redundante oder jeweils spezifische Funktionen im Organismus erfüllen. Anders formuliert, interessiert die Frage, ob die einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen in den verschiedenen G-Protein-gekoppelten Signalwegen innerhalb des Organismus einen Beitrag zur Spezifizierung dieser Signalwege leisten. Zur möglichen Beantwortung dieser Frage wurden Gen-defiziente Mauslinien für die entsprechende $G\alpha_{i1}$ -, $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Isoform als Modellorganismen generiert (Gohla *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995), aus deren Untersuchung des Phänotyps Rückschlüsse auf die jeweilige Funktion des Gens im Organismus gewonnen werden sollen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse die Rolle dieser $G\alpha_i$ -Isoform für die perinatale Überlebensfähigkeit der Maus untersucht. Darüber hinaus sollte die biologische Relevanz der $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Isoform in Hinblick auf die Abgrenzung von gemeinsamen gegenüber Gen-spezifischen Funktionen für die Lungenfunktion adulter Mäuse abgeklärt werden.

4.1 Charakterisierung neonataler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

4.1.1. Perinatale Sterblichkeit

Bereits die Erstbeschreibung der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mauslinie (Rudolph *et al.* 1995) ließ erkennen, dass nach Verpaarung heterozygoter ($G\alpha_{i2}^{+/-}$) Elterntiere die Genotypenverteilung der Nachkommen nicht nach den Mendel'schen Regeln erfolgte. Die zu erwartende Verteilung wt : heterozygot : knockout war nicht 1:2:1, sondern die Anzahl $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ($G\alpha_{i2}^{-/-}$) war vier Wochen nach Geburt um etwa die Hälfte reduziert. Der Zeitrahmen, innerhalb dessen $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse verstarben, konnte durch unsere Arbeitsgruppe näher eingegrenzt werden. So entsprach der Anteil $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse am Embryonalentwicklungstag e18 weiterhin der zu erwartenden Verteilung 1:2:1, wohingegen bereits zwischen den postnatalen Tagen 5 bis 10 die Anzahl der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse etwa 50 % reduziert war. Dabei zeigte

Diskussion

sich die die verminderte Lebensfähigkeit $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse unabhängig vom genetischen Hintergrund sowohl bei C57/Bl6- als auch bei Sv129-Mäusen (Tabelle 3). Darüber hinaus wurde in einer ersten Untersuchung gefunden, dass etwa ein Anteil von 40,5 % (15 von 37) der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse innerhalb der ersten zwei Stunden nach Geburt verstarb, während die postnatale Sterblichkeit bei heterozygoten Tieren nur 14,6 % betrug (Pexa, 2012). Die meisten Mäuse wurden innerhalb von 10 Minuten nach der Sectio als tot befunden, weshalb unsere Arbeitsgruppe zunächst vermutete, dass es zu keiner postnatalen Entfaltung der Lungen bei diesen Tieren kommt. Passend dazu zeigten diese Mäuse ein auffälliges Atemmuster und histologische Untersuchungen deuteten auf eine Veränderung der Lungenstruktur mit einer signifikanten Reduktion der Alveolarfläche hin. Zweifel an der Vermutung der fehlenden postnatalen Entfaltung der Lungen wurden jedoch dadurch genährt, dass die Lungen einer Maus, die erst nach ca. 80 Minuten verstarb, histologisch ebenfalls eine fehlende Lungenentfaltung aufwies. Diese primären Befunde würden demnach folgende Hypothesen nahelegen, die in der vorliegenden Arbeit geprüft werden sollten:

1. Das Fehlen der im Lungengewebe prädominant exprimierten $G\alpha_{i2}$ -Isoform ist wesentlich für die perinatale Sterblichkeit verantwortlich.
2. Der Todeszeitpunkt $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse tritt überwiegend innerhalb der ersten Stunden nach Geburt auf, wobei Anzeichen bestehen, dass eine Ursache des Todeseintritts in einer mangelnden Ausreifung des kardio-respiratorischen Systems der Mäuse zu suchen ist.
3. Der $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Genotyp führt mit ~40 %iger Penetranz zur perinatalen Sterblichkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun homozygote ($G\alpha_{i2}^{-/-}$ x $G\alpha_{i2}^{-/-}$) Verpaarungen angesetzt und die perinatale Sterberate $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse statistisch überprüft. Dabei konnte bestätigt werden, dass 20 % (10 von 49) der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse innerhalb der ersten Stunden nach Geburt versterben. Der mediane Zeitpunkt des Todeseintritts betrug 22 Minuten. Nur bei einem der neugeborenen Tiere, die innerhalb des Gesamtbeobachtungszeitraumes von 180 Minuten verstarben, trat der Tod erst nach 80 Minuten ein. Demnach konnte auch in dieser Studie überwiegend ein rasch nach der Geburt eintretender Tod der Neugeborenen festgestellt werden. Allerdings war mit

Diskussion

durchschnittlich 22 Minuten die Überlebensdauer nur schwer vereinbar mit einem Fehlen der postnatalen Lungenentfaltung.

Die in unserem Fall ermittelte postnatale Sterberate (ca. 20 %) ist leicht geringer als die zuvor beschriebene mit ca. 40 %. Man beachte jedoch, dass sich in beiden Untersuchungen auch die Sterberate der jeweiligen Kontrollgruppe unterscheidet. Möglicherweise sind die Unterschiede der Sterberaten in den unterschiedlichen Verpaarungsmodi begründet (homozygote versus heterozygote Verpaarungen). Die in dieser Arbeit untersuchten $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse stammten aus 6 Würfen mit einer überraschend großen Anzahl von 7-10 Nachkommen bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von $8,8 \pm 1,2$ ($n = 6$), wohingegen die durchschnittliche Wurfgröße von Pexa $3,5 \pm 2,2$ ($n = 13$) betrug. Es ist bekannt, dass postnatale Faktoren im mütterlichen Umfeld die Reproduktionsfähigkeit beeinflussen. So zeigen beispielsweise Muttertiere, die aus einem großen Wurf stammen, im reproduktionsfähigen Alter ein reduziertes Körpergewicht und selbst geringere Wurfgrößen ihrer Nachkommen (Falconer, 1965). Demnach erscheint es auch möglich, dass die Unterschiede in der Wurfgröße und auch der perinatalen Letalität auf Faktoren zurückzuführen sind, die in Zusammenhang mit dem Umzug der Arbeitsgruppe aus Düsseldorf nach Tübingen und den verschiedenen sich hieraus ergebenden Laborbedingungen stehen.

Interessant erscheinen Ergebnisse von Gohla *et al.* zur Erforschung Gen-spezifischer Funktionen von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ (Gohla *et al.*, 2007). Hierbei wurden Mäuse, die homo- oder heterozygot für inaktivierte $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Allele waren, untereinander verpaart und die $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -defizienten Nachkommen untersucht. Es zeigte sich, dass $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppelt-defiziente Mäuse ausgeprägte intrauterine Wachstumsstörungen aufwiesen und um den embryonalen Tag 10 versterben. $G\alpha_{i2}^{-}/G\alpha_{i3}^{+/-}$ -Mäuse, die ein funktionell aktives $G\alpha_{i3}$ -Allel besitzen, wiesen keine morphologischen Unterschiede während der Embryonalphase auf, verstarben jedoch perinatal. $G\alpha_{i2}^{+/-}/G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse, die ein funktionell aktives $G\alpha_{i2}$ -Allel besitzen, waren bis über die Perinatalzeit lebensfähig, ihr postnatales Überleben war jedoch um 2/3 reduziert. Die Autoren folgern hieraus, dass ein funktionell aktives $G\alpha_{i3}$ -Allel ausreichend für die Embryonalentwicklung ist, während mindestens ein funktionell aktives $G\alpha_{i2}$ -Allel für das extrauterine Leben erforderlich ist. Interessant wäre die Klärung der Frage, ob der neonatale Phänotyp und die Todesursache $G\alpha_{i2}^{-}/G\alpha_{i3}^{+/-}$ -Mäuse dem der „rein“ $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse

entspricht, nur eben mit einer 100 %igen Penetranz auftritt. Diese Überlegung ist insofern von Bedeutung, da es bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen innerhalb der verschiedenen Gewebe zu einer kompensatorischen Hochregulation der verbleibenden $G\alpha_{i3}$ -Isoform kommt (Leiss *et al.*, 2014; Wiege *et al.*, 2013). Demnach könnte es im Falle der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse zu einem gewissen Prozentsatz zu einer funktionell erfolgreichen Kompensation durch die $G\alpha_{i3}$ -Isoform kommen, während bei $G\alpha_{i2}^{-}/G\alpha_{i3}^{+/-}$ -Mäusen das eine verbleibende funktionell aktive $G\alpha_{i3}$ -Allel für eine Kompensation nicht ausreicht. Diese Hypothese kann anhand von Untersuchungen des neonatalen Phänotyps $G\alpha_{i2}^{-}/G\alpha_{i3}^{+/-}$ -Mäuse überprüft werden.

4.1.2. Somato- und Organometrie

Unter klassischen Haltungsbedingungen zeigen $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse im Verlauf des Lebens eine zunehmende Verringerung des Körpergewichts im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Wiege *et al.* 2013). Es stellt sich die Frage, ob $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse bereits nach der Geburt eine Verringerung des Körpergewichts und der Organgewichte zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Phänotyp neonataler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse untersucht werden. Hierzu wurden die grundsätzlichen Parameter Körperlänge und –gewicht, sowie die einzelnen Organgewichte von neugeborenen Mäusen bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl das Körpergewicht (signifikant), als auch die einzelnen Organgewichte von Herz, Lunge, Nieren (allesamt signifikant) und Leber (tendenziell) bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen verringert waren. Somit erscheint die Hypotrophie $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ein Phänomen zu sein, dass den gesamten Organismus betrifft inklusive aller der hier untersuchten Organe.

Darüber hinaus fanden sich keine Unterschiede in der Somato- und Organometrie zwischen verstorbenen und überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen außer beim Nierengewicht, das interessanterweise signifikant erhöht war bei verstorbenen Mäusen. Die Ursachen hierfür bleiben vorerst ungeklärt, zumal sich lichtmikroskopisch keine Unterschiede in der Nierenmorphologie zeigten (Abbildung 30 B im Anhang).

Die erhobenen Befunde könnten demnach auf eine spezifische Funktion von $G\alpha_{i2}$ bei der allgemeinen Vermittlung von (intrauterinen) Wachstumsprozessen hinweisen, insbesondere am Herzen. Denn interessanterweise war einzig das spezifische

Diskussion

Organgewicht (also das Organgewicht bezogen auf das Körpergewicht) von Herzen $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen reduziert, was nichts Anderes bedeutet, als dass das Herzgewicht überproportional im Verhältnis zum Körpergewicht verringert ist. Die Wachstumsretardierung neonataler $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse tritt überdies unabhängig vom Versterben der Tiere auf und scheint somit ein von der perinatalen Letalität unabhängiges Phänomen zu sein.

Es ist in diesem Zusammenhang interessant anzufügen, dass weitere *in-vivo*-Befunde von Moxham *et al.* mithilfe transgener Mausmodelle, die die Expression von $G\alpha_{i2}$ durch $G\alpha_{i2}$ -spezifische antisense RNA unterdrücken, auf eine Bedeutung von $G\alpha_{i2}$ bei der Vermittlung von neonatalem (Organ-)Wachstum hinweisen (Moxham *et al.*, 1993). Interessanterweise beschreiben die Autoren bei Mäusen, in denen die Expression von $G\alpha_{i2}$ unterdrückt wurde, zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der ersten 24 Wochen nach Geburt eine 20-30 %ige Reduktion des Körpergewichts bei gleicher Nahrungsaufnahme im Vergleich zu Kontrollen. Des Weiteren korrelierte die Reduktion einzelner Organgewichte mit dem Erfolg der Suppression von $G\alpha_{i2}$. Diese Befunde stützen die Hypothese einer Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ bei der Vermittlung von Organwachstum.

4.1.4. Mögliche Todesursache $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

Auf der Suche nach den Ursachen des perinatalen Todes $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse fanden wir, dass diese Anzeichen eines Atemnotsyndroms zeigten. Bei der mikroskopischen Analyse der Lungen verstorbener Tiere ließ sich eine kompakte, spärlich entfaltete Lungenstruktur nachweisen. Die terminalen Endaussackungen des sich verzweigenden Bronchialsystems (= primitive Alveolen) erschienen bei verstorbenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen verdichtet und wenig expandiert. Die interalveolären Septen zeigten sich verdickt im Vergleich zu überlebenden sowohl $G\alpha_{i2}$ -defizienten als auch Wildtyp Tieren. Die morphometrische Analyse der Lungenstruktur verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ergab einen signifikant reduzierten Anteil der primitiven Alveolarfläche zur Gesamtfläche der Lunge im Vergleich zu überlebenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten und Wildtyp

Diskussion

Mäusen. Entsprechend war der mesenchymale Zellanteil signifikant erhöht bei verstorbenen Tieren.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass am Ende der Schwangerschaft und dem Beginn des extrauterinen Lebens die Lunge eines Organismus strukturell und funktionell so ausgereift sein muss, dass sie die zentrale Aufgabe des Gasaustausches übernehmen kann. Vor diesem Hintergrund kann die von $\text{G}\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen präsentierte Symptomatik des Atemnotsyndroms zusammengekommen mit den lichtmikroskopischen Befunden der kompakten, spärlich entfalteten Lungenstruktur als deutlicher Hinweis aufgefasst werden, dass ein Zusammenhang zwischen der mangelnden Lungenentfaltung und dem Versterben der Tiere besteht.

Aufgrund der extrem geringen Menge an arteriellem Blut, das bei neugeborenen Mäusen zur Verfügung steht, konnte kein direkter Nachweis der mangelnden Sauerstoffzufuhr und CO_2 -Abatmung mittels Blutgasanalyse als Beleg für die These des Versterbens an einer mangelnden Entfaltung der Lungen erbracht werden. So ist es zwar nicht ausgeschlossen, dass die Todesursache in einer Dysfunktion anderer Organsysteme begründet liegt. Dies erscheint jedoch vor dem Hintergrund der lichtmikroskopisch unauffälligen Morphologie der anderen Organe, insbesondere des Herzens, unwahrscheinlich.

Die Ursache der kompakten Lungenstruktur bleibt vorerst ungeklärt. Es fanden sich keine Hinweise darauf, dass die Embryonalentwicklung der Lungen $\text{G}\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse zumindest bis Embryonaltag e 17,5 gestört ist. Die elektronenmikroskopische Analyse der subzellulären Struktur von Lungen $\text{G}\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse ergab keine Hinweise auf eine Differenzierungsstörung des Lungengewebes, deutete allerdings darauf hin, dass möglicherweise eine Fehlorganisation und Fehlfunktion der oberflächenaktiven Substanz der Lunge, dem Surfactant, mitbeteiligt an der mangelnden Entfaltung der Lungen verstorbenen Tiere ist. Die beobachtete mangelnde strukturelle Ausbildung von tubulärem Myelin (und folglich wahrscheinlich auch einschichtigem funktionellem Surfactant an der Luft-Flüssigkeits-Grenze der Alveolen) könnte durch eine Erhöhung der Oberflächenspannung ein Kollabieren der Alveolen fördern und zur mikroskopisch beobachteten kompakten, spärlich entfalteten Lungenstruktur beitragen. Dagegen steht der bei den Atemversuchen von versterbenden Tieren beobachtete Eindruck einer sich initial gut entfaltenden Lunge, was für ein erst sekundäres

Diskussion

Kollabieren der Lunge sprechen würde. Es ist denkbar, dass $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse mit Atemnotsyndrom direkt nach Geburt noch in der Lage sind die zur Lungenentfaltung vermehrt benötigte Kraft aufzubringen, ehe sie sich mit der Zeit muskulär erschöpfen und die Lunge erneut kollabiert.

Bereits mehrere Arbeiten zeigen, dass G-Protein-gekoppelte Signalwege im Allgemeinen eine Rolle bei der Entwicklung der Lunge spielen. So versterben α_{2B} -Adrenorezeptor-defiziente Mäuse ebenfalls zum Großteil innerhalb der ersten Stunden nach Geburt mit den Anzeichen einer Zyanose (Haubold *et al.*, 2010). Der α_{2B} -Adrenorezeptor koppelt interessanterweise primär an $G\alpha_{i2}$ (Albarran-Juarez *et al.*, 2009). Auch bei α_{2B} -Adrenorezeptor-defizienten Mäusen konnten eine verringerte Alveolarfläche und zellreiche, verdickte interalveoläre Septen nachgewiesen werden. Die lichtmikroskopischen Befunde waren dabei von einer Überexpression von Sonic hedgehog, einem sekretorischen Protein, dem eine wichtige Rolle als Morphogen während der Embryonalentwicklung zukommt, begleitet. Der veränderte Lungenphänotyp bei α_{2B} -Adrenorezeptor-defizienten Mäusen war durch Hemmung Sonic hedgehog-abhängiger Signalwege teilweise reversibel.

Des Weiteren konnte eine Funktion G-Protein-gekoppelter Signalwege für die Lungenentwicklung durch eine Arbeit von Bird *et al.* demonstriert werden. Mäusen mit einer Defizienz des cAMP response element binding protein 1 (Creb1) versterben interessanterweise nach Geburt an einem Atemversagen (Bird *et al.*, 2011). Sie wiesen dabei einen Abbruch der Lungenausreifung nach Embryonaltag 16 auf. Dabei zeigten die Autoren einen deutlich verringerten Alveolarflächenanteil sowie elektronenmikroskopisch eine deutliche Reduktion differenzierter Typ-I und -II-Alveolarzellen auf. Creb1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert wird und die Genexpression diverser Zielgene reguliert und somit ebenfalls als Bestandteil G-Protein-gekoppelter Signalwege zu verstehen ist.

Auf eine mögliche direkte Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ bei der Entwicklung und Wachstum von fetalem respiratorischem Epithel der Ratte konnte ebenfalls hingewiesen werden (Kinane *et al.*, 1999). Auch eine mögliche Beteiligung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege bei der Regulation der Surfactantsekretion wurde bereits beobachtet. So konnte die Expression sowohl von $G\alpha_i$ -Proteinen als auch $G\alpha_i$ -Protein-gekoppelter adrenerger und

purinergere Rezeptoren in Typ-II-Alveolarzellen nachgewiesen werden (Chander *et al.*, 1990; Pian *et al.*, 1994). Interessanterweise bewirkte eine funktionelle Inaktivierung der $G\alpha_i$ -Proteine durch Pertussistoxin (Ptx) eine Inhibition der Surfactant-Sekretion (Pian *et al.*, 1994).

Zusammenfassend deuten die Befunde aus der Literatur und die eigenen Forschungsergebnisse auf Folgendes hin: G-Protein-gekoppelte Signalwege spielen eine kritische Rolle bei der späten Lungenentwicklung und -funktion der Maus. In diesem Fall konnte darauf hingewiesen werden, dass $G\alpha_{i2}$ für die perinatale Lungenfunktion und das Überleben der Maus eine wichtige Rolle spielt. Somit erscheint die Hypothese begründet, dass $G\alpha_{i2}$ als Bestandteil G-Protein-gekoppelter Signalwege eine (teil)spezifische Funktion an der Regelung des komplexen Geschehens perinataler Anpassungsprozesse und der Lungenausreifung übernimmt.

Die Aufklärung der genauen Mechanismen, die bei einem Fehlen von $G\alpha_{i2}$ zu den beobachteten Veränderungen in der Lungenmorphologie führen, bedarf der weiteren Untersuchung. Sinnvoll erscheint hierzu insbesondere die Untersuchung des Surfactant der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse. Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung des Surfactant verstorbenen Mäuse könnten als weiterer Beleg für eine dem perinatalen Versterben zugrunde liegende respiratorische Dysfunktion aufgefasst werden. Auch der Einsatz Gewebe- oder Zelltyp spezifischer konditionaler Mausmodelle ermöglicht eventuell eine weitere Eingrenzung der möglichen Todesursache und ist Gegenstand der weiterführenden Forschung.

4.2. Die Funktion $G\alpha_i$ -gekoppelter Signalwege für die adulte Lungenfunktion der Maus

Die erhobenen Befunde bei der Untersuchung des neonatalen Phänotyps $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse legen eine kritische Funktion von $G\alpha_{i2}$ für die perinatalen Anpassungsvorgänge der Lunge und die perinatale Überlebensfähigkeit von Mäusen nahe. Es interessierte als nächstes die Frage, ob überlebende $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse als adulte Tiere eine Veränderung der Lungenfunktion und -morphologie aufweisen. Über gemeinsame und spezifische Funktionen von einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen in verschiedenen

Diskussion

Systemen *in vivo* wurde bereits berichtet (siehe 1.1.5.). Im Rahmen dieser Arbeit sollte darüber hinaus die Rolle der im Lungengewebe vorherrschend exprimierten $G\alpha_i$ -Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ (Persönliche Mitteilung von Frau Dr. Ana Novakovic aus unserer Arbeitsgruppe) analysiert und die Frage nach gemeinsamen bzw. spezifischen Funktionen dieser $G\alpha_i$ -Isoformen untersucht werden.

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über alle signifikanten Unterschiede der physiologischen Parameter der $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, und Ptx-behandelten Mäuse bezogen auf die jeweilige Wildtyp-Kontrollgruppe.

Tabelle 8: Übersicht der einzelnen physiologischen Parameter von $G\alpha_{i2}^{-/-}$, $G\alpha_{i3}^{-/-}$ und Ptx-behandelten Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen entsprechend der Versuchsergebnisse aus 3.4 – 3.6. Dargestellt sind tendenziell erhöhte [(↑) n. s.], tendenziell verringerte [(↓) n. s.], signifikant erhöhte [↑ p-Wert], signifikant verringerte [↓ p-Wert] Parameter sowie keine relevant feststellbaren Unterschiede [(↔) n. s.] der jeweiligen Gruppe im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (n. s. nicht signifikant).

AUC (0-120min)	$G\alpha_{i2}^{-/-}$	$G\alpha_{i3}^{+/+}$	Ptx-behandelt
max. insp. Flow. [(μ l/sec) min]	↑ < 0,05	↓ < 0,05	(↓) n. s.
max. exp. Flow. [(μ l/sec) min]	↑ < 0,05.	↓ < 0,05	(↓) n. s.
Atemzugvolumen (TV) [μ l min]	↑ < 0,05	(↔) n. s.	(↓) n. s.
Atemwegswiderstand (Res) [cmH ₂ O/ml/sec) min]	(↔) n. s.	↑ < 0,0001.	(↔) n. s.
Compliance [(μ l/cmH ₂ O) min]	↑ < 0,05	(↔) n. s.	(↓) n. s.
Mittl. Pulmonalarterieller Druck [cmH ₂ O min]	(↑) n. s.	(↓) n. s.	↑ < 0,05

4.2.1. Die Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse

Interessanterweise wiesen adulte $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse mit Hilfe des Modells der IPL ein signifikant erhöhtes Atemzugvolumen sowie Compliance der Lunge über die Gesamtversuchsdauer gegenüber Wildtyp Kontrollen auf. Dies überrascht insofern, als

Diskussion

dass die um die Geburt versterbenden $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse ein Atemnotsyndrom und spärlich entfaltete Lungen aufwiesen, was gerade auf eine Verringerung der Lungendehnbarkeit hinweist. Insofern scheinen jene $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse, die den kritischen Zeitraum der Perinatalperiode überleben und nicht an den Folgen einer Fehlfunktion der Lunge in Form einer mikroskopisch verdichteten Lungenstruktur versterben, als adulte Tiere unter basalen Bedingungen eine normale Lungenfunktion und –morphologie aufzuweisen, und zwar mit einer vergrößerten Lungendehnbarkeit. Das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ wird in diesen Fällen für die Funktion der Lunge folglich weitgehend kompensiert. Frau Dr. Ana Novakovic konnte in diesem Zusammenhang in den Lungen der adulten $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen eine kompensatorische Hochregulation der „steady state“- $G\alpha_{i3}$ -Proteinkonzentration nachweisen (Persönliche Mitteilung durch Frau Dr. Ana Novakovic, eigene Arbeitsgruppe). Ob dabei ein kausaler Zusammenhang zwischen der Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ im Lungengewebe und der Veränderung der Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse mit einer erhöhten Lungendehnbarkeit besteht, bleibt zunächst eine interessante Hypothese. Es sei darauf hingewiesen, dass die Compliance der Lunge ein Parameter ist, der von vielen, zum Großteil unbekanntem umweltbedingten und genetischen Faktoren abhängt, was u.a. bereits durch die enorme Variabilität der Compliance bei unterschiedlichen Mausstämmen ableitbar ist (Held *et al.*, 2000). Die innerhalb dieser Arbeit bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen gemessenen Compliance-Werte befinden sich dabei innerhalb des physiologischen Spektrums. Die Frage, ob also die diskrete Erhöhung der Compliance bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen einen spezifischen Effekt des Verlusts von $G\alpha_{i2}$ (beispielweise durch Veränderungen in der Surfactant-Homöostase) darstellt oder aber ein Artefakt, erfordert weitere Untersuchungen. Auch hier könnte der Einsatz von Zelltyp spezifischen konditionalen Knockout Mausmodellen (in diesem Falle am ehesten eine Typ-II-Alveolarzell-spezifische $G\alpha_{i2}$ -Defizienz) nähere Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichen.

4.2.2. Die Lungenfunktion adulter $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse

Im Gegensatz zu $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusen zeigten $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse keine Veränderungen des Atemzugvolumens und der Compliance im Vergleich zu Wildtyp

Diskussion

Kontrollen. Interessanterweise wiesen sie jedoch einen um ca. 23 % signifikant erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu Wildtyp Mäusen auf und passend dazu ebenfalls signifikant reduzierte Flussgeschwindigkeiten während der In- und Expiration. Wie die Compliance der Lunge, so ist auch der Atemwegswiderstand eine physiologische Größe, die von vielen Faktoren beeinflusst wird, wie beispielsweise dem Lungenvolumen, den elastischen Eigenschaften der Lunge, bronchialen Verdickungen und Obstruktionen der luftleitenden Atemwege (Bosse *et al.*, 2010). Mikroskopische Untersuchungen wurden in diesem Falle nicht durchgeführt, die Aufschluss über eventuell zugrunde liegende morphologische Veränderungen geben könnten. Zweifelsohne kommt aber dem Tonus der glatten Bronchialmuskulatur eine entscheidende Bedeutung bei der Beeinflussung des Atemwegswiderstands zu. Die Regulation von Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen der Bronchialwände wurde klassischerweise $G\alpha_q$ - und $G\alpha_s$ -Protein gekoppelten Signalwegen zugeordnet (Billington *et al.*, 2003). Eine Reihe von Arbeiten haben jedoch eine Hochregulation von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in glatten Muskelzellen der Bronchialmuskulatur von Asthma-Mausmodellen demonstriert (Grunstein *et al.*, 2000; Hakonarson *et al.*, 1996). Arbeiten von McGraw *et al.* konnten darauf hinweisen, dass $G\alpha_{i2}$ eine modulierende Funktion bei der Regulation M_3 -Acetylcholinrezeptor- und β_2 -Adrenorezeptor-vermittelter Tonusveränderungen der glatten Bronchialmuskulatur spielt (McGraw *et al.*, 2007). Dabei kam es bei $G\alpha_{i2}$ -überexprimierenden Mäusen zu einer verminderten Bronchokonstriktion nach Metacholingabe, die von einer verringerten Phospholipase C Expression begleitet wurde und auf eine Beeinflussung $G\alpha_q$ -abhängiger Signalwege durch $G\alpha_{i2}$ hinweist. Eine β_2 -Adrenorezeptor-vermittelte Bronchusrelaxation war dagegen verringert in $G\alpha_{i2}$ -überexprimierenden Mäusen. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass die zugrunde liegende Ursache der Erhöhung des Atemwegswiderstands $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse in einer Fehlregulation des Tonus der glatten Bronchialmuskulatur begründet liegt. Es wäre interessant zu überprüfen, ob die Reaktion $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse auf bronchokonstriktorisch bzw. -dilatatorisch wirkende Substanzen verändert ist. Zukünftige Untersuchungen sind nötig, um die Frage zu klären, ob $G\alpha_{i3}$ eine spezifische Funktion bei der Regulation des Muskeltonus der glatten Muskelzellen der Bronchialmuskulatur ausübt und dadurch an der Regulation des Atemwegswiderstands beteiligt ist.

4.2.3. Die Lungenfunktion Pertussistoxin behandelter Mäuse

Pertussistoxin (Ptx) ADP-ribosyliert spezifisch die $G\alpha_i$ -Untereinheiten und verhindert dadurch die Interaktion mit G-Protein-aktivierenden Rezeptoren, was zu einer Inaktivierung G_i -abhängiger Signalwege führt (Nürnberg, 2000). Ptx ermöglicht damit die Erforschung der Auswirkungen einer Hemmung G_i -abhängiger Signalwege, ohne dass es zu einer Kompensation durch Heraufregulation anderer $G\alpha_i$ -Isoformen kommt. Ptx-behandelte Mäuse wiesen ein tendenziell verringertes Atemzugvolumen und entsprechend eine Verringerung der Compliance der Lunge auf. Zu keinem der beobachteten Zeitpunkte erreichten die Werte statistische Signifikanz. Interessant in diesem Zusammenhang anzumerken ist, dass nach Arbeiten von Pian *et al.* Ptx eine Hemmung der Surfactant-Sekretion bewirkt (Pian *et al.*, 1994; Pian *et al.*, 1997). Ob daher die in dieser Arbeit tendenziell erniedrigten Compliance-Werte der Lungen Ptx-behandelter Mäuse auf einen verringerten Gehalt der Lungen an Surfactant zurückzuführen sind, bleibt spekulativ und erfordert eine weitergehende Untersuchung.

Interessanterweise zeigen Ptx-behandelte Mäuse einen signifikant erhöhten mittleren pulmonalarteriellen Druck im Vergleich zu Kontrollen. Die zugrunde liegenden Mechanismen hierzu sind unklar. Es ist interessant, dass sowohl $G\alpha_{i2}$ - als auch $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse keine signifikanten Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) aufwiesen, wobei zumindest bei $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren eine tendenzielle Erhöhung, bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren eine tendenzielle Verringerung des PAP vorlag. Diese Ergebnisse könnten auf eine Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen allgemein an der Regulation des PAP hindeuten, wobei die einzelnen Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ größtenteils gemeinsame Funktionen bei der Regulation des PAP ausüben und ein Ausfall der einen Isoform funktionell durch die andere kompensiert werden kann. Interessant in diesem Zusammenhang erscheinen Ergebnisse, nach denen auch hinsichtlich des basalen systemischen Blutdrucks sowie der α_2 -Agonist-induzierten Senkung des systemischen Blutdrucks keine Unterschiede zwischen $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen beobachtet wurden (Albarran-Juarez *et al.*, 2009).

Erstaunlicherweise zeigten im Gegensatz zu $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen, bei denen ein erhöhter Atemwegswiderstand festgestellt wurde, Ptx-behandelte Mäuse keinen Hinweis auf eine Veränderung des basalen Atemwegswiderstands. Dagegen konnten

Diskussion

McGraw et al. eine Verringerung der Metacholin induzierten Bronchokonstriktion bei Ptx-behandelten Tieren aufzeigen (McGraw *et al.*, 2007). Diese Diskrepanzen zwischen den Befunden der jeweiligen Arbeit sowie die Diskrepanzen zwischen Ptx-behandelten und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen innerhalb dieser Arbeit können als Ausdruck der komplexen Rolle von $G\alpha_i$ Proteinen innerhalb des zugrunde liegenden Mechanismus bei der Regulation des Atemwegswiderstands verstanden werden. Sie deuten auf eine spezifische Funktion der einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen bei der Regulation des Atemwegswiderstands hin. Um nähere Einsichten in die spezifische Funktion der einzelnen $G\alpha_i$ -Proteine bei Regulation des Atemwegswiderstands zu erhalten, sind jedoch weitere pharmakologische Stimulationsversuche und zell- sowie molekularbiologische Untersuchungen der $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten sowie Ptx-behandelten Mäuse nötig.

5. Zusammenfassung

G-Proteine sind wichtige zelluläre Komponenten bei der Signaltransduktion. G-Proteine bestehen u. a. aus einer α -Untereinheit $G\alpha$, von denen wiederum mehrere Unterfamilien existieren. Die Mitglieder der $G\alpha_i$ -Subfamilie weisen mit 85-95 % eine hohe Identität der Aminosäuresequenz auf, was sowohl auf gemeinsame (redundante) als auch spezifische Funktionen im Organismus hinweist. Zur Analyse der spezifischen biologischen Funktionen einzelner $G\alpha_i$ -Isoformen wurden für alle drei Isoformen $G\alpha_{i1}$ -, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ entsprechende Gen-defiziente Mauslinien generiert. Aus der Literatur und Arbeiten der eigenen Forschungsgruppe war bekannt, dass ein signifikanter Anteil von ca. 50 % der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse um die Geburt verstirbt und dieses Versterben möglicherweise auf eine Fehlfunktion im kardiorespiratorischen System der Neugeborenen zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der neonatale Phänotyp und die Ursache des Versterbens der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäuse näher untersucht sowie die Rolle der Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ für die murine Lungenfunktion analysiert, da es sich bei diesen beiden Isoformen um die im Lungengewebe prädominant exprimierten Isoformen handelt.

Phänotypisch weisen neugeborene $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse sowohl ein reduziertes Körpergewicht als auch reduzierte Organengewichte auf, was auf eine Funktion von $G\alpha_{i2}$ bei der Vermittlung von Organwachstum hinweist. Hinsichtlich des Versterbens der Tiere bei Geburt konnte demonstriert werden, dass $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse ein pathologisches Atemmuster aufweisen und ein signifikanter Anteil von etwa 20 % der Tiere in den ersten 80 Minuten nach Geburt verstirbt. Die mikroskopische Analyse der Lungen verstorbener $G\alpha_{i2}$ -defizienter Mäuse zeigt eine kompakte Lungenstruktur mit spärlich entfalteten terminalen respiratorischen Einheiten und elektronenmikroskopisch finden sich darüber hinaus Hinweise auf eine strukturelle Fehlorganisation des pulmonalen Surfactant, der bekanntermaßen die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert und somit ihren Kollaps verhindert. Interessanterweise zeigen überlebende $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse als adulte Tiere eine erhöhte Lungendehnbarkeit ohne Hinweise auf mikroskopische Veränderungen der Lungenstruktur. Adulte $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse weisen einen signifikant erhöhten Atemwegswiderstand auf und deuten somit auf eine

Zusammenfassung

spezifische Funktion von $G\alpha_{i3}$ bei der Regulation des Atemwegswiderstands hin. Die akute Hemmung $G\alpha_i$ -abhängiger Signalwege durch Pertussistoxin führt zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstands. Da sowohl $G\alpha_{i2}$ - als auch $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse keine Veränderungen des pulmonalarteriellen Widerstands zeigen, weisen die Befunde auf eine gemeinsame, überlappende Funktion von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ bei der Vermittlung des pulmonalvaskulären Widerstands hin.

6. Literatur

Ahnert-Hilger G, Nürnberg B, Exner T, Schafer T, Jahn R (1998). The heterotrimeric G protein G_{o2} regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *The EMBO journal* **17**: 406-413.

Albarran-Juarez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J, *et al.* (2009). Modulation of α 2-adrenoceptor functions by heterotrimeric Galphai protein isoforms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **331**: 35-44.

Alescio T, Cassini A (1962). Induction in vitro of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *The Journal of experimental zoology* **150**: 83-94.

Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE (1994). The human thyrotropin receptor activates G-proteins G_s and G_{q/11}. *The Journal of biological chemistry* **269**: 13733-13735.

Arnis S, Hofmann KP (1993). Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7849-7853.

Barker PM, Markiewicz M, Parker KA, Walters DV, Strang LB (1990). Synergistic action of triiodothyronine and hydrocortisone on epinephrine-induced reabsorption of fetal lung liquid. *Pediatric research* **27**: 588-591.

Barker PM, Olver RE (2002). Invited review: Clearance of lung liquid during the perinatal period. *Journal of applied physiology* **93**: 1542-1548.

Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL (1997). Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* **124**: 4867-4878.

Billington CK, Penn RB (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory research* **4**: 2.

Bird AD, Flecknoe SJ, Tan KH, Olsson PF, Antony N, Mantamadiotis T, *et al.* (2011). cAMP response element binding protein is required for differentiation of respiratory epithelium during murine development. *PloS one* **6**: e17843.

Birnbaumer L (2007). The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochimica et biophysica acta* **1768**: 756-771.

Bosse Y, Riesenfeld EP, Pare PD, Irvin CG (2010). It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow. *Annual review of physiology* **72**: 437-462.

Literatur

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132.

Burri PH (2006). Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biology of the neonate* **89**: 313-322.

Cardoso WV (2001). Molecular regulation of lung development. *Annual review of physiology* **63**: 471-494.

Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**: 389-395.

Celli G, LaRoche WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G (1998). Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *The EMBO journal* **17**: 1642-1655.

Chander A, Fisher AB (1990). Regulation of lung surfactant secretion. *The American journal of physiology* **258**: L241-253.

Chapurlat RD, Meunier PJ (2000). Fibrous dysplasia of bone. *Bailliere's best practice & research. Clinical rheumatology* **14**: 385-398.

Clapham DE, Neer EJ (1997). G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**: 167-203.

Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, *et al.* (1995). Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7794-7798.

Clements JA (1962). Surface tension in the lungs. *Scientific American* **207**: 120-130.

Clements JA, Hustead RF, Johnson RP, Gribetz I (1961). Pulmonary surface tension and alveolar stability. *Journal of applied physiology* **16**: 444-450.

Crapo JD (1993). New concepts in the formation of pulmonary edema. *The American review of respiratory disease* **147**: 790-792.

De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**: 235-271.

deMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM (1997). Early fetal development of lung vasculature. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **16**: 568-581.

Denker SP, McCaffery JM, Palade GE, Insel PA, Farquhar MG (1996). Differential distribution of α subunits and $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *The Journal of cell biology* **133**: 1027-1040.

Literatur

Dietl P, Haller T (2005). Exocytosis of lung surfactant: from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annual review of physiology* **67**: 595-621.

Dizayee S, Kaestner S, Kuck F, Hein P, Klein C, Piekorz RP, *et al.* (2011). $G\alpha_{i2}$ - and $G\alpha_{i3}$ -specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS one* **6**: e24979.

Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997). RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of Gbetagamma-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10461-10466.

Ezan J, Lasvaux L, Gezer A, Novakovic A, May-Simera H, Belotti E, *et al.* (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nature cell biology* **15**: 1107-1115.

Falconer DS (1965). Maternal effects and selection response. In S. J. Geerts (Ed.) *Genetics Today, Proc. of the XI International Congress of Genetics*. Pergamon Press, New York. : 763-774.

Folkesson HG, Matthay MA (2006). Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **35**: 10-19.

Gil J, Reiss OK (1973). Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *The Journal of cell biology* **58**: 152-171.

Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, *et al.* (2001). Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6366-6371.

Glasser SW, Korfhagen TR, Bruno MD, Dey C, Whitsett JA (1990). Structure and expression of the pulmonary surfactant protein SP-C gene in the mouse. *The Journal of biological chemistry* **15**: 21986-21991.

Gohla A, Klement K, Piekorz RP, Pexa K, vom Dahl S, Spicher K, *et al.* (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3003-3008.

Grunstein MM, Hakonarson H, Maskeri N, Chuang S (2000). Autocrine cytokine signaling mediates effects of rhinovirus on airway responsiveness. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **278**: L1146-1153.

Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G (1996). Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annual review of pharmacology and toxicology* **36**: 429-459.

Hakonarson H, Herrick DJ, Serrano PG, Grunstein MM (1996). Mechanism of cytokine-induced modulation of beta-adrenoceptor responsiveness in airway smooth muscle. *The Journal of clinical investigation* **97**: 2593-2600.

Literatur

Haubold M, Gilsbach R, Hein L (2010). α_{2B} -adrenoceptor deficiency leads to postnatal respiratory failure in mice. *The Journal of biological chemistry* **285**: 34213-34219.

Hawgood S, Derrick M, Poulain F (1998). Structure and properties of surfactant protein B. *Biochimica et biophysica acta* **1408**: 150-160.

Hearn SA, Possmayer F (1997). Ultrastructure of tubular myelin in isolated pulmonary surfactant and 233 labeling for surfactant protein A. *Scanning* **19**: 234.

Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB (1990). Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development* **109**: 29-36.

Held HD, Uhlig S (2000). Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. *Journal of applied physiology* **88**: 2192-2198.

Heymann MA (1999). Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **84**: 127-132.

Hogan BL (1999). Morphogenesis. *Cell* **96**: 225-233.

Hooper SB, Kitchen MJ, Wallace MJ, Yagi N, Uesugi K, Morgan MJ, *et al.* (2007). Imaging lung aeration and lung liquid clearance at birth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 3329-3337.

Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, *et al.* (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nature genetics* **12**: 325-328.

Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H (2000). Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **7**: 111-120.

Jain L, Eaton DC (2006). Alveolar fluid transport: a changing paradigm. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **290**: L646-L648.

Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM (2001). Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *The Journal of clinical investigation* **108**: 477-483.

Jiang M, Boulay G, Spicher K, Peyton MJ, Brabet P, Birnbaumer L, *et al.* (1997). Inactivation of the $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ genes by homologous recombination. *Receptors & channels* **5**: 187-192.

Kinane TB, Komatsuzaki K, Aleixo MD, Sunday ME, Ercolani L (1999). Regulation of the G protein $G\alpha_{i2}$ by growth and development in fetal airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **20**: 35-42.

Literatur

Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B (1991). Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* **353**: 43-48.

Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B (1992). Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* **358**: 424-426.

Kobilka BK (2011). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* **32**: 213-218.

Kobilka BK, Deupi X (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* **28**: 397-406.

Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, *et al.* (2012). Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**: 552-556.

Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR (1988). Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5566-5570.

Le-Niculescu H, Niesman I, Fischer T, DeVries L, Farquhar MG (2005). Identification and characterization of GIV, a novel G $\alpha_{i/s}$ -interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *The Journal of biological chemistry* **280**: 22012-22020.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends in pharmacological sciences* **14**: 303-307.

Leiss V, Flockerzie K, Novakovic A, Rath M, Schonsiegel A, Birnbaumer L, *et al.* (2014). Insulin secretion stimulated by l-arginine and its metabolite l-ornithine depends on Galphai2. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **307**: E800-812.

Lou X, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG (2002). GAIP, GIPC and G α_{i3} are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**: 918-927.

Lwebuga-Mukasa JS (1991). Matrix-driven pneumocyte differentiation. *The American review of respiratory disease* **144**: 452-457.

Mays LE, Ammon-Treiber S, Mothes B, Alkhaled M, Rottenberger J, Muller-Hermelink ES, *et al.* (2013). Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* **123**: 1216-1228.

McGraw DW, Elwing JM, Fogel KM, Wang WC, Glinka CB, Mihlbachler KA, *et al.* (2007). Crosstalk between G_i and G_q/G_s pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. *The Journal of clinical investigation* **117**: 1391-1398.

Literatur

Mittmann C, Pinkepank G, Stamatelopoulou S, Wieland T, Nürnberg B, Hirt S, *et al.* (2003). Differential coupling of m-cholinoceptors to G_i/G_o-proteins in failing human myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**: 1241-1249.

Moxham CM, Hod Y, Malbon CC (1993). Induction of G α_{i2} -specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science* **260**: 991-995.

Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, Linden J (1991). A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2}, and G_o. *The Journal of biological chemistry* **266**: 22285-22289.

Nagata K, Ye C, Jain M, Milstone DS, Liao R, Mortensen RM (2000). G α_{i2} but not G α_{i3} is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circulation research* **87**: 903-909.

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P (1988). Increase in myocardial G_i-proteins in heart failure. *Lancet* **2**: 936-937.

Nicholas TE (1996). Pulmonary surfactant: no mere paint on the alveolar wall. *Respirology* **1**: 247-257.

Nürnberg B (2000). Pertussis toxin as a Pharmacological Tool. *Handbook of Experimental Pharmacology* **145**: 187-206.

Nürnberg B, Ahnert-Hilger G (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS letters* **389**: 61-65.

Nürnberg B, Gudermann T, Schultz G (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *Journal of molecular medicine* **73**: 123-132.

Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV (1986). The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *The Journal of physiology* **376**: 321-340.

Olver RE, Walters DV, S MW (2004). Developmental regulation of lung liquid transport. *Annual review of physiology* **66**: 77-101.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006). How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* **5**: 993-996.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.

Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G (1995). Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Molecular endocrinology* **9**: 725-733.

Literatur

Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Current biology : CB* **8**: 1083-1086.

Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L (1994). Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *The EMBO journal* **13**: 3296-3301.

Pian MS, Dobbs LG (1994). Activation of G proteins may inhibit or stimulate surfactant secretion in rat alveolar type II cells. *The American journal of physiology* **266**: L375-381.

Pian MS, Dobbs LG (1997). Lipoprotein-stimulated surfactant secretion in alveolar type II cells: mediation by heterotrimeric G proteins. *The American journal of physiology* **273**: L634-639.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**: 639-650.

Pineda VV, Athos JI, Wang H, Cerver J, Ippolito D, Boulay G, *et al.* (2004). Removal of $G\alpha_{i1}$ constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* **41**: 153-163.

Plummer NW, Spicher K, Malphurs J, Akiyama H, Abramowitz J, Nürnberg B, *et al.* (2012). Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the $G\alpha_i$ subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 21366-21371.

Possmayer F, Yu SH, Weber JM, Harding PG (1984). Pulmonary surfactant. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* **62**: 1121-1133.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, *et al.* (2007). Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**: 383-387.

Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, *et al.* (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor- G_s protein complex. *Nature* **477**: 549-555.

Raymond JR (1995). Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *The American journal of physiology* **269**: F141-158.

Raymond JR, Olsen CL, Gettys TW (1993). Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT_{1A} receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to $G\alpha_s$. *Biochemistry* **32**: 11064-11073.

Richardson M, Robishaw JD (1999). The α_{2A} -adrenergic receptor discriminates between G_i heterotrimers of different betagamma subunit composition in Sf9 insect cell membranes. *The Journal of biological chemistry* **274**: 13525-13533.

Literatur

- Rooney SA (2001). Regulation of surfactant secretion. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **129**: 233-243.
- Rooney SA, Young SL, Mendelson CR (1994). Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **8**: 957-967.
- Ross EM, Wilkie TM (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry* **69**: 795-827.
- Rudolph AM (1985). Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circulation research* **57**: 811-821.
- Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, *et al.* (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in $G\alpha_{i2}$ -deficient mice. *Nature genetics* **10**: 143-150.
- Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciruolo G, Whitsett JA (1989). Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **37**: 429-440.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993). A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *The Journal of biological chemistry* **268**: 4625-4636.
- Schmitz G, Muller G (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research* **32**: 1539-1570.
- Schrödinger E (1951). Was ist Leben? *Leo Lehnen Verlag GmbH* **2**.
- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, *et al.* (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature genetics* **21**: 138-141.
- Seth R, Shum L, Wu F, Wuenschell C, Hall FL, Slavkin HC, *et al.* (1993). Role of epidermal growth factor expression in early mouse embryo lung branching morphogenesis in culture: antisense oligodeoxynucleotide inhibitory strategy. *Developmental biology* **158**: 555-559.
- Shannon JM, Gebb SA, Nielsen LD (1999). Induction of alveolar type II cell differentiation in embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture. *Development* **126**: 1675-1688.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-808.
- Souza P, Kuliszewski M, Wang J, Tseu I, Tanswell AK, Post M (1995). PDGF-AA and its receptor influence early lung branching via an epithelial-mesenchymal interaction. *Development* **121**: 2559-2567.

Literatur

Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE (2000). Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* **80**: 395-403.

Stow JL, de Almeida JB (1993). Distribution and role of heterotrimeric G proteins in the secretory pathway of polarized epithelial cells. *Journal of cell science. Supplement* **17**: 33-39.

Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K (1989). Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *The American review of respiratory disease* **140**: 75-81.

Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG (1994). Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry* **269**: 6093-6100.

Tokieda K, Whitsett JA, Clark JC, Weaver TE, Ikeda K, McConnell KB, *et al.* (1997). Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *The American journal of physiology* **273**: L875-882.

Uhlig S (1998). The isolated perfused lung. *Methods in Pulmonary Research*: 29-55.

Valenti G, Procino G, Liebenhoff U, Frigeri A, Benedetti PA, Ahnert-Hilger G, *et al.* (1998). A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin 2 in kidney epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 22627-22634.

Verma RP (1995). Respiratory distress syndrome of the newborn infant. *Obstetrical & gynecological survey* **50**: 542-555.

Walters DV, Olver RE (1978). The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatric research* **12**: 239-242.

Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. *Mechanisms of development* **92**: 55-81.

Warburton D, Seth R, Shum L, Horcher PG, Hall FL, Werb Z, *et al.* (1992). Epigenetic role of epidermal growth factor expression and signalling in embryonic mouse lung morphogenesis. *Developmental biology* **149**: 123-133.

Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL (1999). Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* **126**: 4005-4015.

Wettschureck N, Offermanns S (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* **85**: 1159-1204.

Whitsett JA (2010). Review: The intersection of surfactant homeostasis and innate host defense of the lung: lessons from newborn infants. *Innate immunity* **16**: 138-142.

Whitsett JA, Hull W, Ross G, Weaver T (1985). Characteristics of human surfactant-associated glycoproteins A. *Pediatric research* **19**: 501-508.

Literatur

Whitsett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD (1995). Human surfactant protein B: structure, function, regulation and genetic disease. *Physiological reviews* **75**.

Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE (2010). Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annual review of medicine* **61**: 105-119.

Wiege K, Ali SR, Gewecke B, Novakovic A, Konrad FM, Pexa K, *et al.* (2013). $G\alpha_{i2}$ is the essential Galphai protein in immune complex-induced lung disease. *Journal of immunology* **190**: 324-333.

Wiege K, Le DD, Syed SN, Ali SR, Novakovic A, Beer-Hammer S, *et al.* (2012). Defective macrophage migration in $G\alpha_{i2}$ - but not $G\alpha_{i3}$ -deficient mice. *Journal of immunology* **189**: 980-987.

Wilkie TM, Yokoyama S (1994). Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Society of General Physiologists series* **49**: 249-270.

Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, *et al.* (1999). Coupling of β_2 -adrenoceptor to G_i proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circulation research* **84**: 43-52.

Young SL, Fram EK, Larson EW (1992). Three-dimensional reconstruction of tubular myelin. *Experimental lung research* **18**: 497-504.

Zuberi Z, Nobles M, Sebastian S, Dyson A, Lim SY, Breckenridge R, *et al.* (2010). Absence of the inhibitory G-protein $G\alpha_{i2}$ predisposes to ventricular cardiac arrhythmia. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* **3**: 391-400.

Zuo YY, Possmayer F (2007). How does pulmonary surfactant reduce surface tension to very low values? *Journal of applied physiology* **102**: 1733-1734.

7. Anhang

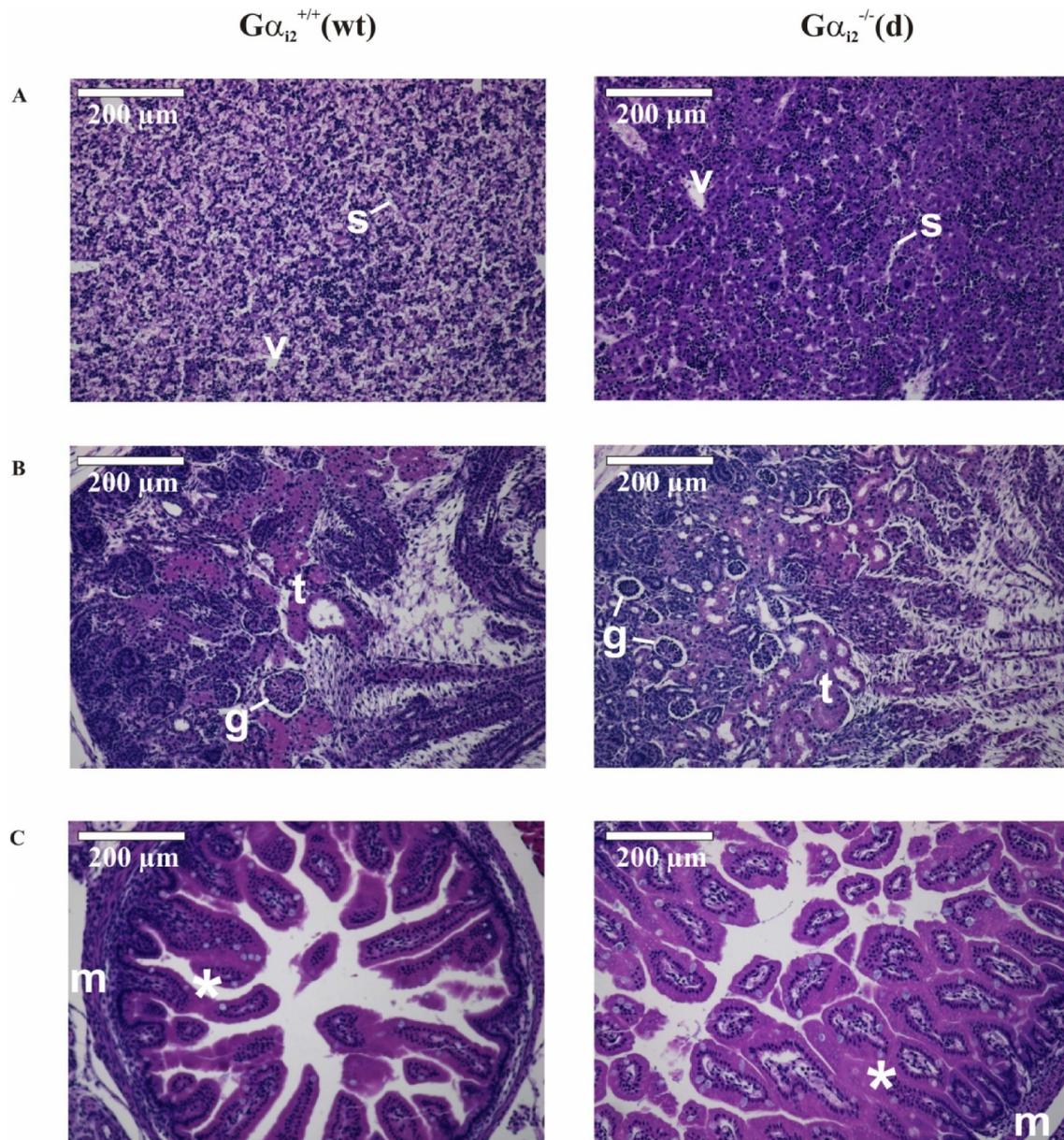


Abbildung 30: Repräsentative HE-gefärbte, 5 µm dünne Schnitte der Leber (A), Niere (B) und Ileum (C) von $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- und verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/}$ (d)-Mäusen am Embryonaltag e 19,5.

A: Sowohl bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- wie auch verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/}$ (d)-Mäusen zeigt sich eine regelrechte Lebermorphologie mit Zentralvenen (v) und Sinusoiden (s) zwischen Hepatozyten.

B: Sowohl bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- wie auch verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/}$ (d)-Mäusen zeigt sich eine regelrechte Nierenmorphologie mit typischer Gliederung in Nierenrinde, welche die Glomeruli (g) enthalten und Nierenmark mit den Nierentubuli (t).

C: Sowohl bei $G\alpha_{i2}^{+/+}$ (wt)- wie auch verstorbenen $G\alpha_{i2}^{-/}$ (d)-Mäusen zeigt sich eine regelrechte Morphologie des Ileum mit typischer Gliederung in die Tunica mucosa (*), Tela submucosa und die Tunica muscularis (m). Maßstab 200 µm.

Anhang

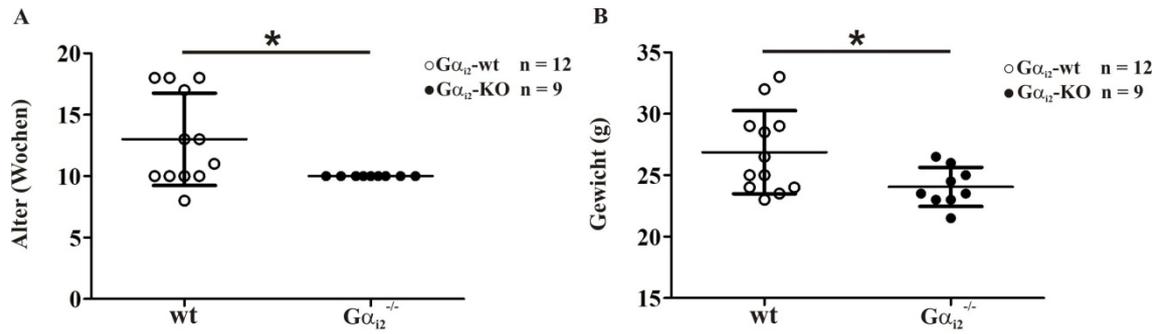


Abbildung 312: Alter und Gewicht der für die Versuche der Isoliert Perfundierten Lunge (IPL) verwendeten $G\alpha_{12}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäuse. Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. Das durchschnittliche Alter von $G\alpha_{12}^{+/+}$ -Mäusen (wt) lag bei 13 ± 4 ($n = 12$) Wochen, von $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen bei 10 ± 0 ($n = 9$) Wochen ($p < 0,05$) und das durchschnittliche Gewicht von $G\alpha_{12}^{+/+}$ -Mäusen (wt) bei $27 \pm 3,4$ g und von $G\alpha_{12}^{-/-}$ -Mäusen bei $24 \pm 1,6$ g; * $p < 0,05$).

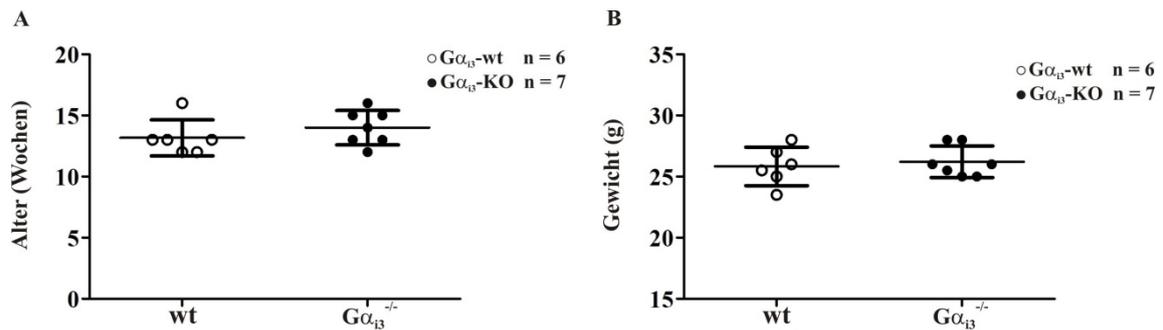


Abbildung 33: Alter und Gewicht der für die Versuche der Isoliert Perfundierten Lunge (IPL) verwendeten $G\alpha_{13}^{+/+}$ (wt)- und $G\alpha_{13}^{-/-}$ -Mäuse. Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. Das durchschnittliche Lebensalter der $G\alpha_{13}^{+/+}$ -Mäuse betrug 13 Wochen, das der $G\alpha_{13}^{-/-}$ -Mäuse betrug 14 Wochen. Das durchschnittliche Gewicht sowohl der $G\alpha_{13}^{+/+}$ - als auch der $G\alpha_{13}^{-/-}$ -Mäuse betrug ca. 26 g.

8. Danksagungen

Dank gilt allen, die an dem Erfolg dieser Arbeit Teil haben, insbesondere:

Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg für die Betreuung und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit sowie die stets anregenden Ideen zur Umsetzung und Darstellung der Ergebnisse.

Frau PD Dr. med. Lethizia Quintanilla-Fend und Herrn Prof. Dr. rer. nat Hartwig Wolburg vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen für die Umsetzung und wertvollen Beiträge für die Auswertung der mikroskopischen und elektronenmikroskopischen Analysen der Arbeit.

Frau PD Dr. med. Susanne Ammon-Treiber für die Etablierung und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung sowie Auswertung der Versuche des Modells der „Isoliert Perfundierten Lunge der Maus“.

Frau Dr. rer. nat. Veronika Leiss und Dr. med. Ana Novakovic für die Organisation der Tierzucht, die allzeitig bereite Hilfestellung bei Problemen und für die anregenden Ideen zur Umsetzung der Arbeit.

Allen chemisch und medizinisch technischen Assistenten insbesondere Renate Riehle, Christine Piesch des Instituts für Pharmakologie und Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Tübingen für die Hilfestellungen bei den Arbeiten im Labor.

Nicht zuletzt meinen Eltern Anette und Klaus Nowacki für die beratende und moralische Unterstützung auf meinem bisherigen (akademischen und beruflichen) Lebensweg.

Lebenslauf

9. Lebenslauf

Name: Andreas Nowacki
E-Mail-Adresse: neuro.nowacki@gmail.com
Geburtsdatum: 02.11.1986
Geburtsort: Stuttgart
Sprachen: Deutsch, Englisch, Französisch

Schulbildung:

Grundschule, Korb 09/93 bis 07/1997
Gymnasium, Bildungszentrum 09/97 bis 07/2006
Weissach im Tal

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Hochschulstudium und wissenschaftliche Tätigkeit:

Studium der Humanmedizin Universität Tübingen 04/07 bis 05/2013

- Studienaufenthalt am Heart Institute des
University Hospital in Bristol 10/2013
- Doktorand bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg
am Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie
Tübingen

Approbation als Arzt 05/2013

Berufliche Tätigkeit

Zivildienst: Lebenshilfe Backnang 08/06 bis 04/2007

Assistenzarzt am Universitätsspital Bern in der Abteilung Neurochirurgie seit 07/2013

