



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

Untersuchung zur Ausprägung der Latrophiline in
der Lunge unter besonderer Berücksichtigung des
Asthmakandidatengens *Lphn3*

vorgelegt von
Jacqueline Schmidt
geboren am 13.09.1995 in Moers

im Fachbereich der Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in

Homburg

unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

2022

Tag der Promotion: 15.06.2023

| | |
|-------------------|------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. M. D. Menger |
| Berichterstatter: | Prof. Dr. G. Krasteva-Christ |
| | Prof. Dr. Dr. R. Bals |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | VI |
| Zusammenfassung..... | 1 |
| Abstract..... | 4 |
| 1 Einleitung..... | 6 |
| 1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren..... | 6 |
| 1.1.1 Aufbau und Funktion der GPCR..... | 6 |
| 1.1.2 Bedeutung der GPCR..... | 10 |
| 1.2 Latrophiline..... | 13 |
| 1.2.1 Aufbau der Latrophiline..... | 13 |
| 1.2.2 Bedeutung der Latrophiline mit Fokus auf Lphn3..... | 16 |
| 1.3 Anatomie und Physiologie des respiratorischen Systems..... | 19 |
| 1.3.1 Makroanatomie des respiratorischen Systems..... | 19 |
| 1.3.2 Mikroanatomie u. Histologie des respiratorischen Systems..... | 22 |
| 1.3.3 Physiologie der Lunge..... | 24 |
| 1.3.4 Pathologie der Lunge mit Fokus auf Asthma bronchiale..... | 26 |
| Material..... | 31 |
| 1.4 Antikörper..... | 31 |
| 1.4.1 Primäre Antikörper..... | 31 |
| 1.4.2 Sekundäre Antikörper..... | 31 |
| 1.5 Enzyme..... | 31 |
| 1.6 Primer – Startermoleküle für die PCR..... | 32 |
| 1.7 RT-qPCR- Assays..... | 32 |
| 1.8 Chemikalien..... | 32 |
| 1.9 Lösungen und Puffer..... | 33 |
| 1.10 Mausstämme..... | 36 |
| 1.11 Verbrauchsmaterialien..... | 37 |
| 1.12 Geräte..... | 38 |
| 2 Methodik..... | 39 |
| 2.1 Tierisches Gewebe..... | 39 |
| 2.1.1 Vorbereitung der Organentnahme..... | 39 |
| 2.1.2 Direkte Präparation und Gewebeentnahme (für die folgende RNA- und Proteinanalyse)..... | 40 |
| 2.1.3 Perfusion und Gewebefixierung (für die folgende IHC und IF)..... | 40 |
| 2.1.4 Gewebeaufarbeitung..... | 41 |
| 2.2 Genotypisierung – DNA-Analyse..... | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2.1 | Isolierung und Aufarbeitung der DNA | 41 |
| 2.2.2 | Analyse der DNA – Polymerase Kettenreaktion (PCR)..... | 42 |
| 2.2.3 | Visualisierung – Agarosegelelektrophorese..... | 44 |
| 2.3 | Nachweis der Transkriptmengen – RNA-Analyse | 44 |
| 2.3.1 | Isolierung und Aufarbeitung der RNA | 44 |
| 2.3.2 | Analyse und Visualisierung der Transkriptmengen– RT-qPCR..... | 46 |
| 2.4 | Proteinnachweis | 48 |
| 2.4.1 | Isolierung und Aufarbeitung der Proteine | 48 |
| 2.4.2 | Analyse und Visualisierung der Proteine – mittels Western Blot- Untersuchung | 49 |
| 2.5 | Histologische Untersuchungen | 53 |
| 2.5.1 | Hämatoxylin-Eosin Färbung | 53 |
| 2.5.2 | Immunhistochemie | 53 |
| 2.5.3 | Immunfluoreszenz..... | 56 |
| 2.6 | Auswertung, Statistik und graphische Darstellung | 57 |
| 3 | Ergebnisse..... | 58 |
| 3.1 | Identifikation der Tiere | 58 |
| 3.2 | Lokalisation der Latrophiline (Lphn2 und Lphn3) | 60 |
| 3.2.1 | Präparation des Gewebes – Differenzierung der unterschiedlichen Lphn3 Lokalisationen | 60 |
| 3.2.2 | RT-qPCR - Transkriptmengen von Lphn1, 2 und 3 in Lphn3 Knock-In Gewebe unterschiedlicher Lokalisationen | 61 |
| 3.2.3 | Proteinanalytik: differenzierte Gewebelokalisationen von Latrophilin 3 | 63 |
| 3.2.4 | Histologische Untersuchungen und Nachweise von Lphn3 | 67 |
| 3.3 | Latrophilin 3 Knock-Out | 79 |
| 3.3.1 | Identifizierung der Lphn3 Knock-Out-Tiere | 79 |
| 3.3.2 | RT-qPCR – Lphn1, 2 und 3 Transkriptmengen: Vergleich zwischen Lphn3 Knock-Out- und Wildtyp-Tieren | 84 |
| 4 | Diskussion | 86 |
| 4.1 | Ergebnisbewertung in Bezug auf die aktuelle Forschung..... | 86 |
| 4.1.1 | Expression und Lokalisation der Latrophiline in der Lunge..... | 88 |
| 4.1.2 | Signalwege und Interaktionsproteine..... | 91 |
| 4.2 | Experimentdurchführung in aktuellem Forschungsbezug..... | 94 |
| 4.2.1 | Immunhistochemische Reaktionen: Vergleich von IHC und IF-Strategien | 94 |
| 4.2.2 | Immunhistochemische Reaktionen: Vergleich von Antigen- Retrieval (AR) /Epitop- Retrieval (ER) Strategien..... | 95 |

| | | |
|-----|--------------------------------|-----|
| 4.3 | Potenzielle Folgeversuche..... | 97 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 103 |
| | Tabellenverzeichnis..... | 107 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 108 |
| | Lebenslauf..... | 115 |
| | Danksagung..... | 116 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| ADGRL | engl.: Adhesion G-protein-coupled receptor Latrophilin |
| AK | Antikörper |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASM | engl.: airway smooth muscle cells (dt.: glatte Atemwegsmuskelzellen) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA-Mix | engl.: bicinchoninic acid |
| BHR | Bronchiale Hyperreagibilität |
| bidest. / dd H ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaar |
| BS | engl.: Blocking Solution (dt.: Histoblockierungslösung) |
| BSA | engl.: bovines serumalbumin (dt.: Rinderserum) |
| bzw. | beziehungsweise |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | engl.: complementary deoxyribonucleid acid (dt.: komplementäre Desoxyribonucleinsäure) |
| chron. | chronisch |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COPD | engl.: chronic obstructive pulmonary disease (dt.: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) |
| Cre | engl.: causes recombination (dt.: Cre-Rekombinase) oder engl.: cAMP -response element |
| CREB | engl.: cAMP response-element binding protein |
| CS | engl.: carrier solution (dt.: Trägerlösung) |
| DAG | Diazylglycerin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | engl.: deoxyribonucleic acid (dt.: DNS - Desoxyribonucleinsäure) |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| FLRT | Fibronectin- und Leucin- reiches Repeat-Transmembranprotein |
| FRT | engl.: flippase recombinase target |
| g | Gramm |
| GAP | GTPase aktivierendes Protein |
| GDI | engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor |
| GEF | engl.: guanine nucleotide- exchange factor |
| GERD | engl.: gastroesophageal reflux disease (dt.: gastroösophageale Refluxerkrankung) |
| GFP | engl.: green fluorescent protein |
| ggf. | gegebenenfalls |
| G _i | inhibierendes G-Protein (Hemmung der Adenylatcyklase) |

| | |
|----------------------|---|
| Gl. (Plural: Gll.) | lat.: Glandula (dt.: Drüse) |
| GPCR | engl.: G-Protein-coupled receptor (dt.: G-Protein gekoppelter Rezeptor) |
| G-Protein | Guaninnukleotid-bindendes Protein |
| G _q | PLC-sensitives G-Protein (Aktivierung der Phospholipase C) |
| GRK | G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase |
| G _s | stimulierendes G-Protein (Aktivierung der Adenylatcyclase) |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ₂ O | Wasser |
| HA | Hämagglutinin |
| HBSS | engl.: Hank's balanced salt solution |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HIER | engl.: heat induced epitope retrieval |
| ICS | Inhalative Corticosteroide |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IgE | Immunglobulin E |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-Trisphosphat |
| kDa | kilo Dalton |
| KI | engl.: Knock-In |
| KO | engl.: Knock-Out |
| LABA | engl.: long-acting beta-2-agonist (dt.: langwirksame Beta-2-Sympathomimetika) |
| LAMA | engl.: long-acting muscarinic antagonist (dt.: langwirksame Anticholinergika) |
| Lig. (Plural: Ligg.) | lat.: Ligament (dt.: Band) |
| loxP | engl.: locus of crossing over (X over P1) |
| Lphn | Latrophilin |
| LTRA | Leukotrienrezeptorantagonisten |
| M. (Plural: Mm.) | lat.: musculus (dt.: Muskel) |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MM | Master-Mix |
| mRNA | engl.: messenger RNA |
| neg. | negativ |
| ng | Nanogramm |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OCS | orale Corticosteroide |
| PBS | engl.: phosphate-buffered saline |
| PCR | engl.: polymerase chain reaction (dt.: Polymerase Kettenreaktion) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |

| | |
|-----------------|--|
| PL | Probenleiter |
| PLC | Phospholipase C |
| POX | Peroxidase (Enzym) |
| PP _i | Phosphatidylinositolphosphat |
| RNA | engl.: ribonucleic acid (dt.: RNS - Ribonukleinsäure) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-qPCR | engl.: RealTime-quantitative polymerase chain reaction (dt.: quantitative Reverse Transkriptase-PCR) |
| SABA | engl.: short-acting beta-2-agonist (dt.: kurzwirksame Beta-2-Sympathomimetika) |
| SAMA | engl.: short-acting muscarinic antagonist (dt.: kurzwirksame Anticholinergika) |
| SDS-Puffer | Sodiumdodecylsulfat-Puffer |
| sek. | sekundär |
| sog. | sogenannt |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> (Bakterienstamm) |
| TBS-T | engl.: Tris-buffered saline with Tween20 |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Temp. | Temperatur |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| v.a. | vor allem |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | Zum Beispiel |
| α | Alpha (Anti) |

Zusammenfassung

Das Asthma bronchiale ist mit einer Prävalenz von ca. 300 Millionen Menschen und steigenden Inzidenz eines der häufigsten chronischen Erkrankung des Menschen und wird zum Formkreis der obstruktiven Atemwegsstörungen gezählt [20], [35], [42]. Asthma bronchiale ist definiert als eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die mit einer reversiblen Atemwegsverengung und Hyperreagibilität des Bronchialsystems einhergeht [20]. Des Weiteren ist diese Erkrankung durch eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, ödematöse Schleimhautschwellung und vermehrte zähflüssige Schleimproduktion gekennzeichnet [35], [42].

Die bisherige Therapie ist vorwiegend auf Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder deren Liganden-Interaktionen ausgerichtet [9]. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden durch ihre Beeinflussung der Zellphysiologie als Schnittstelle zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen angesehen [29] und stellen somit im Allgemeinen eines der wichtigsten pharmakologischen Ziele dar [14], [17].

In Veröffentlichungen von *Faiz et al.* (2017) [11] und *Liu et al.*(2018) [31] wurde eine neue Rolle der Latrophiline, besonders der Isoform Lphn3 vorgeschlagen, die u.a. durch Regulation der glatten Atemwegsmuskulatur mit pathophysiologischen Mechanismen des Asthma bronchiale in Zusammenhang gebracht werden.

Latrophiline gehören zu den Adhäsions- G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in Zusammenhang mit dem Neurotoxin α -Latrotoxin entdeckt wurden [34].

Bereits in zahlreichen Vorarbeiten sind viele v.a. neurozentrische physiologische Funktionen der Latrophiline beschrieben, die durch ihre noch nicht vollständig verstandenen Signaltransduktionsmechanismen und Adhäsionsfunktionen u.a. die Ausbildung neuronaler Netzwerke durch Synapsenbildung und Aufrechterhaltung der Synapsenfunktion fördern [17], [34], [36], [56]. Des Weiteren können sie die Verarbeitung und Modulierung der mechanischen Reizwahrnehmung regulieren und somit eine bedeutende Rolle in der Mechanosensorik einnehmen [43], [44].

Zudem besteht eine weit verbreitete Ausprägung der Latrophiline auch in extraneuronalen Geweben [17], [34]. So konnten bisher dysregulierte und fehlende Lphn-Isoformen mit verschiedenen malignen Erkrankungen [34], Erkrankungen des Stoffwechsels wie z.B. Diabetes mellitus [51] als auch zahlreichen neuropsychologischen Erkrankungen wie ADHS [34], [36], [49], Autismus Spektrum- und Substanzgebrauchsstörungen [36] in Verbindung gebracht werden.

Zusammenfassung

Auf Grund der Arbeiten von *Faiz et al.* und *Liu et al.* besteht ein allgemeines Interesse daran, den Zusammenhang zwischen Lphn3, seiner Expression und Lokalisation in der Lunge genauer aufzuzeigen sowie auch die Auswirkungen von dysregulierten oder fehlenden Lphns zu beschreiben.

Um diesen Zusammenhang genauer untersuchen zu können, werden in dieser Arbeit genetisch modifizierte Tiere des Stamms *M. musculus* verwendet, so wie sie in Arbeiten von *Sando et al.* (2019) [41] und *Anderson et al.* (2017) [1] zuvor beschrieben sind. Auf Grund dieser Genmodifikationen können mittels Cre-vermittelter Rekombination somit Lphn Knock-In oder Knock-Out Tiere generiert werden, bei denen die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Lphn-Proteins durch das Einfügen von spezifischen Markerproteinen detektierbar werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es anhand der hier etablierten Experimentmodifikationen somit, ein besseres Verständnis über das Latrophilin Expressionsverhältnis und die Lokalisation in der Lunge zu erlangen.

Zunächst wurde mittels in dieser Arbeit etablierter PCR-Verfahren die DNA nachgewiesen, um eine richtige Probenauswahl für die Verwendung der Gewebe eines Lphn3 Knock-In oder Knock-Out Tieres in den hier durchgeführten Versuchen sicher zu stellen. Anschließend gelang der mRNA- und Proteinnachweis in der Lunge und konnte durch eine vorherige Präparation der Lunge in verschiedene Abschnitte genauer differenziert werden. So werden hier in einem Lphn3 Knock-In Tier die Transkriptmengen der verschiedenen Latrophilin-Isoformen in den verschiedenen Abschnitten nachgewiesen und im Vergleich zueinander dargestellt. Hier zeigte sich auffälliger Weise eine signifikante Verminderung der Lphn2 und Lphn3 Transkriptmenge in der Trachea. Im anschließenden Western Blot konnte die Ausprägung des Lphn3 Proteins in den präparierten Lungenabschnitten nachgewiesen werden, in der Trachea wird dieses jedoch nicht nachgewiesen.

Ebenso erfolgte eine Etablierung des immunhistochemischen Nachweises des Lphn3 Proteins in der Lunge. Hier zeigten sich immunhistochemische Signale im Bereich der Bronchien, Bronchioli und Alveolen.

Der anschließende Versuch, Lphn3 mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen, gelang hier allerdings nicht. Es zeigten sich für Lphn3 lediglich unspezifische Signale, die einen ausschließlichen Nachweis in der glatten Muskulatur der Atemwege nicht möglich machten. Für Lphn2 sind hier jedoch spezifische Signale im Bereich der Basalmembran detektiert worden.

Eine überraschende Erkenntnis in dieser Arbeit liefern die im Lphn3 Knock-Out Tier detektierten Lphn-Transkriptmengen.

Zusammenfassung

Es zeigt sich keine kompensatorische Heraufregulierung der Lphn1 und Lphn2 Transkriptmengen im Vergleich zu denen in einem Wildtyp-Tier. Die Lphn3 Transkriptmenge ist hier signifikant um 50% vermindert, welches die Frage über mögliche alternative Spleißvarianten des Lphn3 Proteins aufwirft, die in Abwesenheit des Startexons zusätzlich möglich sind.

Diese Arbeit kann zusammenfassend potenziell einen Teil zum besseren Verständnis der Latrophiline, seiner Expressionsverhältnisse und seiner Lokalisation in der Lunge, mit Hauptaugenmerk auf Lphn3, beitragen. Jedoch bleiben Fragen über die genaue Lokalisation, physiologische Funktion und pathophysiologischen Zusammenhänge der Latrophiline in der Lunge offen, die es bedarf, im Rahmen von zukünftigen Forschungen, wie sie u.a. in dieser Arbeit diskutiert werden, zu klären.

Zusammenfassend besitzen Latrophiline jedoch Potential, als ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel für zukünftige molekulare Therapien des Asthma bronchiale angesehen zu werden.

Abstract

With a prevalence of about 300 million people and an increasing incidence, bronchial asthma is one of the most common chronic diseases in humans and is recognized as a form of obstructive respiratory disorders [20], [35], [42]. Bronchial asthma is defined as a chronic inflammatory respiratory disease associated with reversible airway narrowing and hyperresponsiveness of the bronchial system [20]. Furthermore, this disease is characterized by a contraction of the smooth airway muscles, edematous mucosal swelling and increased viscous mucus production [35], [42].

Current therapeutic strategies are mainly focusing on signaling pathways involving G protein-coupled receptors or interactions with their ligands [9]. G protein-coupled receptors are regarded as an interface between physiological and pathological conditions due to their influence on cell physiology [29] and thus generally represent one of the most important pharmacological targets [14], [17].

Publications by *Faiz et al.* (2017) [11] and *Liu et al.* (2018) [31] have proposed a new role of latrophilins, especially the isoform Lphn3, which is associated with the regulation of smooth airway muscle cells and pathophysiological mechanisms of bronchial asthma. Latrophilins are classified as adhesion G protein-coupled receptors that have been discovered in connection with the neurotoxin α -latrotoxin [34].

Many neurocentric physiological functions of latrophilins have already been described in numerous preliminary studies. However, their signal transduction mechanisms and adhesion functions are not fully understood yet. Probably, they promote the formation of neuronal networks through synapse formation and maintenance of synapse function [17], [34], [36], [56].

Furthermore, they can regulate the processing and modulation of mechanical stimulus perception and can thus play an important role in mechanosensors [43], [44].

In addition, a widespread expression of latrophilins also exists in extraneuronal tissues [17], [34]. So far, dysregulated and missing latrophilin isoforms have been associated with various malignant diseases [34], metabolic diseases, e.g., diabetes [51] as well as numerous neurodevelopmental diseases such as ADHD [34], [36], [49], and autism spectrum disorders or substance use disorders [36].

Based on the work of *Faiz et al.* and *Liu et al.*, there is a general interest in determining the relationship between Lphn3, its expression and localization in the lungs, and also the effects of dysregulated or missing latrophilins.

Abstract

To investigate this relationship in more detail, genetically modified mice have been used in this work, as previously described by *Sando et al* (2019) [41] and *Anderson et al.* (2017) [1]. Based on these gene modifications, Cre-mediated recombination can be used to generate latrophilin knock-in or knock-out animals in which the presence or absence of the respective latrophilin protein can be detected due to the insertion of specific marker proteins. The aim of this work is to gain a better understanding of the latrophilin expression ratio and their localization in lung tissue on the basis of the experimental procedures established in this thesis.

First, the DNA was detected by means of PCR methods established during the course of this work in order to ensure a correct sample selection for the use of the tissues of an Lphn3 knock-in or knock-out animal in the experiments carried out.

Subsequently, the mRNA and protein detection in the lungs was successful and could be further narrowed down by a preceding dissection of the lungs into different sections. Thus, in an Lphn3 knock-in animal, the transcript amounts of the different latrophilin isoforms in the different sections are detected and compared to each other. Here, a significant reduction in the amount of Lphn2 and Lphn3 transcripts in the trachea was clearly demonstrated. In the subsequent Western Blot, the Lphn3 protein was detected in different lung regions, but not in the trachea.

For Lphn2, however, specific signals were detected in the area of the basal membrane. The immunohistochemical detection of the Lphn3 protein in the lungs was also established, e.g., immunohistochemical signals were detected in the bronchi, bronchioli and alveoli.

However, the subsequent attempt to detect Lphn3 in immunofluorescence was not successful. For Lphn3, only non-specific signals were evident, which made it impossible to detect it exclusively in the smooth muscles of the respiratory tract, as is suspected.

A significant insight in this work is provided by the latrophilin transcript sets detected in the Lphn3 knock-out animal. There is no compensatory upregulation of the amount of Lphn1 and Lphn2 transcripts compared to those in wild-type mice.

The Lphn3 mRNA levels, however, were significantly reduced by 50%, which raises the question of possible alternative splice variants leading to truncated Lphn3 proteins.

In summary, this work can potentially contribute to a better understanding of Lphn proteins, their expression ratios and their localization in the lungs, with a focus on Lphn3. However, questions remain about the exact localization, physiological function and pathophysiological relationships of latrophilins in the lungs, which need to be clarified in the context of potential future research, such as those discussed in this work.

In conclusion, latrophilins display a great potential as promising pharmacological targets for future molecular therapies of bronchial asthma.

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.1.1 Aufbau und Funktion der GPCR

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (engl.: G protein-coupled receptor, GPCR) gehören zu der größten Familie der Membranrezeptoren, auch metabotrope Rezeptoren genannt, die inzwischen über 800 Mitglieder im menschlichen Genom umfasst.[14], [32], [56].

GPCRs können in sechs Klassen unterteilt werden: Klasse A (Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren), Klasse B (Sekretin-Rezeptorfamilie), Klasse C (metabotrope Glutamat-rezeptoren), Klasse D (Pheromonrezeptoren), Klasse E (cAMP-Rezeptoren) und Klasse F [56]. GPCRs bestehen aus sieben Transmembran α -Helices (7TM) mit einem extrazellulären Anteil (N-Terminus) und einem terminalen intrazellulären Anteil (C-Terminus). Sie werden deshalb auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet [12], [32]. Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

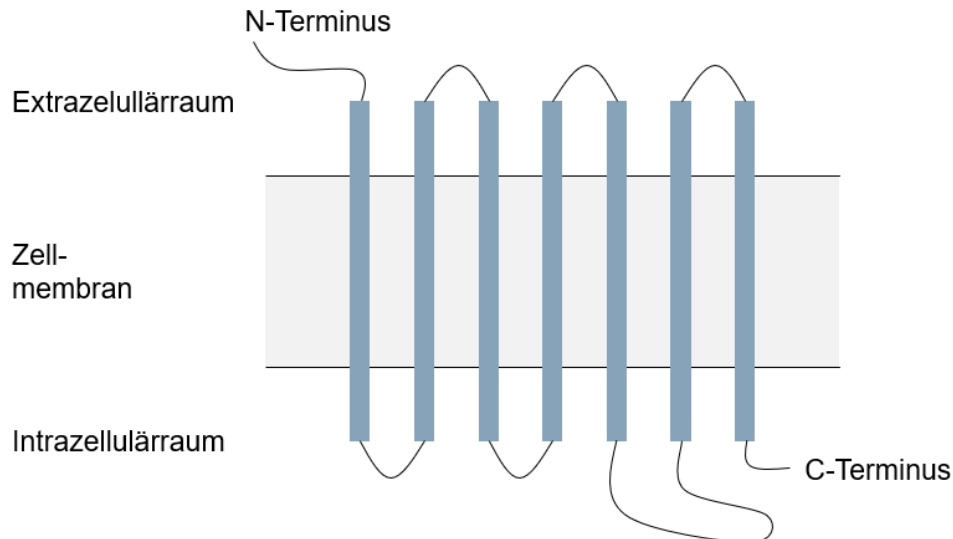


Abbildung 1 Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit 7 Transmembrandomänen (α -Helices), einem extrazellulären N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterscheiden sich vor allem in ihrem N-Terminus und der Lage ihrer Ligandenbindungsstelle. Sie können somit von einer Vielzahl an verschiedenen Signalmolekülen gebunden und für die Signalweiterleitung genutzt werden [12].

Einleitung

GPCRs sind Proteine aus ca. 350-800 Aminosäuren, die eine Molekularmasse von ca. 40-90 kDa besitzen. Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne kommt es bei vielen GPCRs zu der Ausbildung einer intrazellulären Schleife, welche maßgeblich für den Signalweiterleitungsmechanismus, auch als Signaltransduktion bezeichnet, verantwortlich ist [32].

Hiermit wird der gesamte Vorgang der Signalübermittlung bezeichnet. Beginnend mit den extrazellulären Signalen, die als Liganden fungieren (sog. ‚first messenger‘) und an den extrazellulären Teil des Rezeptors binden, über die daraus resultierende Kette verschiedener Signalkaskaden aus molekularen und biochemischen Wechselwirkungen bzw. Reaktionen, bis hin zur schließlich daraus folgenden Zellantwort auf der Intrazellulären Seite [14], [32].

Bei dieser kann es sich je nach Isoform des GPCR u.a. um einen Einfluss auf die Genexpression, den Stoffwechsel, Entzündungsprozesse, Proliferation und Differenzierung der Zelle handeln [32].

Ein entscheidender Mechanismus in der Signaltransduktion ist die Rezeptor-Liganden-Interaktion. Daraus resultiert eine Konformationsänderung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, die durch das sich intrazellulär befindliche heterotrimere G-Protein erkannt wird und infolgedessen dieses auch aktiviert.

Das inaktivierte G-Protein besteht aus 3 Untereinheiten: einer α -, β - und γ -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit GDP gebunden hat [32], [48]. Wird das G-Protein nun aktiviert, fungiert der aktivierte Rezeptor hierbei als ein GEF (guanine nucleotide-exchange factor), sodass GDP gegen GTP ausgetauscht wird, das G-Protein in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert und folglich Einfluss auf weitere Effektorproteine nehmen kann.

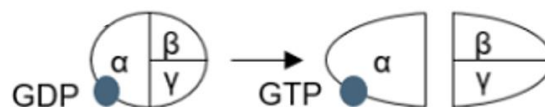


Abbildung 2 inaktives G-Protein mit GDP an α -Untereinheit gebunden (links) und aktives G-Protein mit GTP an α -Untereinheit gebunden und dissoziierter $\beta\gamma$ -Untereinheit (rechts)

Die Inaktivierung der G-Proteins wird durch die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit katalysiert. Es kommt folglich wieder zur Hydrolyse des GTP in GDP und P_i , wodurch sich die α - und $\beta\gamma$ - Untereinheiten wieder zusammenfügen. Beschleunigt wird dieser Prozess durch das GAP (GTPase aktivierendes Protein) [32].

Vereinfacht kann man zwei Signaltransduktionswege der GPCRs unterscheiden.

Einleitung

Bei GPCRs, die an das Adenylatcyclase-System gekoppelt sind, bindet das aktivierte G-Protein an die katalytische Einheit der Adenylatcyclase, welche durch Umwandlung von ATP in cAMP den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht.

Bei diesem G-Protein kann es sich um ein inhibitorisches (G_i - oder G_o) oder um ein stimulierendes (G_s -) Protein handeln, welches folglich mit seiner inhibitorischen (α_i - oder α_o) oder stimulierenden (α_s -) Untereinheit die Adenylatcyclase hemmen oder aktivieren kann. Durch die Hemmung der Adenylatcyclase sinkt folglich der intrazelluläre cAMP-Spiegel.

cAMP übernimmt die Funktion eines Botenstoffes (ein sog. ‚second messenger‘) und induziert verschiedene Signalkaskaden, die zu einer Zellantworten führen können.

Das Hauptaugenmerk liegt auf der cAMP-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die verschiedene Zielstrukturen phosphorylieren und somit entweder aktivieren oder deaktivieren kann. Zielstrukturen können sowohl verschiedene Stoffwechsell-enzyme, als auch spezifische Transkriptionsfaktoren sein [32], [48].

Diejenigen Gene, die cAMP-abhängig transkribiert werden, sind mit einer spezifischen Sequenz ausgestattet, die als ‚cAMP response element‘ (CRE) bezeichnet wird.

Die zuvor durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert und aktiviert einen spezifischen Transkriptionsfaktor, CREB (cAMP response- element- binding protein), der durch die Bindung an das CRE-Element der Gene die Transkription derselben induziert [32].

Durch Phosphodiesterasen wird 3',5' -cAMP in 5'-AMP umgewandelt und die durch cAMP vermittelte Signalkaskade beendet.

Sind GPCRs nun jedoch mit der Phospholipase C gekoppelt (G_q -/ G_{11} -Proteine) induziert das G-Protein mit seiner $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit die Aktivierung dieser, welche nun das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und das weiterhin membranständige Diazylglycerin (DAG) spaltet.

IP_3 führt durch Bindung an Ca^{2+} -Kanäle zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den Calciumspeicher (v.a. aus dem endoplasmatischen Retikulum) [32], [48]. DAG wird zum einen durch die Diazylglycerin-Lipase zu Arachidonsäure und weiter zu Eicosanoiden metabolisiert, die über weitere Kaskaden Zellantworten generieren [48], zum anderen aktiviert DAG Ca^{2+} -abhängig die Proteinkinase C (PKC). Diese induziert über eine Phosphorylierung verschiedener Proteine ebenfalls zelluläre Antworten [32].

Calcium führt als ein weiterer Botenstoff (‚messenger‘) meist indirekt über Ca^{2+} -bindende Proteine zu einer zellulären Antwort. Calcium kann z.B. über Troponin zu Skelettmuskelkontraktionen führen oder über Calmodulin weitere Effektorproteine (Kinasen und Phosphatasen) regulieren oder mit weiteren Proteinen interagieren.

Einleitung

Erwähnenswert ist hier u.a. der durch den Ca^{2+} -Calmodulin Komplex vermittelte Kontraktionszyklus der glatten Muskulatur durch die Aktivierung der Myosin-leichte Ketten Kinase (MLCK) [12], [32], [48]. Des Weiteren wird auch der Phosphatase Calcineurin in der Signaltransduktion der T-Zellrezeptoren eine zentrale Rolle zugeschrieben [32]. Abbildung 3 stellt stark vereinfacht die Signaltransduktionswege der GPCR dar.

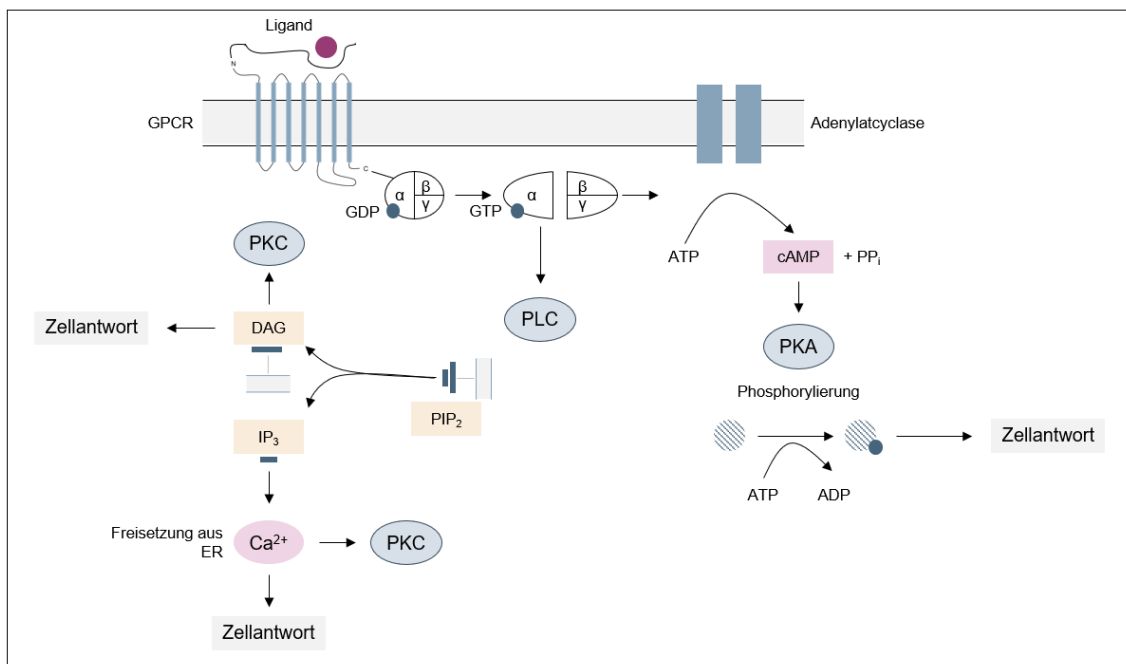


Abbildung 3 vereinfachte Signaltransduktionswege der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, frei nach [32] und [48]

Ferner übernimmt die $\beta\gamma$ -Untereinheit in der Signaltransduktion ebenfalls bedeutende Regulationsschritte. Unter anderem inhibiert sie die spontane Dissoziation des gebundenen GDPs und wird somit auch als GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) bezeichnet. Des Weiteren aktiviert bzw. hemmt sie weitere Effektorenzyme, reguliert die für die Signalbeendigung bedeutende G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) und steuert die Aktivität von Ionenkanälen [32].

Wie bereits erwähnt, sind die GRKs in der Signalbeendigung oder Desensibilisierung der GPCRs von zentraler Bedeutung. Die GRK bewirkt, sowie auch die PKA, eine Rezeptor-Phosphorylierung, sodass dieser ein Protein namens (β -) Arrestin binden kann, und die GPCRs somit nicht mehr aktiviert werden können. Durch die Arrestin-vermittelte Rekrutierung von Clathrin kommt es zur Membraninvagination, sodass der Rezeptor vom Liganden dissoziiert, durch Phosphatasen dephosphoryliert und wieder freigegeben werden kann. Infolgedessen erfolgt entweder die Rückkehr an die Plasmamembran oder der Abbau des Rezeptors [12].

1.1.2 Bedeutung der GPCR

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind bei der Regulierung des physiologischen Gleichgewichtes von großer Bedeutung. Ihnen und ihren Signalwegen wird seit langer Zeit bereits eine zentrale Funktion in der Kommunikation zwischen Zellen und Geweben zugeschrieben, die die Zellphysiologie maßgeblich beeinflusst und damit als Schnittstelle zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen angesehen wird [29].

Anhand der Vielzahl möglicher Liganden, die mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren können, der hohen Variabilität in Hinblick auf die Struktur und unterschiedlichsten Lokalisationen der GPCRs und der damit verbundenen Komplexität der Signaltransduktionen, folgt eine große Vielfaltigkeit in Bezug auf physiologischen Funktionen und Wirkungen der GPCR.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren existieren in einer großen Zahl und zeichnen sich durch eine hohe Ligandendiversität und Ligandenbindungsspezifität aus [14].

Es können zum einen endogene Liganden wie z.B. Hormone, Neurotransmitter, Zytokine, Chemokine, sowie Amine und deren Derivate, Aminosäuren, Proteine, (Neuro-) Peptide, Protonen und Ionen mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren.

Zum anderen können auch exogene Stimuli wie beispielsweise Geruchs- und Geschmackstoffe, sowie auch Photonen (Lichtteilchen) von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren regulieren [12], [14], [32], [48].

Darüber hinaus gibt es viele sog. verwaiste GPCRs („orphan-GPCRs“) deren Liganden bisher noch nicht identifiziert wurden. Sie werden inzwischen auf ca. 120-130 nicht-chemosensorische Rezeptoren geschätzt [14]. Es wird diskutiert, dass ca. 80% aller Neurotransmitter und Hormone ihre Wirkung über Interaktionen mit GPCRs entfalten [14]. Tabelle 1 zeigt zur Veranschaulichung exemplarisch eine kleine Auswahl dieser auf.

| Rezeptor | Nat. Ligand | Rezeptor Untergruppe | G-Protein |
|--|-------------------------|---|---|
| Adrenerge Rezeptoren | Adrenalin, Noradrenalin | α_1 α_2 β_1 β_2 β_3 | G_q G_i G_s G_s G_s |
| Muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor (mACh) | Acetylcholin | M1 M2 M3 M4 M5 | G_q G_i G_q G_i G_q |
| Serotonin Rezeptoren | Serotonin | 5-HT ₁ 5-HT ₂ 5-HT ₄ 5-HT ₅ 5-HT _{6,7} | G_i G_q G_s G_i G_s |

Einleitung

| | | | |
|---------------------|----------|----------------------------|--|
| Dopamin Rezeptoren | Dopamin | D1 D2 D3 D4 D5 | G _s G _i G _i G _i G _s |
| Histamin Rezeptoren | Histamin | H1 H2 H3,4 | G _q G _s G _i |
| Opioid Rezeptoren | Opiate | μ δ κ | G _i G _i G _i |
| Vasopressin | ADH | V1 V2 | G _q G _s |

Tabelle 1 Auswahl an Rezeptoren und Liganden, die mit G-Proteinen interagieren [12]

Da GPCRs als Schnittstelle zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen angesehen werden, können so v.a. die Funktionen von GPCR, die mit einer Stressreaktion assoziiert sind, wahrscheinlich die Verbindung zwischen den ersten zellulären Störungen, sprich einem beginnenden Krankheitsverlauf und der vollständigen Ausprägung einer Erkrankung bilden, wobei das Fortschreiten dieser vermutlich eine Kombination aus komplexen multidimensionalen Abläufen darstellt [29].

Aufgrund ihrer hohen Diversität sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und dessen Signaltransduktionswege eines der wichtigsten pharmakologischen Ziele. So können verschiedene Pharmaka diese zellulären Mechanismen modifizieren und/ oder regulieren, sodass sie Einfluss auf viele molekulare und somit physiologische und pathologische Faktoren nehmen können [14]. Nicht ohnehin haben bereits ca. 34% der von der FDA („food and drug administration“) zugelassenen Arzneimittel in den USA mindestens 108 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als pharmakologisches Ziel [29], [18], wobei diese Pharmaka indirekt oder direkt mit diesen interagieren. Dies geschieht entweder durch die Einflussnahme auf einen einzelnen Aspekt des Signaltransduktionweges oder die Regulation (Stimulation oder Inhibierung) dieser [29]. Die Stimulation eines Rezeptors erfolgt durch einen (ggf. partiellen) Agonisten und die Inhibierung durch Antagonisten.

Zur Veranschaulichung werden anhand von Tabelle 2 einmal exemplarisch adrenerge G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des sympathischen Systems mit ihren Wirkungen und ihrer Gewebeverteilung, den beteiligten Transmittern und ausgewählten Pharmaka, die mit diesen Rezeptoren interagieren, aufgezeigt [12].

Einleitung

| Rezeptor | Transmitter | Agonist | Antagonist | Gewebe | Funktion |
|-------------------------------|-------------|---------------------------------------|---|---|--|
| α_1 -Rez. (G_q) | A ~ NA | Naphazolin | Prazosin | Gefäße, glatte Muskulatur, Herz | Konstriktion/ Kontraktion |
| α_2 -Rez. (G_i) | A ~ NA | Clonidin α -Methyl- dopa | Yohimbin | ZNS, PNS | Neurotrans- mitter (NA-) Freisetzung |
| β_1 -Rez. (G_s) | NA ~ A | Isoprenalin | Metoprolol Bisoprolol Propranolol Carvedilol | Herz, Niere | Ino- und Chronotropie, Renin- Freisetzung |
| β_2 -Rez. (G_s) | A > NA | Fenoterol, Isoprenalin | Propranolol Carvedilol | Gefäße, glatte und Skelettmus- kulatur | Dilatation/ Relaxation |
| β_3 -Rez. (G_s) | NA = A | Isoprenalin | | Fettgewebe | Lipolyse |

Tabelle 2: Einteilung diverser Transmitter und Liganden (Pharmaka), sowie die Gewebeverteilung und Wirkung der adrenergen Rezeptoren (A: Adrenalin, NA: Noradrenalin) keine Vollständigkeit der Tabelle [12]

Viele weitere stark verbreitete Medikamente, wie z.B. Antihistaminika, selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer, β -Blocker oder auch β -Agonisten (Sympathomimetika), sowie ACE-Hemmer und Opiate, werden für die Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie u.a. Allergische Reaktionen, Depressionen, Herzinsuffizienz, Arterielle Hypertonie, Koronare Herzerkrankung, Asthma bronchiale oder auch für die Schmerztherapie eingesetzt [12], [14], dessen Pathomechanismen u.a. mit fehlregulierten GPCRs oder ihrer Signaltransduktionen in Verbindung gebracht werden können.

Die zusätzliche Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit vielen bereits identifizierten GPCR-assoziierten Proteinen, bedingt die Ausbildung von vielen intrazellulären Netzwerken, welche zusätzlich noch weitere Angriffspunkte für diverse Arzneimittel darstellen, da sie somit ebenfalls in Zusammenhang mit den GPCR-assoziierten Erkrankungen stehen.

Die hier dargestellten Aspekte untermauern die Diversität und Komplexität der Bedeutung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und macht es anschaulich, dass diese momentan ein zentraler Gegenstand der aktuellen Forschung vieler Institutionen und auch Pharmaindustrien sind [14].

1.2 Latrophiline

Die Latrophiline (Abk.: Lphn, engl.: Latrophilins) gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, genauer gesagt zur Familie der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (aGPCR) und sind hier in drei Isoformen: Latrophilin 1, Latrophilin 2 und Latrophilin 3 vertreten, die von den Genen *Lphn1-3* kodiert werden.

Nach genaueren Untersuchungen des starken Neurotoxins α -Latrotoxin, aus dem Gift der Schwarzen Witwe, folgte die Entdeckung der Latrophiline, die das biologische Ziel dieses Toxins als einer der α -Latrotoxin-Rezeptoren darstellen [34], [36].

α -Latrotoxin wirkt auf das periphere Nervensystem über Neurotransmitter-Freisetzungen in den verschiedensten Arten von Synapsen und kann somit u.a. zu starken Schmerzen, Lähmungserscheinungen bis hin zum Tod führen.

Ehemals wurden die Latrophiline auch als CIRL (engl.: Calcium independent receptor for α -Latrotoxin), bezeichnet, da die Wirkung des Neurotoxins hier über einen Ca^{2+} -unabhängigen Neurotransmitter Freisetzungsmechanismus erfolgt. [34], [6], [22].

Im Gegensatz dazu existieren Zelladhäsionsmoleküle namens Neurexine (NRXN), die einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus verfolgen. [34].

Latrophiline bzw. deren Isoformen sind zuerst auf Grund der α -Latrotoxin Wirkung vorwiegend in neuronalen Geweben vermutet worden, die neusten Studien zeigen jedoch eine weit verbreitete Ausprägung dieser in vielen verschiedenen, auch extraneuronalen, Geweben wie z.B. in Herz-, Lungen-, Milz-, Nieren- und Nebennierengewebe. Auf Grund dessen könnten den Latrophilinen bedeutende physiologische und auch pathophysiologische Funktionen zugeschrieben werden [34].

1.2.1 Aufbau der Latrophiline

Die Latrophiline (Abbildung 4) besitzen auf Grund ihrer Zugehörigkeit zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ebenfalls die charakteristische sieben Transmembrandomäne aus α -Helices. Diese verankern die Lphn in der Zellmembran und sind an der Vermittlung intrazellulärer Signalkaskaden beteiligt [34]. Die langen extrazellulären N-Termini der aGPCR, die u.a. mit der adhäsiven Funktion in Verbindung gebracht werden, grenzt sie zu den übrigen GPCR ab [17]. An diesem N-Terminus befinden sich, ausgehend von der Heptahelixstruktur in der Zellmembran mehrere Adhäsionsmoleküle, u.a. die für die aGPCR typische GAIN-Domäne (G-Protein-gekoppelte Rezeptor Autoproteolyse induzierende Domäne).

Einleitung

Die GAIN-Domäne kann weiter in eine N-terminale Subdomäne A und in eine C-terminale Subdomäne B unterteilt werden, in welcher sich die GPS-Stelle (G-Protein-gekoppelte Proteolyse Stelle) befindet, die das Molekül nach ihrer Spaltung in zwei nicht kovalent mit der Zellmembran verbundene Fragmente, das extrazelluläre NTF (N-terminale Fragment) und das CTF (C-terminale Fragment) unterteilt. Dieser Vorgang wird als heterologe Dimerisierung bezeichnet [34].

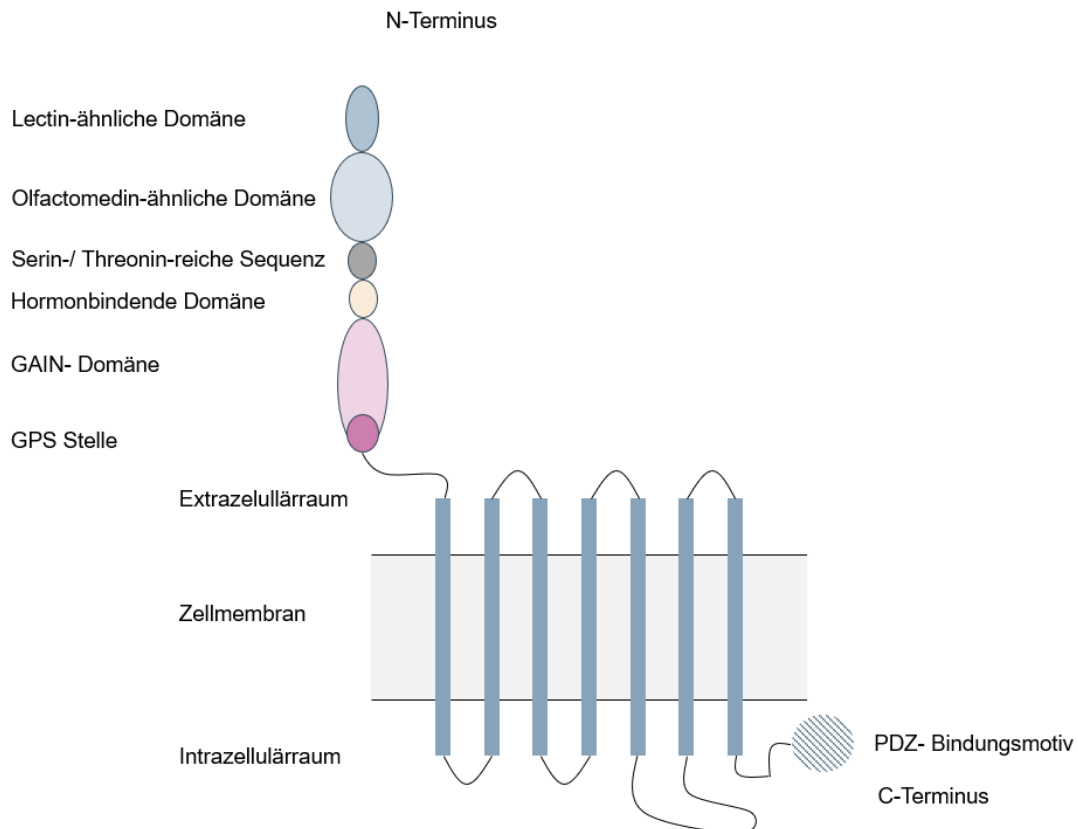


Abbildung 4 Exemplarischer vereinfachter Aufbau der Latrophiline, frei nach [34] und [36]

Des Weiteren befindet sich angrenzend an die GAIN-Domäne die Hormon-bindende Domäne, die auf Grund ihrer ähnlichen Struktur zum CRF-Rezeptor (engl.: Corticotropin-Releasing Factor-Rezeptor), für intrazelluläre Signaltransduktionen verantwortlich sein könnte. Der sich daran anschließenden Serin- und Threonin-reichen Sequenz, dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist, folgen die Olfactomedin-ähnliche und Lectin-ähnliche (RBL: Rhamnose-bindende Lectin) Domänen am N-Terminus [34].

Diese N-terminalen Adhäsionsmoleküle fungieren u.a. als Ligandenbindungsstelle für die bisher identifizierten endogenen Lphn-assoziierten Liganden (Tabelle 3) bzw. Interaktionspartner [17].

| Rezeptor | Endogene Liganden |
|----------|---|
| Lphn1 | TEN 2,4 NRXN 1 α , 1 β , 2 β , 3 β FLRT 1, 3 |
| Lphn2 | TEN 2 FLRT 3 |
| Lphn3 | TEN 3 FLRT 1, 3 |

Tabelle 3 Lphn Rezeptoren und Interaktion mit endogenen Liganden [56]

Exemplarisch aufgeführt bilden die Lectin-ähnliche und Olfactomedin-ähnliche Domäne zusammen eine Bindungstasche für Teneurine (TEN), neuronal exprimierte Typ-II-Transmembran Glykoproteine, wobei die Lectin-ähnliche Domäne als Hauptmotiv für diese Bindung ausreichend ist, jedoch die vollständige Interaktion nur mit der Olfactomedin-ähnlichen Domäne vollzogen werden kann. Die Olfactomedin-ähnliche Domäne ist ebenfalls als Hauptmotiv an Interaktionen mit Neurexinen (NRXN), präsynaptischen Typ-I-Transmembranproteinen, oder FLRT3 (Fibronektin- und Leucin-reiches Repeat-Transmembranprotein 3) beteiligt [34], [36], [56].

Extrazelluläre alternative Spleißansätze sind für mehrere Rezeptorvarianten und Isoformen der Latrophiline sowie für Varianten der Adhäsionsmoleküle verantwortlich.

Lphn-Gene sind sehr anfällig für alternative Spleißereignisse, dadurch wird die Lphn-mRNA unterschiedlich translatiert, woraufhin sich diese in ihrem extra- und/ oder intrazellulären Anteil unterscheiden können.

Diese Spleißansätze werden als physiologischer Prozess zur Regulierung und Modulierung der Ligandeninteraktion betrachtet und beeinflussen somit vor allem die Ligandenspezifität [34], [36], welche sich jedoch je nach Ligand unterscheidet. Es zeigte sich hierbei beispielsweise eine Modulation der Teneurin -Bindung durch alternatives Spleißen, jedoch keine bei FLRT3 [6]. Zudem sind die Spleißansätze gewebespezifisch und potenziell für unterschiedliche Funktionen (Bindungs- und/ oder Adhäsionsfunktionen) verantwortlich [34], [36].

Zuletzt befindet sich intrazellulär am C-Terminus das sogenannte PDZ- Bindungsmotiv. Diesem wird potenziell die Interaktion mit weiteren intrazellulären Proteinen zugeschrieben und die Beteiligung an diversen Signaltransduktionsmechanismen vermutet [34].

1.2.2 Bedeutung der Latrophiline mit Fokus auf Lphn3

Den Latrophilinen werden diverse biologische, physiologische und pathophysiologische Funktionen bzw. Ereignisse zugeschrieben. Durch die starke Expression der Latrophiline im Nervensystem und ihrer Interaktion mit den verschiedenen bisher identifizierten und assoziierten endogenen Liganden werden u.a. neurozentrisch essenzielle Funktionen vermutet [36].

So wird anhand der Durchführung mehrerer Untersuchungen die Beteiligung der Latrophiline, zusammen mit ihren Interaktionen und Komplexbildungen mit Lphn-assoziierten endogenen Liganden, an G-Protein abhängigen und unabhängigen Signaltransduktions- und Zelladhäsionsmechanismen nachgewiesen [7], [17], [34], [36], [49], [56] die u.a. für neuronale Entwicklungsprozesse, Ausbildung neuronaler Netzwerke und Modulationen kognitiver Funktionen verantwortlich sind [36]. Hierfür sind v.a. das axonale Wachstum [56], die Aufrechterhaltung der Synapsenfunktion [7], [36], sowie die Synapsenstabilisierung [6], [7]), -bildung und -entwicklung (Synaptogenese) [6], [17], [34], [36], [41], [56] durch neuronale Umformungsprozesse wie Zytoskelettlagerungen zu nennen [56].

Des Weiteren wird im Allgemeinen eine Verbindung zwischen den Latrophilinen, u.a. durch die Stabilisation von intrazellulären Adhäsionsereignissen und der Latrophilin-abhängigen Aktivitätszunahme des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin, zu der Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts der Zelle und dementsprechend zum Zellwachstum hergestellt [7]. Zudem wird bei den Latrophilinen eine Sensibilisierung der Neurone für die Verarbeitung und Modulierung der Wahrnehmung mechanischer Reize und damit eine bedeutende Rolle in der Mechanosensorik beschrieben [43].

In diesem Zusammenhang sind durch Dysregulationen und Varianten der Latrophiline, ihrer Liganden, deren (gemeinsam) induzierten Signaltransduktions- und Adhäsionsmechanismen die Beteiligung an einigen Erkrankungen, Störungen und Syndromen v.a. neurologischen und psychiatrischen Ursprungs, vermutet und ein Zusammenhang aufgedeckt worden [36].

So konnte bisher beispielsweise die Beteiligung von dysregulierten bzw. fehlenden Lphn1 Proteinen an mentaler Retardierung, Sprachverzögerung und Hörbehinderung [17], sowie von dysregulierten oder neuronenspezifisch deletierten Lphn2 an Schizophrenie, Mikrozephalie, Rhombencephalosynapsis (RES) nachgewiesen werden [36]. Eine generelle Lphn2 Deletion ist auf Grund von embryonaler Letalität nicht möglich, deshalb wird Lphn2 als ein zentraler Aspekt in der Entwicklung betrachtet [36], da es zudem auch an der Bildung von Herzklappen beteiligt ist [17]. Aufgrund dessen wird bei Lphn2, neben der Beeinflussung von neuronalen Funktionen, auch ein Zusammenhang mit der kardiovaskulären Gesundheit vermutet [34].

Einleitung

Latrophilin 3 ist bisher mit den meisten Neuropathologien, auf Grund von genetischen Ereignissen, assoziiert. Anhand mehrerer Studien können *Lphn3* Gendefekte und dementsprechend *Lphn3* Funktionsverluste u.a. mit einer Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung, kurz: ADHS [34], [36], [49], einer Autismusspektrum- Störung, die durch eine soziale Kommunikations- und Interaktionsstörung sowie stereotypisches Verhalten gekennzeichnet ist, Formen von Epilepsie, Substanzgebrauchsstörungen, als auch mit einer bipolaren Störung in Zusammenhang gebracht werden [36].

Wie zuvor bereits erwähnt, wurde eine Expression der Latrophiline ebenfalls in extra-neuronalen Geweben beschrieben [36]. So können diese, wie viele andere aGPCRs vorher bereits auch, mit Prozesse der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise kann es beim Lungenkarzinom durch *Lphn3* Missense Mutationen zum Ausfall und somit Funktionsverlust dieser Rezeptoren kommen, weshalb man diesen aGPCRs auch einer Art Tumorsuppressionsfunktion zuschreiben könnte [17].

Tumor-suppressor Gene stellen im Allgemeinen eine Aufrechterhaltung der Zellfunktion unter dem Einfluss von biologischem Stress sicher. Durch bestimmte *Lphn*-Mutationen hat man eine Dysregulation des Zellzyklus durch Verlust der Gewebepolarität feststellen können, die darauf schließen lassen, dass *Lphn*-Adhäsionsfunktionen und intrazelluläre Signalgebungen die Zellteilung beeinflussen könnten und dementsprechend mit der Induktion von malignen Prozessen, denen eine Dysregulation des Zellzyklus durch unkontrollierte Zellproliferationen zugeordnet werden, in Zusammenhang stehen können [34].

Die meisten Mutationen im *Lphn*-Gen, die mit Erkrankungen und/ oder Tumorentstehungen oder ähnlichen Prozessen assoziiert sind, werden dem Bereich der GAIN- Domäne beobachtet, sprich in dem Bereich des Proteins, dem die Modulation der Aktivität und biologischen Funktion zugeschrieben wird [34].

Zudem sind viele weitere Erkrankungen und Stoffwechselstörungen wie z.B. Diabetes mellitus mit Latrophilin-Rezeptoren in Verbindung gebracht worden [51].

Einleitung

Des Weiteren werden bedeutende Zusammenhänge zwischen den Latrophilinen und pulmonalen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale vermutet [11], [31]. So sind bereits in den glatten Muskelzellen der Atemwege bei Patienten mit Asthma bronchiale erhöhte Expressionen von Lphn3 (und Lphn1), sowie eine erhöhte Bindungsrate der ASM zum endogenen Lphn3 Liganden FLRT3 aufgefallen.

Lphn3-FLRT3 Interaktionen sind mit einer Verstärkung der Adhäsion und Proliferation der ASM, sowie einer verstärkten ASM-Kontraktion assoziiert, wie sie beim Asthma bronchiale typisch ist (siehe Kapitel 1.3.4).

Weiterhin wird ein vermutlich durch Asthma bronchiale bedingtes erhöhtes Vorhandensein von Lphn3-Rezeptoren auf den glatten Atemwegsmuskelzellen mit einer bei einem Entzündungsprozess vorkommenden verstärkten Interaktion und Adhäsion von Entzündungszellen bzw. Entzündungsmediatoren assoziiert [11], die an dem Auftreten und dem Fortschreiten der Erkrankung maßgeblich beteiligt sind [31].

Aufgrund dieser Erkenntnisse und daraufhin folgenden ersten Studienergebnisse, in denen die klinische Wirksamkeit eines rekombinanten humanen Lphn3-Antikörpers durch dessen positive Wirkung in Bezug auf die Regulation von Adhäsion, Proliferation und Kontraktion der glatten Atemwegsmuskelzellen, sowie die Einflussnahme auf die Expression von Entzündungsmediatoren, die u.a. mit Atemwegsentzündungen und Atemwegsumgestaltungen assoziiert sind, festgestellt wurde, können Latrophiline und deren endogene Liganden als ein potenziell vielversprechendes Ziel für die zukünftige molekulare Therapie („target“ Therapie) des Asthma bronchiale angesehen werden [11], [31]. Im Folgenden dieser Arbeit wird auf Grund der bisher vermuteten Assoziation zwischen pathophysiologischen Mechanismen der obstruktiven Atemwegserkrankung Asthma bronchiale und den Latrophilinen, unter besonderer Berücksichtigung von Lphn3 und der bisher beschriebenen Expression dieser in den glatten Muskelzellen der Atemwege, auf eine detailliertere Betrachtung der Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems eingegangen.

Latrophilin 3 wird somit in der besonderen Rolle des Asthmakandidaten Gens betrachtet und versucht in dieser Arbeit weiter dahingehend als solches beschrieben zu werden.

1.3 Anatomie und Physiologie des respiratorischen Systems

1.3.1 Makroanatomie des respiratorischen Systems

Das respiratorische System lässt sich topographisch in die oberen und in die unteren Atemwege einteilen. Zu den oberen Atemwegen zählen die Nasenhöhle, die Nasennebenhöhlen, der Pharynx und der Larynx. Zu den unteren Atemwegen lassen sich die Trachea, der extra- und intrapulmonale Bronchialbaum und die Alveolen zuordnen.

Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf dem Teil des unteren Atemwegs, aus diesem Grunde wird im Folgenden nur auf diesen genauer eingegangen.

Die Luftröhre (lat. Trachea) gliedert sich in die Pars cervicalis, die sich topographisch in der Halsregion befindet und in die Pars thoracica, die sich dem Mediastinum zuordnen lässt. Die Trachea setzt sich nach ihrer Aufzweigung, der Bifurcatio carinae, in die beiden Hauptbronchien, Bronchus principalis dexter und sinister, fort und geht in den Bronchialbaum der Lunge über.

Die Lunge (lat. Pulmo) befindet sich beidseits im Mediastinum des Thorax. Die Lungenspitze (Apex pulmonalis) ragt bis in die obere Thoraxapertur und die Lungenbasis ist dem Zwerchfell zugewandt. Die Lungenränder werden als Margines pulmonalis bezeichnet [45]. Von außen wird die Lunge von dem sogenannten Lungenfell, der Pleura visceralis, überzogen und geht am Lungenhilum in die Pleura parietalis, die der Thoraxwand anliegt, über [3].

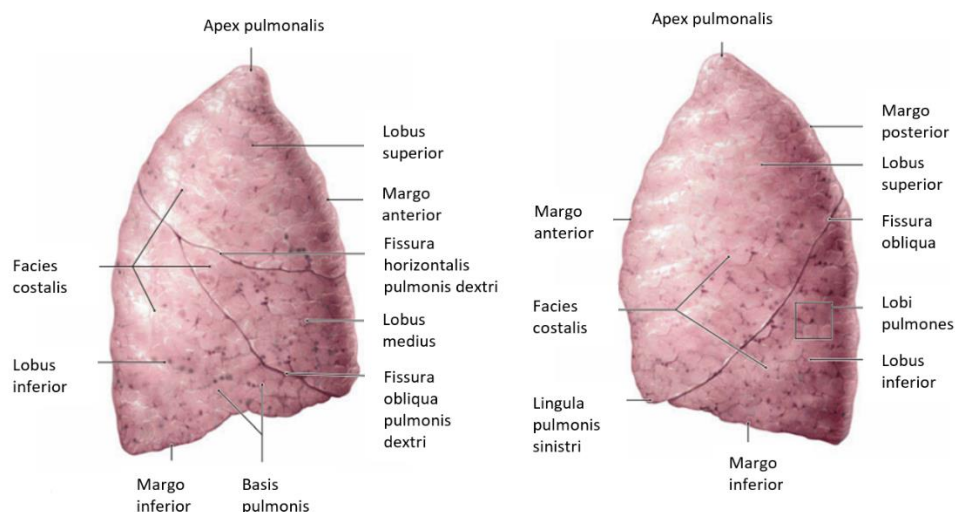


Abbildung 5 Makroskopischer Aufbau der rechten und linken Lunge in der ventralen Ansicht. Original: Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag (2020) [3], anschließend eigene Bearbeitung

Einleitung

Die makroskopischen Grundbaueinheiten sind nach dem Lungenflügel die Lungenlappen (Lobus pulmonalis dexter und sinister), welche sich weiter in Segmente unterteilen. Die kleinste fassbare Einheit ist nachfolgend das Lungenläppchen (Lobulus pulmonalis) [45].

Der linke Lungenflügel teilt sich in zwei Lungenlappen auf, die durch die Fissura obliqua getrennt wird. Der rechte Lungenflügel besteht jedoch aus drei Lungenlappen, die durch die Fissura horizontalis (cranial) und Fissura obliqua (kaudal) getrennt werden (siehe Abbildung 5).

Die Bronchi principales teilen sich weiter auf in rechts drei und links zwei Bronchi lobares (Lappenbronchien) und danach weiter in die Bronchi segmentales (Segmentbronchien). Anhand der Aufzweigung des Bronchialsystems ergibt sich die Segmentarchitektur der Lunge [45] (Abbildung 6).

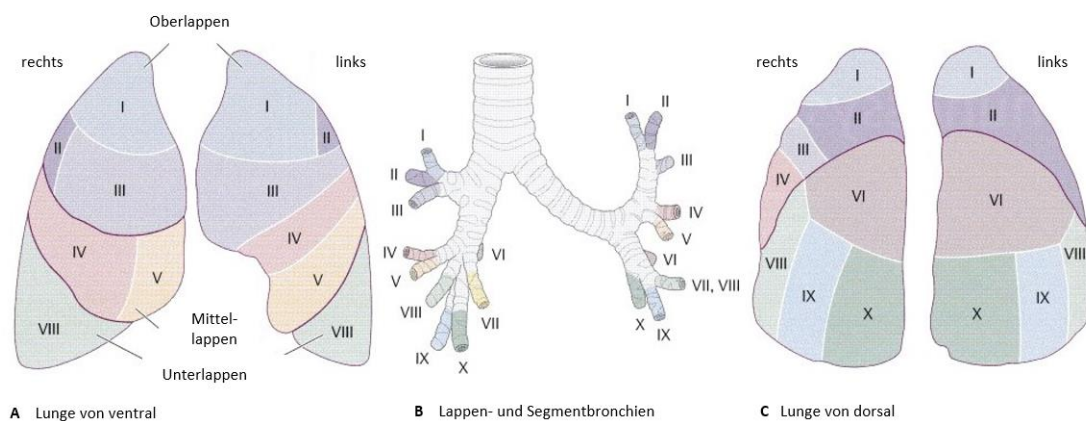


Abbildung 6 Lungenlappen und Lungensegmente. Original: Endspurt Klinik Innere Medizin und Chirurgie, Georg Thieme Verlag (2017) [54], anschließend eigene Bearbeitung

Funktionaler Aufbau des respiratorischen Systems

Funktionell kann man zwischen dem konduktiven (luftleitenden) und respiratorischen (gasaustauschenden) Abschnitt des respiratorischen Systems unterscheiden. Dies wird anhand des Aufbaus des Bronchialbaums deutlich (Abbildung 7). Grundsätzlich lässt sich der Bronchialbaum als sich dichotom verzweigende Röhren mit zunehmend kleinerem Kaliber beschreiben.

Der Systematik des Bronchialbaums folgend, gehören zu dem konduktiven Anteil: die Trachea, die Bronchi principales, lobares, segmentales und subsegmentales, die Bronchioli und die Bronchioli terminales.

Die Bronchioli respiratorii, der Ductus alveolaris und die Sacculi alveolares mit den Alveoli pulmonis werden dem respiratorischen Anteil zugewiesen [45].

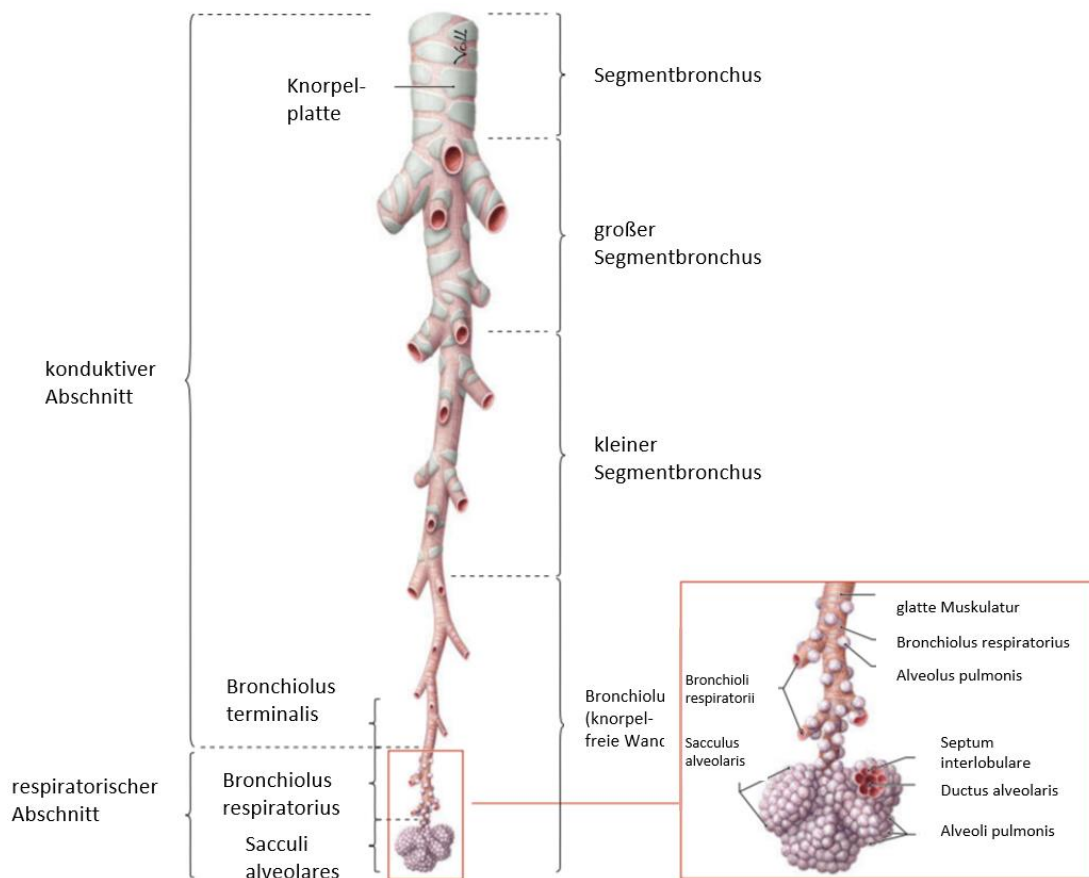


Abbildung 7 Funktioneller Aufbau des Bronchialbaums. Original: Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag (2020) [3], anschließend eigene Bearbeitung

1.3.2 Mikroanatomie u. Histologie des respiratorischen Systems

Die Trachea lässt sich in drei Gewebsschichten (Tunicae) gliedern (Abbildung 8).

Die Tunica mucosa wird in zwei weitere Schichten unterteilt. Die Lamina epithelialis der Tunica mucosa enthält ein mehrreihiges Flimmerepithel (Epithelzellen mit Kinozilien-saum) und Muzin produzierende Becherzellen, in der angrenzenden Lamina propria befinden sich seromuköse Drüsen, die Glandulae tracheales.

Die Tunica fibromusculocartilaginea wird im ventralen Anteil als Paries cartilaginea bezeichnet. Sie enthält hufeisenförmige hyaline Knorpelspangen (Cartilago trachealis), die durch elastische Fasern (Ligg. anularea) miteinander verbunden sind.

Dorsalseitig fehlen diese Knorpelspangen [55]. In dem als Paries membranaceus bezeichneten Anteil befindet sich eine Bindegewebs-Muskel-Platte. Die Bündel der glatten Muskelzellen werden als M. trachealis zusammengefasst [45].

Die Tunica adventitia der Trachea enthält vornehmlich lockeres Bindegewebe [55].

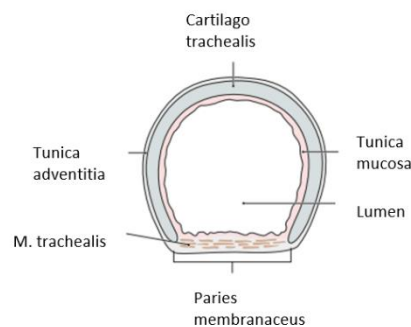


Abbildung 8 Schematischer Wandaufbau der Trachea. Original: Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag (2020) [3], anschließend eigene Bearbeitung

Der Wandaufbau des Bronchialbaums ist bis zu den Bronchien recht einheitlich gestaltet. Während sich in den Hauptbronchien noch hufeisenförmige Knorpelspangen befinden, werden diese in den folgenden Segmentbronchien durch unregelmäßig angeordnete Knorpelplatten ersetzt. Die glatten Muskelfasern sind hier als Tunica muscularis der Lamina propria folgend konzentrisch/zirkulär angeordnet, die durch eine dünne Schicht aus elastischen Fasern (Tunica adventitia) umspinnen wird (Abbildung 9). Mit den Bronchioli gehen der Wandknorpel und die seromukösen Drüsen (Gl. bronchiales) verloren, zudem ist durch die Fixierung bedingte Kontraktion der stark entwickelten zirkulär verlaufenden glatten Muskulatur die Schleimhaut sternförmig gefaltet.

Einleitung

Das Flimmerepithel ist hier nur noch einschichtig und es finden sich vereinzelt Keulenzellen, welche das Surfactant Protein und immunmodulatorisches Sekret sezernieren [55]. Die Bronchioli terminales sind die Endaufzweigung der Bronchiolen und entsprechen dem letzten Abschnitt des konduktiven Systems [55].

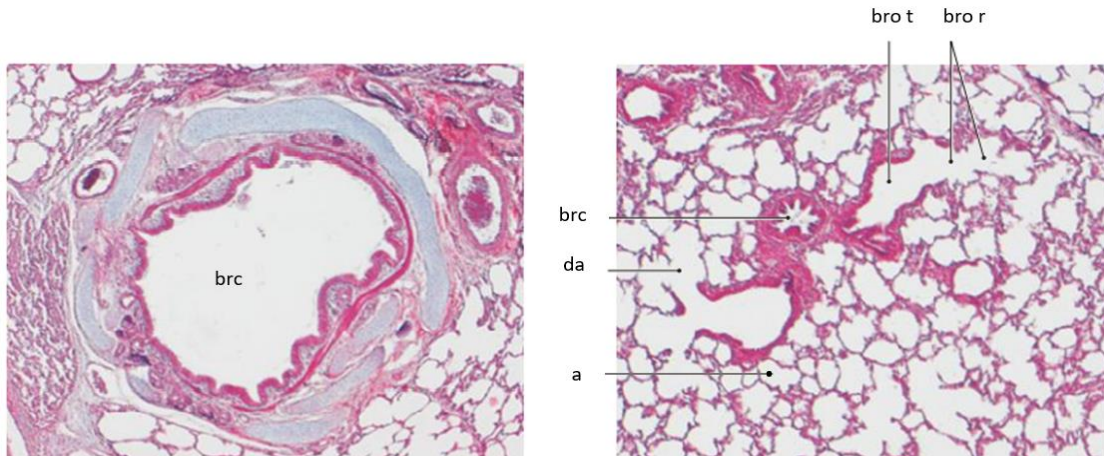


Abbildung 9 Querschnitt durch einen kleinen Bronchus (links) Lungenparenchym (rechts) in HE-Färbung mit Bronchiolus (brc), Bronchiolus terminalis (bro t), Bronchiolus respiratorius (bro r), Ductus alveolaris (da) und zahlreichen Alveolen (a) Original: N. Ulfig, Kurzlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag (2019) [55] anschließend eigene Bearbeitung

Mit den Bronchioli respiratorii, aus denen die Ductus alveolares mit den daran anliegenden Alveolen hervorgehen, beginnt der Gasaustausch. In den Bronchioli respiratorii können sich bereits einzelne Alveolen befinden. Die Wand der Bronchioli respiratorii besteht, neben dem ebenfalls einschichtigem Epithel ohne Zilien und Keulenzellen, aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasernetzen. In den Mündungen der Alveolen in den Ductus alveolares liegen Ringe aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen.

Der Gasaustausch findet über die Wände der Alveolen (Alveolarsepten) statt. Diese bestehen aus einem Bindegewebsseptum (ein Netzwerk aus kollagenen und elastischen Fasern) in denen die Lungenkapillare eingelagert sind. Auf beiden Seiten des Septums befindet sich eine dünne Epithelschicht [55].

Die dünnen Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I ermöglichen den Gasaustausch und bedecken ca. 90% der Alveolaroberfläche. In diesen sind vereinzelt Pneumozyten vom Typ II eingelagert, die ca. 10% der Alveolaroberfläche ausmachen. Diese produzieren ein Protein-Phospholipid Film, den sog. Surfactant, welches die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzt. Die Alveolarfläche beläuft sich insgesamt auf ca. 100-120 m² [45].

Einleitung

Die Alveolarmembran wird auch als Blut-Luft-Schranke bezeichnet. Die Strecke zwischen der Luft im Alveolarraum und dem Blut in den Kapillaren wird für den optimalen Gasaustausch möglichst kurzgehalten, sodass die Diffusionsstrecke geringgehalten wird. Die Blut-Luft-Schranke setzt sich zusammen aus dem Kapillarendothel, den Pneumozyten Typ I, deren an den Kontaktstellen verschmolzener gemeinsamen Basalmembran und dem Surfactant-Film [65] (siehe Abbildung 10).

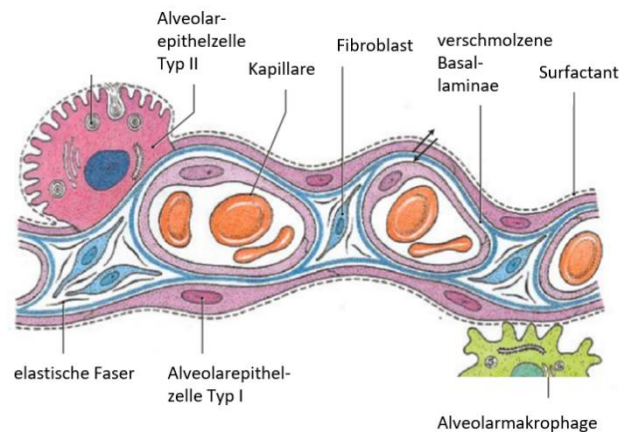


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Blut-Luft-Schranke. Original: N. Ulfig, Kurzlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag (2019) [55], anschließend eigene Bearbeitung

1.3.3 Physiologie der Lunge

Die Grundlegende Funktion des Respirationstraktes liegt im Gasaustausch. Dieser findet in der Lunge, genauer gesagt in den Bronchioli respiratorii und Alveolen statt. Das bedeutet es erfolgt die O_2 -Aufnahme aus der Atemluft in das Blut (Oxygenierung) und die CO_2 -Abgabe aus dem Blut in die Atemluft (Decarboxylierung). Die Funktion der Atemwege beläuft sich kurz beschrieben in der Befeuchtung, Erwärmung und Reinigung der Atemluft. Schadstoffe bleiben am Tracheal- bzw. Bronchialschleim haften, und werden durch das Flimmerepithel durch oralwärtigen Zilienschlag der Epithelzellen abtransportiert (mukoziliäre Clearance).

Der Sauerstofftransport lässt sich grob in vier Abschnitte zusammenfassen:

Zunächst erfolgt der konvektive Transport des O_2 aus der Atemluft in die Alveolen über die **Ventilation** [42]. Die Ventilation (Belüftung) beschreibt die Verteilung der Atemluft auf die verschiedenen Ventilationsräume, Der Raum des Gasaustausches ist der Alveolarraum. Die Bereiche, die nicht am Gasaustausch teilnehmen und zum konduktiven Abschnitt des Respirationstraktes zählen, werden als Totraum bezeichnet [65].

Einleitung

Als nächstes erfolgt die **Diffusion** (der Teilchenfluss) von O₂ über die Blut-Luft-Schranke vom Alveolarraum in das kapilläre Blut [42]. Die Diffusion von CO₂ erfolgt entgegengesetzt aus Kapillarblut in den Alveolarraum zur Abgabe an die Umgebungsluft. Treibende Kraft für die Diffusion ist der Konzentrationsunterschied bzw. Partialdruckdifferenz der Atemgase in Blut und Atemluft. Die Diffusion ist nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz zusätzlich abhängig von der Diffusionsfläche (entsprechend der Alveolaroberfläche), der Diffusionsstrecke und einer stoffabhängigen Kenngröße, dem Krogh'schen Diffusionskoeffizienten [65]. Anschließend erfolgt der konvektive Transport von O₂ mit dem Blutstrom zu den Gewebskapillaren, in denen es anschließend zur Diffusion von O₂ aus dem Blut in die Zellen kommt [42].

Die **Perfusion** (Durchblutung) der Lunge und die Verteilung des Blutes auf die Lungenabschnitte hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Oxygenierung des Blutes. Beispielsweise ist im Stehen auf Grund der Schwerkraft die Lungenbasis stärker durchblutet als der Lungenspitze. Um ein möglichst konstantes Perfusions-Ventilations-Verhältnis aufrecht erhalten zu können, wird die Perfusion z.B. durch den Euler-Liljestrand-Mechanismus (hypoxische pulmonale Vasokonstriktion) aufrechterhalten [65].

Die **Atemmechanik** beschreibt die physikalischen Prozesse, die bei der In- und auch der Expiration ablaufen. Druck- und Volumenveränderungen während der Atmung werden hierbei eine zentrale Bedeutung zugeschrieben und werden maßgeblich von Atemwiderständen bestimmt.

Die Inspiration (Einatmung) erfolgt durch die Kontraktion der Mm. intercostales externi, die zu einer Hebung des Rippenbogens und somit zu einer Erweiterung des Thoraxvolumens führen. Des Weiteren erfolgt die Inspiration durch die Kontraktion des Diaphragmas [42]. Hierdurch kommt es zu einem intrathorakalen Unterdruck, durch den die Atemluft in die Lunge gezogen wird [66].

Die Expiration (Ausatmung) geschieht zum einen aktiv durch die Kontraktion der Mm. intercostales interni, zum anderen passiv durch die Rückstellkraft der Lunge (bedingt durch die alveoläre Oberflächenspannung und die elastischen Fasern).

Bei forcierter In- und Expiration kann zusätzlich die Atemhilfsmuskulatur, auch auxilläre Muskulatur genannt, zum Einsatz kommen. Zu diesen zählen unter anderem die Mm. scalenii, der M. sternocleidomastoideus, die Mm. pectorales, Mm. serrati sowie verschiedene Bauchmuskeln [42]. Es kommt somit zum Hinauspressen der Atemluft aus der Lunge.

Einleitung

Da die Lunge auf Grund ihrer elastischen Eigenschaften stets das Bestreben hat, sich zusammen zu ziehen, entsteht ein sogenannter elastischer Atemwiderstand, den es bei der Inspiration zu überwinden gilt. Je geringer dieser Widerstand ist, desto höher ist die **Compliance**. Die Compliance ist ein Maß für die Volumendehnbarkeit der Lunge und beschreibt somit eine Volumenänderung, die durch Druckänderung bewirkt wird.

Die Gewebs- und Strömungswiderstände (**Resistance**), die die Atemluft beim Fluss durch die Atemwege überwinden muss, werden als visköse Atemwegswiderstände bezeichnet. Physikalischer Hintergrund ist hierbei die Anwendung des Hagen-Poiseuille-Gesetzes, welches den Volumenstrom bei laminarer Strömung in einem Rohr beschreibt. Auf die Atemwege bezogen bedeutet es, dass es durch die Einengung der Atemwege zur Erhöhung des Atemwegswiderstands, der Resistance, und zur Verringerung des Atemflusses kommt.

Die **Innervation** der Atemwege erfolgt vor allem durch das vegetative Nervensystem, somit wird sowohl die Weite als auch die Sekretionsfähigkeit der Bronchien und Bronchioli durch den Sympathikus und Parasympathikus unterstützend gesteuert.

Der Sympathikus bewirkt eine Bronchodilatation (Erschlaffung) und somit Erweiterung der glatten Bronchialmuskulatur.

Unter dem Einfluss des Parasympathikus hingegen, kommt es zur Bronchokonstriktion (Kontraktion) der glatten Muskulatur im respiratorischen System. Eine erhöhte Parasympathikus Aktivität kann ursächlich für viele Atemwegserkrankungen sein, bei denen es zu einer Einengung der Bronchien kommt [42].

Die **Regulation** der Atmung erfolgt im Atemzentrum, welches sich in der Medulla oblongata befindet. Dieses wird durch zentralnervöse-, chemisch-/ physikalische- und unspezifische Atemreize gesteuert. Erwähnenswert ist hier auch der Hering-Breuer Reflex: Durch Lungendehnungsrezeptoren (N. vagus) wird die Inspiration zum Schutz der Alveolen bei zu starker Dehnung gestoppt [65].

1.3.4 Pathologie der Lunge mit Fokus auf Asthma bronchiale

Da bei den Latrophilinen (insbes. Lphn3) ein potenzieller Zusammenhang zu Asthma bronchiale besteht, wird hier nur auf die Pathologie der Atemmechanik eingegangen. Man unterscheidet bei Störungen der Atemmechanik zwischen obstruktiven und restriktiven Ventilationsstörungen.

Eine restriktive Ventilationsstörung beschreibt einen Zustand, der die Ausdehnungsfähigkeit der Lunge und/oder des Thorax einschränkt. Somit ist die Compliance vermindert.

Einleitung

Zu den pulmonalen Restriktionen zählen beispielsweise die Lungenfibrose oder die exogen-allergische Alveolitis, während zu den extrapulmonalen bzw. thorakalen Restriktionen unter anderem verschiedene Thoraxdeformitäten zählen.

Im Gegensatz dazu wird neben der COPD auch das Asthma bronchiale zu den obstruktiven Ventilationsstörungen gezählt. Obstruktionen sind durch die Einengung der Atemwege und somit einer erhöhten Resistance gekennzeichnet [42].

Das Asthma bronchiale ist definiert als eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die mit einer spontanen und reversiblen Atemwegsobstruktion und einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems (BHR) einhergeht [20].

Es zählt weltweit zu einer der häufigsten chronischen Erkrankung und betrifft mit steigender Prävalenz ca. 300 Mio. Menschen [35].

Pathophysiologisch gekennzeichnet ist das Asthma bronchiale durch eine Trias aus Bronchokonstriktion, bedingt durch die Tonuserhöhung der glatten Muskelzellen im Bronchialsystem, die Dys- und Hyperkrinie, einer vermehrten und zähflüssigen Schleimproduktion bzw. -sekretion und eine ödematöse Schleimhautschwellung [20], [42] (siehe Abbildung 11).

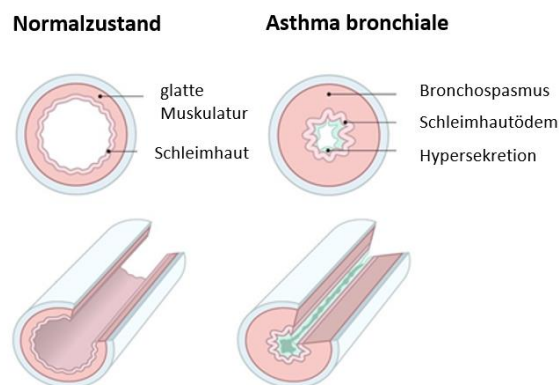


Abbildung 11 Querschnitt durch einen Bronchus - Vergleich Normalzustand und typ. Trias bei Asthma bronchiale. Original: https://media-de.amboss.com/media/thumbs/big_5c5c209fbb9d2.jpg, Amboss GmbH (2020) [64], anschließend eigene Bearbeitung

Typische Symptome sind z.B. das anfallsartige Auftreten von Dyspnoe (Atemnot), meist kombiniert mit Husten, einem expiratorischen Stridor (Giemen), einem thorakalen Engegefühl und einer Hyperventilation [2].

Die Erkrankung lässt sich vor allem in das allergische (extrinsisches/ exogenes) und nicht-allergische (intrinsisches) Asthma bronchiale unterteilen. Darüber hinaus lassen sich Mischformen, sowie noch weitere Formen und Unterformen (z.B. eosinophiles Asthma, belastungsinduziertes Asthma, medikamenteninduziertes Asthma, mit besonderem Augenmerk auf das sog. Analgetika-Asthma, GERD-assoziiertes Asthma, berufsbedingtes Asthma und saisonales Asthma) abgrenzen [2], [20].

Einleitung

Es lassen sich häufig Trigger identifizieren, die allergischer oder nicht-allergischer Genese sein können [2]. Für das allergische Asthma können insbesondere sog. ubiquitäre Allergene, wie Pollen, Tierepithelien, Hausstaubmilben oder Pilzsporen ursächlich sein [20].

Das nicht-allergische Asthma kennzeichnet sich durch ein Fehlen der allergischen Komponente. Trigger oder Auslöser können hierbei virale respiratorische Infektionen, Nebel, kalte Luft, unspezifische und nicht-allergene Reizstoffe wie z.B. Rauch (v.a. aktiver und auch passiver Tabakrauch) Luftschadstoffe und/ oder andere Noxen sein [2]. Es handelt sich hier meist um eine Erstmanifestation kurz vor oder im Erwachsenenalter, wobei sich das allergische Asthma hingegen meist schon früher (im Kindesalter) manifestiert [20].

Der Pathomechanismus des Asthmas entspricht einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I) mit einer vorherigen Sensibilisierung. Die Asthmatische Sofortreaktion erfolgt bei erneutem Kontakt des Allergens. Dieses bindet nun an Mastzellständige IgE-Moleküle, welches die Degranulation der Mastzellen und somit die Ausschüttung verschiedener (Entzündungs-) Mediatoren zur Folge hat. (u.a. Histamin, Interleukine, Chemo- und Zytokine) Die verzögerte asthmatische Reaktion beruht auf der durch v.a. Interleukine gesteuerten Einwanderung und Aktivierung von proinflammatorischen Zellen, insbesondere eosinophile Granulozyten, in die Bronchialschleimhaut. Durch die Sezernierung weiterer Effektorsubstanzen der eosinophilen Granulozyten resultiert eine chronische Entzündungsreaktion. Diese ist neben einer genetischen Prädisposition mitunter verantwortlich für entstehende Läsionen der Bronchialschleimhaut und einer daraus resultierenden BHR. [2], [5], [32]. Ebenso wird die chronische Entzündung für gewisse Umbauprozesse, das sog. Remodeling, diskutiert. Dieses zeichnet sich durch eine Hypertrophie der bronchialen glatten Muskelzellen und eine Fibrose des subepithelialen Gewebes aus.

Im Pathomechanismus scheint zudem die vegetative oder autonome Innervation der Bronchien ebenfalls von Bedeutung zu sein. Hier zeigt sich zum einen gehäuft eine Funktionsstörung der Acetylcholinrezeptoren, die für die bronchodilatatorische Wirkung verantwortlich sind, zum anderen werden im Rahmen der Entzündung auch proinflammatorische Substanzen aus autonomen Fasern freigesetzt [5].

Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung sind neben genetischen Faktoren auch gewisse Umweltbedingungen bzw. Gen-Umwelt-Interaktionen, sowie Allergenexpositionen, Feinstaub oder andere Luftschadstoffbelastungen wie z.B. Tabakrauch oder andere Noxen, als auch (Fehl-) Ernährung, die zu einem erhöhten Körpergewicht oder sogar zur Adipositas führt [30].

Einleitung

Die Diagnosesicherung Asthma bronchiale erfolgt durch mehrere Schritte. Zunächst wird mit Hilfe der Anamnese eruiert, ob die o.g. Symptome vornehmlich nachts oder frühmorgens auftreten, ob es eine pos. Familienanamnese hinsichtlich der Erkrankung zu berichten gibt oder ob Allergien und/ oder Auslöser der Symptomatik bekannt sind. Unerlässlich ist auch die körperliche Untersuchung, in der auskultatorisch in der Regel ein expiratorischer Stridor bei verlängertem Expirium zu vernehmen ist.

Entscheidend für die Diagnose ist die Lungenfunktionsanalyse. Anhand der Spirometrie oder Bodyplethysmographie lässt sich eine obstruktive Ventilationsstörung mit einer erhöhten Resistance und u.a. einer verringerten FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde/ Einsekundenkapazität) feststellen. Als Ergänzung hierzu wird mit Hilfe eines kurzwirksamen Bronchodilatators bei bestätigter Obstruktion ein Reversibilitätstest, auch Bronchospasmodolysetest genannt, durchgeführt. Dieser dient auch zur Abgrenzung zu anderen obstruktiven Ventilationsstörungen.

Bei noch nicht Bestätigter Obstruktion kann ergänzend ein Hyperreagibilitätstest, auch als Metacholin-Provokationstest bezeichnet, durchgeführt werden [2], [20], [30].

Anhand einer Blutgasanalyse lässt sich eine ggf. vermutete respiratorische Insuffizienz (kompensiert/ dekomensiert) ausschließen. Des Weiteren kann das Labor mit Hilfe des Differentialblutbildes Aufschluss über eine eosinophile Asthmakomponente geben.

Obligat ist auch die Durchführung einer Allergiediagnostik in Form eines Hauttestes und/ oder einer spezifischen Serum-IgE-Bestimmung [20].

Orientierend wird die Einteilung des Asthma bronchiale in kontrolliertes, teilweise kontrolliertes Asthma mit eingeschränkter FEV₁ und unkontrolliertes Asthma vorgenommen. Als Kriterien hierfür fließen, bezogen auf die letzten vier Wochen des Patienten, die Alltags-/ Aktivitätseinschränkungen ein, die Häufigkeit des Auftretens, insbesondere das Auftreten von nächtlicher Asthmasymptomatik und der Gebrauch der Bedarfsmedikation mit ein [35].

Die Therapie erfolgt individualisiert anhand einer Stufentherapie. Die Therapieauswahl richtet sich nach Alter und Adherence des Patienten, sowie Trigger, dem Phänotyp der Erkrankung, Häufigkeit und Schweregrad der Symptomatik [25]. Ziel ist es, eine Unterdrückung der asthmatischen Entzündungsreaktionen, eine Verringerung der Obstruktion, eine Verringerung der BHR und eine bestmögliche Asthmakontrolle und Erhaltung dieser zu erreichen [4].

Einleitung

Grundlegend sollten hierfür allgemeine (nicht-medikamentöse) Maßnahmen, wie die Verringerung bzw. Vermeidung der Allergenexposition, eine Nikotinentwöhnung, eine Optimierung des Körpergewichtes in Kombination mit körperlichem Training, physiotherapeutisches Atemtraining und Patientenschulungen durchgeführt werden [4].

Bei der medikamentösen Therapie werden sowohl kurzwirksame Medikamente für die Akut-/ Bedarfstherapie (sog. Reliever) als auch länger wirksame Medikamente zur Dauertherapie (sog. Controller zur Suppression der chron. Entzündung) eingesetzt [2], [20].

Generell kommen die folgenden Wirkstoffgruppen (*Beispielpräparate*) zum Einsatz:

Beta-2-Sympathomimetika: SABA (z.B. *Salbutamol/ Fenoterol*) und LABA (*Formoterol/ Salmeterol*), sowie Anticholinergika: SAMA (*Ipratropiumbromid*) und SABA (*Tiotropiumbromid*). Diese Präparate besitzen v.a. eine bronchodilatatorische Wirkung.

Des Weiteren werden inhalative Corticosteroide (ICS) mit einer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung, sowie LTRA: (Montelukast) mit einer schwachen antiinflammatorischen und bronchodilatatorischen Wirkung verwendet. Bei allergischem Asthma kommen zusätzlich IgE-Antikörper (*Omalizumab*) und v.a. bei eosinophilem Asthma neue Biologika (z.B. Anti-IL5: *Mepolizumab, Reslizumab, Benralizumab* oder Anti-IL4 (u.IL13) *Dupilumab*) in Frage [2].

Für eine optimale Therapie des Asthma bronchiale wird ein jährliches Follow-Up mit ggf. Therapieanpassung empfohlen [4].

Material

1.4 Antikörper

1.4.1 Primäre Antikörper

| Bezeichnung | Verwendung | Referenz |
|--|-----------------------|---|
| DAPI | IF | Carl Roth, Karlsruhe |
| Smooth Muscle α -Actin Cy3 mouse mAb (#C6198) | IF | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| α GFP (#A-11122) | IHC, IF, Western Blot | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| α GFP FluoTag | IF | NanoTag Biotechnologies GmbH, Göttingen |
| α HA Tag (#C29F4) rabbit mAb | IHC, IF, Western Blot | Cell Signaling Technology, Denvers, USA |
| α Tubulin (#T6199) mouse mAb | Western Blot | Sigma-Aldrich, Steinheim |

Tabelle 4 Primäre Antikörper

1.4.2 Sekundäre Antikörper

| Bezeichnung | Verwendung | Referenz |
|---|--------------|----------------------------|
| Cy3 Donkey α -rabbit IgG (#AP182c) | IF | Merck Millipore, Darmstadt |
| POX α -mouse IgG (#A3673) | Western Blot | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| POX α -rabbit IgG (#A6154) | Western Blot | Sigma-Aldrich, Steinheim |

Tabelle 5 Sekundäre Antikörper

1.5 Enzyme

| Produkt | Komponenten | Referenz |
|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Taq-Polymerase | Eigenproduktion | Dr. Stephan Maxeiner |
| Taq-Polymerase #2 | Eigenproduktion | Dr. Stephan Maxeiner |
| DreamTaq Polymerase | 10x Puffer, DNA- Polymerase, dNTP-Lösung | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Luna® Universal One-Step RT-qPCR-KIT | Luna® Universal One-Step Reaction-Mix Luna® Universal warm start® RT-Enzyme-Mix | New England Biologicals, Ipswich, USA |

Tabelle 6 Enzyme

Material

1.6 Primer – Startermoleküle für die PCR

| Name | Oligonukleotid-Sequenz | Genlocus | Anwendung | Referenz |
|---------|---|-----------|---------------------|----------------------|
| MX11603 | 5'CCCATTTTCCCTAAGAG- GAACGCCACGCTAG 3' | Lphn2 Gen | CL2 5'frt | Dr. Stephan Maxeiner |
| MX11604 | 5'GTGTGATGATCAGAG- TAACAGCAGTGTATC 3' | Lphn2 Gen | CL2 5'frt | Dr. Stephan Maxeiner |
| MX14656 | 5'AGTCGCTCGTGACGACCA- TAGAGGATAG 3' | Lphn3 Gen | CL3 5' frt and loxP | Dr. Stephan Maxeiner |
| MX14658 | 5'GGAGATGCATGTCAAATG- TAGGTAAC TG 3' | Lphn3 Gen | CL3 3' 2nd frt | Dr. Stephan Maxeiner |
| MX14659 | 5'CATTGCACCACAGGTGTT- CAGGTGCCAAC 3' | Lphn3 Gen | CL3 3' 2nd loxP | Dr. Stephan Maxeiner |
| CZs 805 | 5'GCCTGCATTAC- CGGTCGATGCAACGA 3' | Cre-Gen | Cre-PCR | Dr. Chen Zhang |
| CZs 806 | 5'GTGGCAGAT- GGCGCGCAACACCATT 3' | Cre-Gen | Cre-PCR | Dr. Chen Zhang |

Tabelle 7 Primer / Startermoleküle

1.7 RT-qPCR- Assays

| Assay Name | | Basenabfolge |
|--|---------|---|
| PrimeTime® Assay Std Probe 5' 6- FAM™/ZEN™/3' IB@FQ PRB.mmLphn1.pt | Lphn1 | /56-FAM/AGC CAC CTC /ZEN/ACC AAC TTC GCA /3IABkFQ/ |
| PrimeTime® Assay Std Probe 5' 6- FAM™/ZEN™/3' IB@FQ PRB.Lpn2qRTPCRassay.1.pt | Lphn2 | /56-FAM/AGA CGA GGG /ZEN/AGA CAA CGA TGC C/3IABkFQ/ |
| PrimeTime® Assay Std Probe 5' 6- FAM™/ZEN™/3' IB@FQ PRB.mmLphn3.pt | Lphn3 | /56-FAM/AGA ACA TGG /ZEN/GCC ACG GAA GTA CC/3IABkFQ/ |
| PrimeTime® Assay XL Probe 5' HEX™/ZEN™/3' IB@FQ Mm.PT.39a.22214843.g | Actin-b | /5HEX/CTG GCC TCA /ZEN/CTG TCC ACC TTC C/3IABkFQ/ |

Tabelle 8 RT-qPCR- Assays von Integrated DNA Technologies

1.8 Chemikalien

| | |
|---|--|
| 2-Propanol (100%/90%/80%) | Zentrales Chemikalienlager Univ. d. Saar- landes |
| Acrylamid 30% | Bio-Rad, München |
| Agarose Biozym LE | Biozym Scientific, Oldendorf |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) 10% | Bio-Rad, München |
| BCA-Protein Assay KIT | Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA |
| Betaine | Sigma Aldrich, Steinheim |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Biomol, Hamburg |
| Chemiluminescent Substrate Supersignal West Pico Plus luminal/ Enhancer Solution | Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA |

Material

| | |
|---|---|
| Chemiluminescent Substrate Supersignal West Pico Plus Peroxide Solution | Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, USA |
| Citrat | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Comassie brilliant blue | Bio-Rad, München |
| cOmplete Proteinase Inhibitor Tablette | Roche (Sigma Aldrich, Steinheim) |
| DAPI | Carl Roth, Karlsruhe |
| DirectZol RNA Mini Prep Plus | ZYMO Research, Freiburg |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| DreamTaq-PCR Reaktions KIT | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Eosin | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Ethanol | Zentrales Chemikalienlager Univ. d. Saarlandes |
| H ₂ O bidest. | Wasseranlage, Millipore, USA |
| H ₂ O ₂ | VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich |
| Hämalaun nach Mayer | Carl Roth, Karlsruhe |
| Hämatoxylin nach Ehrlich | Carl Roth, Karlsruhe |
| Heparin 5000 IE | B. Braun, Melsungen |
| HISTOPRIME® HistoGreen Substrate KIT | Linaris, Dossenheim |
| Horseserum | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Isofluran | Abbvie, Ludwigshafen |
| Magermilchpulver (sucofin) | TSI, Zeven |
| Methanol | VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich |
| Methylbutan/ Isopentan | Carl Roth, Karlsruhe |
| MgCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| Mowiol | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Nuclease-free water Ambion® | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Orange G | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Ponceau | Carl Roth, Karlsruhe |
| SDS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Stickstoff (flüssig) | Zentralmagazin, Uniklinikum des Saarlandes |
| TEMED | Bio-Rad, München |
| TritonX | Carl Roth, Karlsruhe |
| TRIzol® | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Tween20 | Sigma Aldrich, Steinheim |
| VECTASTAIN® ABC-KIT | Linaris, Dossenheim |
| Vector® Avidin-/Biotin Blocking KIT | Linaris, Dossenheim |
| Vector® NovaRED™ Peroxidase Substrate KIT SK-48000 | Linaris, Dossenheim |
| Vector® TrueVIEW® Autofluoreszenz Quenching KIT | Linaris, Dossenheim |
| Xylol | VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich |

Tabelle 9 Chemikalien

1.9 Lösungen und Puffer

| | | | |
|------------------|-----------|-------------------|---|
| 10% SDS | 10% (w/v) | 20 g ad 100 ml | SDS-Transferpuffer Aqua bidest. (pH 7,4) |
| APS- Stammlösung | 10% (w/v) | 1 g ad 10 ml | Ammoniumpersulfat Aqua bidest. |

Material

| | | | |
|--|--|--------------------------------------|--|
| Blocking Solution (BS) | 0,2% (w/v) 10% (v/v) 0,5% (10%) (v/v) 0,1 M | 0,2 g 10 ml 5 ml ad 85 ml | Bovines Serum-albumin Pferdeserum TritonX-100 Stock Lösung PBS |
| Carrier Solution (CS) | 0,2% (w/v) 1% (v/v) 0,5% (10%) (v/v) 0,1 M | 0,2 g 1 ml 5 ml ad 94 ml | Bovines Serum-albumin Pferdeserum TritonX-100 Stock Lösung PBS |
| Zitronensäure-Puffer (pH3/6/9) | 10 mM | 2,1 g ad 1000 ml | Citrat Aqua bidest. (pH 7,4) mit NaOH/HCl auf pH 3/6/9 titriert |
| Coomassie Färbelösung | 0,25% (w/v) 10%(v/v) 50% (v/v) | 1,25 g 50 ml 250 ml | Coomassie Brilliant Blue R-250 Essigsäure Methanol Aqua bidest. |
| cOmplete™-Lösung (25x) | | 1 Tbl. ad 2 ml | cOmplete™ (Roche) Aqua bidest. |
| Endogene Peroxidase-Blockierungslösung (POX-Block) | 10% (v/v) 1% (v/v) | 5 ml 400 µl ad 44,6 ml | Methanol H ₂ O ₂ PBS |
| Eosin | 0,1% (w/v) | 0,5 g ad 500 ml | Eosin Aqua bidest. |
| H ₂ O- DEPC | 0,1% (v/v) | | Aqua bidest. versetzt mit Diethylpyrocarbonat, 60 min. autoklavieren |
| Immunoblot-Blockierungslösung | 0,5% (w/v) | 2,5 g ad 50 ml | Magermilchpulver (Sucofin) TBST-Solution |
| Laird Buffer | 0,1 M 5 mM 0,2 M 0,2% (v/v) | 12,1 g 1,86 g 11,69 g 20 ml | Tris EDTA NaCl SDS-Lösung |

Material

| | | | |
|--------------------------------------|--|---------------------------|--|
| | | ad 1 l | Aqua bidest. (pH 8,5) |
| Lysis-Puffer | 1% (v/v) | 10 µl ad 1 ml | Proteinase K-Lösung Laird Buffer |
| NaCl (isotonisch) | 0,9% (w/v) | 9,5g ad 500ml | NaCl Aqua bidest. (pH 7,4), 60 min. autoklavieren |
| PFA (Paraformaldehyd) | 4% (w/v) | 4 g ad 400 ml | Paraformaldehyd-Pulver Aqua bidest. |
| | 2 M 0,2 M 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,2 M NaH ₂ PO ₄ | 115 ml 385 ml | Mit NaOH klären Phosphatpuffer aus Lösung A Lösung B |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) | 137 mM 2,7 mM 8,1 mM | 0,8 g 0,2 g 1,44 g | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O |
| Ponceau Färbelösung | 0,2% (w/v) 3% (v/v) | 1 g 15 ml ad 500 ml | Ponceau S Trichloressigsäure Aqua bidest. |

| | | | |
|---------------------|--|---|---|
| Proteinase K Buffer | 20 mg/ml | 1 g ad 50ml | Proteinase K Aqua bidest. |
| RIPA-Buffer | 10 mM 0,1% (v/v) 40 mM 2 mM 1% (v/v) 0,1% (v/v) | 1,5 ml 0,5 ml 1 ml 0,168 g 74,4 mg 1 ml ad 100 ml | Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O-Lösung (0,5 M) NaH ₂ PO ₄ -Lösung (0,5M) SDS-Lösung (10%) Natriumfluorid EDTA TritonX-100 Aqua bidest. (pH 7,2) 60 min. autoklavieren |
| | 10% (v/v) | 1 ml | Desoxycholat Lösung |
| Saccharose Lösung | 16% bzw. 30% (w/v) | 16 bzw. 30 g ad 100 ml | Saccharose PBS |
| SDS-Laufpuffer | 0,25 M 1,92 M 1% (v/v) | 15 g 72 g 50 ml ad 5 l | Tris-Base Glycin 10% SDS-Lösung Aqua bidest. (pH 8,3) |

Material

| | | | |
|---|-----------------------------------|--|---|
| SDS-Transferpuffer (1x) | 20% (w/v) | 200 ml 200 ml ad 1 l | 5x SDS-Transferpuffer Methanol Aqua bidest. |
| SDS-Transferpuffer (5x) | 50 mM 0,1 M 0,8 M | 15,4 g 18,5 g 144,2 g ad 2 l | Tris-HCl Tris-Base Glycin Aqua bidest. (pH 8,3) |
| TAE Buffer (1x) (Tris-Acetat-EDTA- Buffer) | 10 mM 1 mM | 121 mg 37,2 mg ad 100 ml | Tris EDTA Aqua bidest. (pH8) 60 min. autoklavieren |
| Tris-buffered Saline, 0,1% Tween20 Detergent (TBST) | 8,5 mM 1,7 mM 50 mM 0,1% | 2,68 g 0,4 g 5,8 g 2 ml ad 2 l | Tris-HCl Tris-Base NaCl Tween20 Aqua bidest. |

| | | | |
|----------------------------|--------|----------------------|---|
| Tris-HCl | 0,05 M | 6,06 g ad 1 l | Tris Aqua bidest, (pH 7,6) |
| Tris (pH 6,8) | 1 M | 30,29 g ad 250 ml | Trizmabase Aqua bidest, (mit NaOH auf pH 6,8 titriert) |
| Tris (pH 8,8) | 1,5 M | 45,43 g ad 250 ml | Trizmabase Aqua bidest, (mit HCl auf pH 8,8 titriert) |
| Quenching Solution (QS) | 0,1 M | 2,675 g ad 500 ml | NH ₄ Cl PBS (pH 7,4) |

Tabelle 10 Lösungen und Puffer

1.10 Mausstämme

| Name | | Herkunft |
|---|--|---|
| B6;129S6- <i>Adgrl3</i> ^{tm1Sud/J} | Modifizierte Mauslinie mit Lphn3-kodierender Exonsequenz (<i>Adgrl3</i>) flankierender LoxP-Site mit gefolgter frt-Sequenz zur HA-Tag Expression | Dr. Stephan Maxeiner, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Homburg |

Material

| | | |
|--|--|---|
| B6;129S6- <i>Adgr1</i> ^{2^{tm1Sud}/J} | Modifizierte Mauslinie mit heterologen LoxP-Sites und frt-Sequenzen zur alternativen Lphn2-Expression: GFP-Variante mVenus | Dr. Stephan Maxeiner, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Homburg |
|--|--|---|

Tabelle 11 Mausstämme

1.11 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Deckgläser (14x60mm) und Objektträger | Carl Roth, Karlsruhe |
| DEPEX mounting medium | VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich |
| dNTPs | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Einbettungsförmchen | Sakura, Torrence, USA |
| Einmalhandschuhe Nitril S | B. Braun, Melsungen |
| Eis | AF 100 Scotsman Flockeneisbereiter |
| Eppendorf Tubes (1,5ml/ 2ml/ 5ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Filterpapier | Merck, Darmstadt |
| Filtertips steril (0,1-10µl) | Biosphere, Bertinoro, Italien |
| Filtertips steril (200µl/1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Klarsichtfolie/ Parafilm M | Merck, Darmstadt |
| Midori Green Advance | NIPPON Genetics EUROPE, Düren |
| Mikroschraubenröhrchen (2ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| Mikrotiterplatte | Bio-Rad, München |
| Multititerplatte (6/12/96 well) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| Papiertücher | Tork (Essity), Mannheim |
| PAP-Pen Mini Liquid Repellent Slide Marker Pen | Science Services, München |
| PCR Tubes | Greiner Bio One, Gremsmünster |
| Probenleiter 50bp PCR | Zymo Research, Freiburg |
| Probenleiter 100bp PCR | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Probenleiter Precision Plus Protein All Blue Standards | Bio-Rad, München |
| Tissue Teck® O.C.T. Compound | Sakura TineTek, Torrance, USA |
| Trockeneis | Zentralmagazin, Uniklinikum des Saarlandes |
| Tubes/ Falcons (15ml/50ml) | Greiner Bio One, Gremsmünster |
| Western Blot Blottingpapier (Nitrocellulose Membran) | Greiner Bio One, Gremsmünster |
| Western Blot Filterpapier | Bio-Rad, München |

Tabelle 12 Verbrauchsmaterialien

1.12 Geräte

| | |
|--|--------------------------------------|
| Absaugeinheit LAB Laboport | Knf Neuberger, Freiburg |
| CFX-Connect Real Time system | Bio-Rad, München |
| ChemiDoc XRS+ System with Image Lab | Bio-Rad, München |
| CO ₂ Inkubator MCO-5AC (UV) | Sanyo electronic, Moriguchi, Osaka |
| Fluoreszenzmikroskop AxioImager M.2 mit Axio-Cam 512 color | Zeiss, Oberkochen |
| Hitzeblock | Grant Instruments, Shepreth, England |
| Homogenisator TissueRuptor | Qiagen, Hilden |
| Kern PFB 3000-2 Waage | Kern, Balingen |
| Kryostat CM 1950 | Leica, Nussloch |
| Kugelmühle Precellys | Avantor, Rednor, Township, USA |
| Lichtmikroskop CHK | Olympus, Hamburg |
| Magnetrührer IKAMAG® RET G | Kurt Migge, Heidelberg |
| Mikrowelle | Ok, Ingolstadt |
| Mikrozentrifuge | Carl Roth, Karlsruhe |
| Mikrozentrifuge accuspin Micro17 | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| MiniProtean Tetra System | Bio-Rad, München |
| NanoDrop One | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Schüttler ST 5, wippend | Zipperer, Ballrechten-Dottingen |
| SubCell® GT Gelektrophoresekammer mit Power-Pac Basic Supply | Bio-Rad, München |
| The Butterfly Rotor | Carl Roth, Karlsruhe |
| Thermal Cycler T100 | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Tischkühlzentrifuge 3-18 KS | Sigma, Osterode |
| Ultraschall-Homogenisator SonoPlus HD 2070 | Bandelin electronic, Berlin |
| Vortexer RS-VA 10 | Phoenix Instruments, Garbsem |
| VWR Orbital Shaker OS- 500 | Marshall Scientific, Hampton, USA |
| Wasserbad SWB 20 | Preiss-Daimler Medingen |

Tabelle 13 Geräte

2 Methodik

2.1 Tierisches Gewebe

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Gewebestandteile der Mäuse für verschiedene Untersuchungen herangezogen. Im Folgenden wird die Gewinnung, die Aufarbeitung und die Darstellung dieser genauer aufgezeigt. Im Verlauf ist es wichtig, bei der Verarbeitung des Gewebes durch z.B. ordnungsgemäße Lagerung auf Eis darauf zu achten, dass dieses vor dem Einfluss von natürlich vorkommenden gewebeangreifenden Enzymen geschützt ist und somit deren Abbau bzw. Zerstörung verhindert wird. Außerdem ist es von großer Bedeutung hygienisch und unter größtmöglicher Sorgfalt und Sauberkeit zu arbeiten, um Kontaminationen möglichst zu vermeiden.

2.1.1 Vorbereitung der Organentnahme

Um tierisches Gewebe (Mausgewebe) untersuchen zu können, müssen hierfür die Mäuse getötet werden. Unter Einhaltung der im Tierschutz Seminar (Veranstaltung der Tierschutzbeauftragten Fr. Dr. Frings) erlernten rechtlichen Grundlagen und Fähigkeiten, wurden in dieser Versuchsreihe die Mäuse unter dem Gesichtspunkt der Euthanasie durch die Inhalationsmethode von Narkosegas getötet. Hier fand das Narkosegas Isofluran Anwendung. Hierfür wurde die Maus unter möglichst geringen Stressbedingungen in ein dafür vorgesehenes Behältnis gesetzt. In diesem ist vorher ein in Isofluran getränkter Tupfer unter ein Trittgitter gelegt worden, sodass kein direkter Kontakt der Maus zu diesem bestand. Dieses Verfahren wurde unter dem Abzug durchgeführt. Die Maus wird in dem verschlossenen Behältnis somit zuerst narkotisiert und verstirbt schließlich durch eine Überdosierung des Narkosegases.

Nachdem der sichere Tod der Maus festgestellt wurde, wird die Maus auf einer Unterlage fixiert.

2.1.2 Direkte Präparation und Gewebeentnahme (für die folgende RNA- und Proteinanalyse)

Unmittelbar im Anschluss beginnt die Präparation zur Entnahme des tierischen Gewebes, um die Zerstörung bzw. den Abbau der Zellen und des Gewebes minimal zu halten. Hierzu wird der Thorax der Maus eröffnet und die Thoraxwand nach kranial geklappt und ggf. fixiert. Als nächstes wird das Mediastinum freipräpariert, die Trachea zusammen mit der Lunge dargestellt und anschließend entnommen. Das entnommene Gewebe wird in einer Petrischale, welches mit 1x PBS gefüllt ist, grob von Blut gesäubert.

2.1.3 Perfusion und Gewebefixierung (für die folgende IHC und IF)

Für die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz wird das tierische Gewebe nach dem Versterben der Maus direkt perfundiert. Die Fixierung ist entscheidend, um den Abbau von Antigenen, Zellen und Gewebe zu verhindern. Hierfür wird der Thorax der Maus ebenfalls eröffnet, die Thoraxwand nach kranial geklappt und fixiert. Zunächst wird das Herz der Maus freipräpariert, das Perikard eröffnet und eine Inzision an der Spitze des linken Ventrikels durchgeführt. Durch diese werden 300 µl Heparin 5000IE/ml gegeben und zur Druckentlastung das rechte Herzohr oder der rechte Vorhof, alternativ auch die Vena cava superior, eröffnet. Es folgt nun eine Spülung des Gewebes über den sich im linken Ventrikel befindenden Schlauchsystem (Butterfly) mit 19 ml 1x PBS. Die anschließende Fixierung erfolgt mit 50 ml einer 4%igen Paraformaldehyd (PFA) -Lösung.

Entnahme des fixierten Gewebes

Nach erfolgter Fixierung können nun die Lunge, die Trachea und das Herz präpariert werden. Die Trachea wird zur Fixierung an einem Faden aufgehängt und oberhalb abgetrennt, sodass das Herz-Lungen-Paket, im Folgendem auch als „Thorax-Paket“ bezeichnet, nach dem Durchtrennen der umliegenden Strukturen, herausgenommen werden kann. Nach der Entnahme wird das Thorax-Paket in einem 50 ml Sammelgefäß in 4%iger PFA-Lösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Nach 24 Stunden wird das Thorax-Paket aus der PFA-Lösung entnommen und in einer frisch angesetzten 16%igen Saccharose-Lösung in PBS im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Einbettung des fixierten tierischen Gewebes

Nach der Entnahme der fixierten Gewebe erfolgt die Einbettung. Dies geschieht mit Hilfe eines gefriergeschütztem Einbettungsmediums – dem TissueTek (Sakura® TineTek, Torrance, USA). Dieses wird in spezielle Einbettungsförmchen gefüllt, die Gewebe je nach gewünschtem Anschnitt darin platziert und mit TissueTek wieder überdeckt. Anschließend wird das Förmchen in mit flüssigem Stickstoff heruntergekühltem Isopentanschockgefroren und ca. 30 Sekunden darin belassen.

Danach wird der TissueTek/Gewebe-Block vorsichtig aus dem Förmchen herausgelöst, mit etwas TissueTek auf Filterpapier aufgeklebt und beschriftet und kann anschließend bei -80°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.1.4 Gewebeaufarbeitung

Kryoschnitte

Für die histologischen Untersuchungen, also beispielsweise die Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz der Thorax-Pakete, wurden diese im Kryostat (-20°C Umgebungs- und Messertemperatur, -22°C Schneideblocktemperatur) in verschiedenen Anschnitten auf eine Dicke von 10 µm zugeschnitten und auf Objektträger überführt. Diese wurden dann bei Raumluft getrocknet oder, falls nicht direkt verwendet, bei -25°C gelagert.

2.2 Genotypisierung – DNA-Analyse

2.2.1 Isolierung und Aufarbeitung der DNA

Um die Genotypen der Mäuse bestimmen zu können, muss man die DNA dieser Mäuse isolieren. Dies geschieht, indem im ersten Schritt Gewebebiopsien (Ohrstanzen) der Mäuse entnommen werden. Nun folgt die Aufarbeitung dieser.

Methodik

Man überführt diese in ein Reaktionsgefäß und gibt 400 µl Laird-Puffer sowie 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzu, sodass das Gewebe aufgeschlossen wird und die Nucleinsäuren freigesetzt werden. Dazu wird die Probe über Nacht im Wasserbad bei 55°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur (13.000 rpm) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß dekantiert. Das Pellet aus Zelltrümmern wird verworfen. Anschließend fügt man 400 µl 2-Propanol hinzu, welches nach gründlichem Schütteln des Gefäßes zur Präzipitation der DNA führt.

Es folgt eine weitere Zentrifugation (10 Minuten, 13.000 rpm, bei 4°C). Der Überstand kann nun verworfen werden. Des Weiteren werden 400 µl 70% Ethanol zum Waschen der DNA hinzugegeben und die Probe wird erneut für 10 Minuten (13.000 rpm, bei 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und die Probe wird für ca. 30 Minuten angetrocknet. Nun werden 200 µl H₂O-DEPC zum DNA-Präzipitat hinzugegeben, und das Reaktionsgefäß im Hitzeblock bei 65°C für 10 Minuten inkubiert, wodurch die DNA gelöst und DNAsen deaktiviert werden. Die DNA-Probe kann nun bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

2.2.2 Analyse der DNA – Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein molekularbiologisches enzymabhängiges Verfahren zur Amplifizierung bestimmter Gensequenzen. Dieses Verfahren wird hier verwendet, um die Allel-Kombination der Maus zu bestimmen, also um differenzieren zu können, ob es sich um eine Wildtyp-Maus oder eine genetisch modifizierte Maus handelt.

Bei der PCR kommt es zur Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen, die in jedem Zyklus der PCR einem Temperaturanstieg auf 95°C standhalten müssen – den sogenannten **Taq**-Polymerasen, die aus dem thermophilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen werden. Zusätzlich zu den DNA-Polymerasen werden zwei Oligonukleotide (Oligoprimer bzw. Startermoleküle) verwendet, die je zu einem DNA-Einzelstrangabschnitt gegenläufig komplementär sind.

Neben der DNA-Taq-Polymerase und den Oligonukleotid-Primern werden als Reaktionsansatz mehrere Reagenzien zu einem 'Mastermix' angesetzt, die im Voraus zusammen pipettiert werden (Tabelle 14). Hinzugefügt werden: doppelt destilliertes Wasser, 10x Puffer - zur Schaffung einer optimalen Reaktionsumgebung; MgCl₂, welches die Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP's) durch lösliche Komplexbildung in Raumstruktur zum Einbau in den DNA-Doppelstrang bringt; Rinderserumalbumin (BSA), Betaine, Dimethylsulfoxid (DMSO), dNTP's (Desoxynucleosidtriphosphate).

| Reagenz | Konzentration | Menge (µl) |
|---------------------------------|---------------|------------|
| Nuklease freies Wasser | N/A | 12,82 |
| PCR Puffer | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1,5 |
| Rinderserumalbumin | 10 mg/ml | 0,25 |
| Betaine | 5 M | 5 |
| Dimethylsulfoxid | 100% | 0,83 |
| dNTPs | 25 mM | 0,2 |
| Oligonukleotid-Startermolekül 1 | 100 µM | 0,2 |
| Oligonukleotid-Startermolekül 2 | 100 µM | 0,2 |
| Taq-DNA-Polymerase | N/A | 0,5 |

Tabelle 14 Einfacher Reaktionsansatz für die PCR

Es wird je 1 µl DNA (Template) zu 24 µl Mastermix hinzugegeben und in PCR Reaktionsgefäße überführt.

Die PCR erfolgt in drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Reaktionsschritten in einem automatisierten Thermostaten (T100 Thermocycler von Bio-Rad), die wie folgt eingestellt wurden:

- 1. Die **Denaturierung** zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei einer Temperatur von 95°C für 5 Minuten und in den weiteren Zyklusschritten für 30 Sekunden.
- 2. Das **Primer-Annealing** zum Anheften der Oligonukleotide (DNA-Primer) an komplementären DNA-Einzelstrang bei Absinken der Temperatur auf standardmäßig 59°C für 30 Sekunden.
- 3. Die **Elongation** zur Verlängerung durch dNTP-Anlagerung an das 3' Ende des komplementären DNA-Einzelstrangs mittels der Taq-Polymerase, sodass ein DNA-Doppelstrang entsteht. Dieser Reaktionsschritt findet bei einer Temperatur von 72°C für 45 Sekunden statt.

Diese Reaktionsschritte werden 39-mal wiederholt, sodass es zu einer exponentiellen Zunahme der Amplifikate (DNA-PCR-Produkte) kommt.

2.2.3 Visualisierung – Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, mit Hilfe dessen man DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülmasse auftrennen kann. Damit die aufgetrennten DNA-Fragmente, und damit deren Banden auf dem Agarose-Gel sichtbar werden, müssen diese mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes angefärbt werden. Zunächst wird das Agarose-Gel vorbereitet, dessen Konzentration je nach erwarteter DNA-Amplifikationsproduktgröße variiert und dementsprechend angepasst werden muss. In diesen Versuchen wird ein 1%-iges Agarose-Gel verwendet, es kommen somit 2 g Agarose auf 200 ml TAE-Puffer. Das Gemisch wird kurz aufgeköcht und anschließend werden 10 µl Midori-Green (NIPPON Genetics EUROPE, Düren) hinzu pipettiert. Danach wird das Gel in eine Form mit der entsprechenden Anzahl an Probenkammern in die Gelelektrophoresekammer gegossen.

Nach Aushärtung des Gels werden zu den amplifizierten DNA-Proben je 5 µl Orange G Ladepuffer (Sigma Aldrich, Steinheim) hinzu pipettiert und anschließend 25 µl der gesamten Probe in eine Geltasche eingebracht. Vorher wird jedoch die gesamte Gelelektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Neben den Proben kommen 25 µl einer Negativkontrolle (aus 24 µl Reaktionsansatz + 1 µl H₂O bidest. + 5 µl Orange G Ladepuffer) und 10 µl eines DNA-Basenpaarleiters hinzu. Dieser entspricht einem Gemisch aus DNA-Fragmenten definierter Größe: z.B. 100 Basenpaare. Die Gelelektrophoresekammer wird nun geschlossen und zur Erzeugung eines elektrischen Feldes nun eine Spannung angelegt. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode, die Laufgeschwindigkeit ist hier von der Größe der DNA-Fragmente abhängig. Nach erfolgter Auftrennung wird das Gel entnommen und die DNA-Fragmente können mittels eines Chemiefluoreszenzdetektionssystems (Chemi Doc XRS+ System) und UV-Licht durch die Midori-Green Emissionen sichtbar gemacht werden.

2.3 Nachweis der Transkriptmengen – RNA-Analyse

2.3.1 Isolierung und Aufarbeitung der RNA

Zur Analyse der Genexpression und somit zum Nachweis von Transkriptionsprodukten im Gewebe wird nun die RNA, ähnlich zur DNA-Analyse, isoliert, aufgearbeitet und im Anschluss nachgewiesen.

Methodik

Nachdem das Gewebe wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben präpariert wurde, werden die Anteile „Margo“, „Trachea“ und „Rest“ (siehe Kapitel 3.2.1) jeweils in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol® (TRI) pro 0,1 g Gewebe gegeben.

Dieses unterstützt die Zellyse, sodass RNA aus den Zellen freigesetzt wird und gleichzeitig aber auch RNAsen inaktiviert werden, welche die RNA zerstören würden. Anschließend werden die Proben mit Hilfe des „Tissue Ruptors“ (Qiagen, Hilden) mechanisch homogenisiert. Um Verschleppung von Zellmaterial der einzelnen Proben untereinander und generelle Kontaminationen zu vermeiden, wird der Tissue Ruptor zwischen den Homogenisierungen jeweils in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten in H₂O-DEPC gereinigt.

Nun werden die homogenisierten Proben mit einem zuvor bestimmten Volumen (hier: 500 µl) in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt und erneut 400 µl TRIzol® hinzugegeben, sodass das Gesamtvolumen nun 900 µl beträgt. Nach einminütiger Zentrifugation (13000 rpm, bei RT) wird der Überstand des Zelltrümmer-TRIzol®-Gemisches abpipetiert und zur Aufreinigung der Nukleinsäuren im 1:1 Verhältnis mit 100% Ethanol versetzt. Als nächstes wird das Säulenmatrixsystem aus dem Direct-zol® RNA Miniprep Plus Kit (Zymo-Research) aufgebaut und die RNA anhand des ‚Quick Protocols‘ weiter aufgearbeitet. Die RNA-Isolierung beruht hier auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Die RNA wird hierbei spezifisch von der Säulenmatrix gebunden und somit aufgereinigt. Hierzu wird die Säulenmatrix mit maximal 700 µl des Gemisches beladen, kurz zentrifugiert und die Flüssigkeit nach der Zentrifugation anschließend verworfen. Dieser Schritt wird so lange wiederholt, bis die gesamte Probenmenge über die Säule zentrifugiert wurde.

Im nächsten Schritt werden 400 µl „RNA-Wash Buffer“ hinzugegeben und die Säule erneut kurz zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird verworfen und es werden je 80 µl „DNAse-Treatment“ (aus 5 µl DNAse und 75 µl Verdauungspuffer) hinzugefügt und bei Raumtemperatur auf der Säule inkubiert. Nach 15 Minuten werden 400 µl „RNA-Pre Wash Buffer“ auf die Säule gegeben und kurz zentrifugiert, die Flüssigkeit wird anschließend wieder verworfen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Nun werden 700µl „RNA-Wash Buffer“ auf die Säule gegeben und anschließend für 2 Minuten zentrifugiert. Diese Vorgänge sorgen dafür, dass die RNA durch die Reagenzien von anderen Bestandteilen in der Säule abgetrennt, angereichert und aufgereinigt wird. Die Säule wird nun auf ein neues RNAse-/ DNAse-freies Eppendorfgefäß gesetzt und sofort mit 100 µl RNAse-/ DNAse-freiem Wasser beladen und zentrifugiert. Die RNA wird so von der Säulenmatrix gelöst und befindet sich nun in der eluierten Flüssigkeit.

Im Anschluss daran wird die RNA-Konzentration mit Hilfe eines NanoDrops (Thermo Scientific) gemessen. Anhand der bestimmten Konzentrationen können die RNA-Lösungen nun auf eine festgelegte Konzentration eingestellt werden, um ein einheitliches Weiterarbeiten zu gewährleisten. Die Proben werden durch das Hinzufügen einer errechneten Menge H₂O bidest. im Verhältnis 100 ng/µl in ein neues Reaktionsgefäß verdünnt.

2.3.2 Analyse und Visualisierung der Transkriptmengen-RT-qPCR

Die RT-qPCR (engl.: RealTime – quantitative polymerase-Chainreaction) ist wie die PCR (Kapitel 2.2.2) eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auch auf dem Prinzip dieser beruht, jedoch gleichzeitig die Quantifizierung der Nukleinsäuren möglich macht. Es liegt hier eine Kombination von PCR-Amplifikation und PCR-Nachweis vor und bedarf somit keiner Gelelektrophorese. Der Fortschritt der PCR kann hier in Echtzeit beobachtet werden, da ein chemischer Nachweis der Amplifikationsprodukte während den PCR-Zyklen mittels Fluoreszenz stattfindet. Hierfür kommen fluoreszierende Farbstoffe zum Einsatz, welche während der Amplifikation, also bei Anlagerung der Oligonukleotide freigesetzt werden. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zu der Zunahme der PCR-Amplifikationsprodukte, die während den PCR-Zyklen gemessen wird. Damit in diesen Versuchen RNA quantifiziert werden kann, muss diese vorher mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, welche dann im Anschluss amplifiziert und detektiert werden kann. Für die RNA-Analyse wird ähnlich der PCR zur DNA-Analyse zuerst ein „MasterMix“ angefertigt, der in einfachem Reaktionsansatz entsprechend Tabelle 15 zusammen pipettiert wird. Hierfür wurde das Luna® Universal One-Step RT-qPCR-KIT von New England Biologicals verwendet.

| Reagenz | Konzentration | Menge (µl) |
|---|---------------|------------|
| Nuklease freies Wasser | N/A | 6 |
| Luna® Universal One-Step Reaction-Mix (PCR-Mix) | 2x | 10 |
| Luna® Universal warm start® RT-Enzyme-Mix (Enzym-Mix) | 20x | 1 |
| Assay1 (Lphn 1/2/3 Assay - FAM), IDT | 20x | 1 |
| Assay2 (Actin-b Assay - HEX), IDT | 20x | 1 |

Tabelle 15 Einfacher Reaktionsansatz für die RT-qPCR

Der Luna® Universal warmstart® RT-Enzyme-Mix enthält unter anderem die Reverse Transkriptase und RNase-Inhibitoren, die den Abbau der RNA verhindern sollen. Die optimale Reaktionstemperatur für die Reverse Transkriptase liegt bei 55°C. Bei dieser wird die Reverse Transkriptase aktiviert und die vorhandene RNA kann nun in cDNA umgeschrieben werden. Der Luna® Universal One-Step Reaction-Mix beinhaltet die DNA-Polymerase, dNTPs und verschiedene Pufferkomponenten.

Der fluoreszierende Farbstoff, der während der RT-qPCR detektiert werden kann, ist im jeweiligem Reaktions-Assay enthalten.

In diesem Reaktionsansatz wird der Actin-b-Assay (HEX) als Referenz zu dem zu testenden Latrophilin (1/2/3) -Assay (FAM) verwendet. Der Mastermix wird nach dem Vortexen kurz anzentrifugiert und dann mit 19 µl in die 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wird dem Mastermix in der 96-Well-Mikrotiterplatte je 1 µl der zu testenden RNA-Probe hinzugefügt, wobei hier jede Probe als Triplet aufgetragen wird, um für die Auswertung einen statistisch signifikanten Mittelwert bilden zu können. Zur Messung wird die Platte in das „CFX-Connect Real-Time System“ gestellt und die PCR-Zyklen mit Hilfe des Programms „Bio-Rad Manager“ eingestellt (Tabelle 16).

| | Temperatur | Zeit | Funktion |
|----|------------|-------------|---------------------------|
| 1. | 55°C | 10 Minuten | Reverse Transkription |
| 2. | 95°C | 1 Minute | Anfängliche Denaturierung |
| 3. | 95°C | 10 Sekunden | Denaturierung |
| 4. | 60°C | 30 Sekunden | Amplifikation |

Tabelle 16 RT-qPCR Zyklus mit den einzelnen Reaktionsschritten

Methodik

Nachdem die Schritte 1 und 2 einmal durchgelaufen wurden, wiederholen sich die letzten zwei Zyklen 40-mal. Nach jedem Zyklus erfolgt eine Quantifizierung der Amplifikationsprodukte, indem der Proben-basierte Assay zur Fluoreszenz angeregt und detektiert wird. Mit Hilfe der Fluoreszenzintensität kann man die in den Proben enthaltene RNA quantitativ in Echtzeit graphisch erfassen.

2.4 Proteinnachweis

2.4.1 Isolierung und Aufarbeitung der Proteine

Um die Proteine im Folgenden untersuchen zu können, müssen diese vorerst aus den präparierten Geweben aufarbeitet werden. Nachdem das Gewebe wie in Kapitel 2.1.2. beschrieben für die Proteinanalyse präpariert wurde, wird dieses zuerst in ein Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss gegeben und abgewogen, um dessen Masse zu bestimmen. Hiernach richtet sich die Zugabe der Pufferlösung. Pro 0,1 g erfolgt eine Zugabe von 1 ml Puffer-Mix. Dieser besteht aus dem Proteinaseinhibitor-Mix [1 Tablette a 50 mg cOmplete mini EDTA-free in 1 ml Aqua (entspricht einem Verhältnis von 1:50)] und RIPA-Puffer im Verhältnis 1:25, damit die Proteine vor dem Abbau durch Proteinase geschützt sind und unter optimalen Reaktionsbedingungen weiterverarbeitet werden können.

Aus diesem Grund werden die Proben während des gesamten Vorganges ebenfalls auf Eis gelagert. Anschließend werden 2 Metallkügelchen hinzugegeben und das Gewebe in der Kugelmühle (für zweimal 20 Sekunden) fragmentiert. Die Proben wurden im Anschluss daran für 2 Stunden auf einer Wippe auf Eis gelagert. Nach der mechanischen Fragmentation wird das Gewebe mit einer Pipette in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, jeweils 10 Sekunden lang sonifiziert und 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (13000 rpm). Danach wird der klare Überstand löslicher Proteine in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pallet verworfen.

Falls diese nicht unmittelbar verwendet werden, werden die Proben bei -80°C gelagert.

2.4.2 Analyse und Visualisierung der Proteine – mittels Western Blot-Untersuchung

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen, die vorher nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt worden sind.

Bestimmung der Proteinkonzentration – Standardisierung

Zur weiteren Vorgehensweise wird nun die Proteinkonzentration in dem Lysat bestimmt. Die Messung und Standardisierung geschieht im Folgendem mit Hilfe des BCA™ Protein Assay-KITs (Thermo Scientific Pierce Biotechnology). Der BCA-Protein Assay ist ein Verfahren zur Proteinquantifizierung unter Verwendung der Bicinchoninsäure und basiert auf der Biuret-Reaktion. Zweiwertige Kupferionen werden durch Bindungen an das Protein zu einem einwertigen Kupferion reduziert, diese bilden durch die Anwesenheit der Bicinchoninsäure mit dieser einen blau-violetten Farbkomplex, der später detektiert wird.

Als nächstes wird eine Standardvorverdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen in eine 96-Well Multititerplatte mit je 25 µl pro Well pipettiert.

Die Auftragung der Lösungen erfolgt immer als Duplett. Nun werden Verdünnungsreihen der Proben angefertigt. Je eine 1:5 Verdünnung (20 µl der Probe zu 80 µl RIPA-Puffer) und anschließend eine 1:25 Verdünnung (20 µl der 1:5 Verdünnung auf 80 µl RIPA-Puffer). Diese werden ebenfalls als Duplett mit 25 µl je Well in die Multititerplatte pipettiert. Anschließend wird in jedes besetzte Well der Multititerplatte 200 µl des BCA-Mixes (1:50 CuSO₄/BCA) hinzu pipettiert, welche daraufhin 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert wird. Nach erfolgter Inkubation wird die Extinktion bei 562 nm im Spektrophotometer gemessen und die Konzentrationen der Proben, die sich hieraus ableiten lassen, zusammengestellt.

Nachdem die Konzentrationen der Proteine in den Proben anhand der Extinktionswerte berechnet wurden, fügt man diesen dementsprechend 6x SDS-Ladepuffer und RIPA-Puffer-Lösung hinzu, um zu gewährleisten, dass jede Probe eine einheitliche Konzentration an Proteinen besitzt. Die Proteinproben sind also nun standardisiert. Der SDS-Ladepuffer begünstigt die Auffaltung der Proteine und sorgt für die Negativierung der Gesamtladung. Dem wurde außerdem Bromphenolblau als Farbstoff hinzugesetzt, um das Fortlaufen der Proteine während der Gelelektrophorese beobachten zu können.

Auftrennung der Proteine – SDS-Page

Die SDS-Page (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis) ist eine Variante der Proteinauftrennung nach ihrer Molekülmasse, die im Folgendem Anwendung findet. Für die SDS-Page werden zuerst die Polyacrylamid-Gele gegossen, die als Trägermatrix fungieren. Diese bestehen aus einer Phase Trenngel und einer Phase Sammelgel, wobei hier zunächst das Trenngel (in den folgenden Versuchen: 10%ig) vorbereitet und gegossen wird. Die Komponenten werden wie in Tabelle 17 zu sehen zusammengegeben. Nach Möglichkeit werden APS und TEMED zum Schluss hinzugefügt, da es durch diese Reagenzien zum Start der Reaktion kommt. Anschließend wird das Trenngel in die Apparatur gegossen, und sofort mit Ethanol überschichtet. Das Trenngel wird zur Polymerisation ungefähr 30-40 Minuten stehen gelassen.

Als nächstes wird das Sammelgel (Tabelle 18) vorbereitet, das Ethanol verworfen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Direkt im Anschluss werden die Kämme schräg in das Sammelgel eingeführt, die zur späteren Ausformung von Geltaschen dienen. Das Gel wird nun wieder 30 Minuten zur Polymerisation stehen gelassen.

| Trenngel | 7% | 10% | 12% | 15% |
|--------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| H ₂ O bidest. | 15,3 ml | 12,3 ml | 10,2 ml | 7,20 ml |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) | 7,50 ml | 7,50 ml | 7,50 ml | 7,50 ml |
| 10% SDS | 0,30 ml | 0,30 ml | 0,30 ml | 0,30 ml |
| Acrylamide 30% | 9,90 ml | 9,90 ml | 12,0 ml | 15,0 ml |
| 10% APS | 0,15 ml | 0,15 ml | 0,15 ml | 0,15 ml |
| TEMED | 0,02 ml | 0,02 ml | 0,02 ml | 0,02 ml |

Tabelle 17 Zusammensetzung des Trenngels für den Western Blot

| Sammelgel | 2 Gele | 4 Gele | 6 Gele | 8 Gele |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| H ₂ O bidest. | 3,075 ml | 6,15 ml | 9,225 ml | 13,3 ml |
| 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) | 1,250 ml | 2,50 ml | 3,750 ml | 5,00 ml |
| 10% SDS | 0,050 ml | 0,10 ml | 0,150 ml | 0,20 ml |
| Acrylamide 30% | 0,670 ml | 1,34 ml | 2,010 ml | 2,68 ml |
| 10% APS | 0,025 ml | 0,05 ml | 0,075 ml | 0,10 ml |
| TEMED | 0,005 ml | 0,01 ml | 0,015 ml | 0,02 ml |

Tabelle 18 Zusammensetzung des Sammelgels für den Western Blot

Nun wird die Elektrophorese Kammer aufgebaut, die Gele in die Apparatur der Elektrophorese Kammer gestellt und die zentrale Kammer mit dem 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Anschließend werden die Kämme vorsichtig und gerade aus dem Gel herausgezogen und die Proteinproben zu je 25 µl in die Taschen beladen. Allem voran wird der Precision Plus Protein Standards All Blue Marker (Bio-Rad) mit 5 µl als Probenleiter aufgetragen.

Methodik

Die Kammer wird nun geschlossen und bei konstant 80 mA für 100 Minuten angeschaltet, sodass die Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Blotting – Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran

Nach der Proteinauftrennung in dem SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, also „geblottet“. Dafür wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die sich im Gel befindlichen negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode bewegen und somit auf eine Membran übertragen werden.

Hierfür wird die Blottingkammer vorbereitet und mit 1x SDS-Transferpuffer befüllt. Das Gel wird nun aus der Elektrophoresekammer herausgenommen, vorsichtig aus den zwei Glasplatten herausgelöst und anschließend die Sammelschicht des Gels entfernt. In einer Wanne gefüllt mit 1x SDS-Transferpuffer werden die „Blottingsandwiches“ zusammengebaut. Hier erfolgt eine Schichtung von Schwamm, Filterpapier, der Blottingmembran, dem Polyacrylamidgel, erneut einer weißen Filtermembran und einem weiteren Schwamm. Dem aufliegenden Filterpapier wird vorsichtig die Luft herausgestrichen, bevor der zweite Schwamm folgt, um einen optimalen Transfer der Proteine zu gewährleisten. Während des gesamten Vorgangs sollte darauf geachtet werden, dass die einzelnen Bestandteile des Sandwiches in 1x SDS-Transferpuffer getaucht sind.

Die „Sandwiches“ werden in die Apparatur eingespannt und in die Blottingkammer gestellt, sodass die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die Membran übertragen werden können. Es werden außerdem zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur ein Rührfisch und ein Kühlpack in die Blottingkammer gelegt, da durch das Blotten in der Kammer Wärme entsteht.

Die Kammer wird auf den Magnetrührer gestellt. Bei konstant 250 mA für 2 Stunden findet der Transfer der Proteine auf die Membran statt.

Die Proteine werden nun von dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Zum Nachweis einer erfolgreichen Gelelektrophorese können die Gele im Anschluss an den Transfer in einer Coomassie-Blau Färbelösung eingefärbt werden.

Zur Etablierung der optimalen Gelelektrophoresezeit können diese auch schon vorher direkt nach der Gelelektrophorese eingefärbt werden, um die optimale Auftrennungszeit der Proteine im Gel zu bestimmen.

Visualisierung – Immunreaktion der Proteine

Nach ca. 2 Stunden können die Membranen vorsichtig aus der Apparatur entnommen werden und in einem Schälchen für ca. 30-60 Sekunden in eine Ponceau-Lösung gefärbt werden, sodass die Banden auf der Membran sichtbar gemacht werden können. Anschließend wird die Membran vorsichtig unter Leitungswasser ausgewaschen.

Es erfolgt nun die Immunreaktion der Proteine, um diese sichtbar machen zu können. Hierfür wird die Membran für eine Stunde in 5%-iger Milchpulverlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Anschließend werden die Membranen in einer Folie zusammen mit dem in der Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gerichtet ist, eingeschweißt und über Nacht im 4°C Kühlschrank, oder auf dem Schüttler auf Eis, inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgt dann ein dreimaliger Waschschrift in TBST für jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler, um eine gleichmäßige Waschung zu gewährleisten. Danach wird die Membran in einem Schälchen zusammen mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls verdünnt in 5%-iger Milchpulverlösung, für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgt erneut ein dreimaliger Waschschrift in TBST. Nun wird die Membran mit der Chemiluminiszenzlösung für 5 Minuten unter Lichtabschluss in einer Klarsichtfolie inkubiert. Die Chemiluminiszenzlösung setzt sich im Verhältnis 1:1 aus der Super Signal West Pico Peroxidase Solution und Super Signal West Pico Plus Luminal Enhancer Solution zusammen, wobei dann jeweils 2 ml der Lösung auf die Membran aufgetragen werden. Die Proteinbanden und die Markerbanden können nun mittels des Chemiluminiszenzdetektionssystems (Chemi Doc XRS+ System) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.5 Histologische Untersuchungen

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (kurz: HE-Färbung) ist eine Routinefärbung in der histologischen Praxis, um verschiedene Gewebestrukturen durch Anfärbung unterscheiden zu können. Für diese Färbung werden im Folgenden Hämatoxylin nach Ehrlich oder Hämalaun nach Meyer und 0,1%-iges Eosin mit 2 Tropfen hinzugefügtem Eisessig verwendet.

Das Hämatoxylin und das Eosin werden vor Gebrauch filtriert und in Glasschalen überführt. Die gesamte Färbung findet unter dem Abzug statt. Die Objektträger mit den Kryoschnitten werden in eine Schaukel gelegt und gemäß dem Protokoll in die verschiedenen Glasschalen überführt.

Zu Beginn überführt man die Glasschaukel 9 Minuten lang in eine Glasschale gefüllt mit der Hämalaun-Lösung nach Meyer. Anschließend spült man die Schnitte kurz in H₂O bidest., um überschüssige Farbe zu entfernen. Nun werden diese 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser in einer weiteren Glasschale gebläut. Nach erneutem kurzen waschen in einer Schale mit H₂O bidest., werden die Schnitte in der Schaukel 45 Sekunden lang in 0,1%-iges Eosin überführt. Hierbei wurden erst kurz vorher 2 Tropfen des 99%igen Eisessigs hinzugegeben. Nun werden die Schnitte für je 2 Minuten in die aufsteigende Alkoholreihe überführt:

Man beginnt mit 90%-igem 2-Propanol, anschließend folgen 3 mal 100%-iges 2-Propanol und 3 mal 100%-iges Xylol. Während des Verbleibens der Schnitte für je 2 Minuten in der jeweiligen Glasschale wird ein Glasdeckel aufgelegt, um das Verfliegen des Alkohols möglichst gering zu halten. Zum Schluss werden die Schnitte zum Trocknen auf Papier gelegt und unter einem Deckgläschen mit DEPEX versiegelt.

2.5.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der bestimmte Proteine oder andere Gewebestrukturen sichtbar gemacht und somit im Gewebe lokalisiert werden können. Das Färbeprinzip der Immunhistochemie bzw. die Visualisierung beruht auf einer spezifischen Affinität von Antikörpern gegen Epitope nachzuweisender Proteine. Diese Antigen-Antikörper Wechselwirkung wird dann durch chromogenen Nachweis mittels eines Enzymsubstrats sichtbar gemacht.

Methodik

Man unterscheidet zwischen der direkten und der indirekten IHC-Methode. Bei der direkten Methode kommt ein Primärantikörper-Enzym-Komplex zum Einsatz, bei dem das in der Färbereaktion umzusetzende Enzym bereits an den primären Antikörper gekoppelt ist.

Bei der indirekten Methode findet die kombinierte Anwendung eines primären Antikörpers, der spezifisch das zu untersuchende Antigen bindet, und eines sekundären Antikörpers statt, der spezifisch an den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet und an das Enzym gekoppelt ist, welches im Anschluss daran durch die Färbereaktion sichtbar gemacht wird. Im Folgenden wird für die IHC der Lphn2 Knock-In Präparate der GFP-Antikörper (Invitrogen) und für die Lphn3 Knock-In Präparate der HA-Antikörper (Cell Signaling Technology) als primärer Antikörper verwendet, als sekundärer Antikörper dient der biotinylierte Antikörper aus dem VECTASTAIN®-KIT. Als tertiäres Reagenz wird das ABC-Reagenz, ebenfalls aus dem VECTASTAIN®-KIT, verwendet.

Nachdem das Gewebe, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben vorbereitet und wie in Kapitel 2.1.4 aufbereitet wurde, werden die Schnitte entweder direkt verwendet oder mindestens eine Stunde vorher aufgetaut und getrocknet.

Anschließend wird das „heat induced epitope retrieval“ HIER (Seite 68ff) zur Demaskierung der Antigenbindungsstellen unter Verwendung des Citratpuffers mit dem pH-Wert von 3 durchgeführt.

Als nächstes wird die erste Blockierung - die Blockierung der endogenen Peroxidase (POX), durchgeführt. Die endogene Peroxidase wird mittels einer 10% Methanol-, 1% H₂O₂-Lösung in 1x PBS für eine Stunde in einer Küvette inaktiviert. Hierbei ist eine charakteristische Bläschenbildung auf den Schnitten zu beobachten, die den Nachweis endogener Peroxidase-Reaktion darstellt. Danach werden die Objektträger 3x jeweils 5-10 Minuten in 1x PBS in der Küvette gewaschen.

Als nächstes folgt die zweite Blockierung - die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen. Dieser Schritt wird in einer feuchten Inkubationskammer durchgeführt, nachdem die einzelnen Schnitte mit Hilfe eines Fettstiftes umrandet wurden. Der Fettstift sorgt dafür, dass die pipettierten Flüssigkeiten nicht über den Rand auf die anderen Schnitte übertreten. Diese Blockierungslösung, bestehend aus 10 ml PBS und 150 µl Blocking Solution aus dem VECTASTAIN®-Kit, wird nun auf die einzelnen Schnitte mit je ca. 80-100 µl pipettiert (oder 200 µl je Objektträger) und für eine Stunde inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wird die Blockierungslösung abgesaugt und der primäre Antikörper (in verschiedenen Verdünnungen mittels Carrier Lösung und einer Negativ-Kontrolle) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Methodik

Der primäre Antikörper erkennt spezifisch ein bestimmtes Epitop, beispielsweise des Hämagglutinins oder des GFP-Proteins, welche als Modifikation an den Lphn-Proteinen vorliegen, sodass eine gerichtete Antigen-Antikörper Wechselwirkung stattfinden kann. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper durch einen 3-maligen Waschschrift für je 5-10 Minuten in einer Küvette mit 1x PBS abgewaschen und anschließend die sekundäre Antikörperlösung bestehend aus CS und sekundärem Antikörper aus dem VECTASTAIN®-KIT (in 1:200 Verdünnung) für 30 Minuten auf den Objektträgern in der feuchten Kammer inkubiert.

Der sekundäre Antikörper erkennt spezifisch den Fc-Teil des primären Antikörpers (IgG) und bindet an diesen. Die zu pipettierende Menge des sekundären Antikörpers entspricht der Menge des primären Antikörpers. Danach wird der sekundäre Antikörper abgesaugt und es folgt das Pipettieren des ABC-Reagenz aus dem VECTASTAIN® ABC-KIT, welches ebenfalls in der feuchten Kammer für 30 Minuten inkubiert wird. Das ABC-Reagenz ist ein auf Avidin-/Biotin-Enzymkomplex basiertes Detektionssystem, welches durch die Erkennung von biotinylierten Molekülen und der darauffolgenden Multienzymkomplexbildung zur Signalverstärkung führt. Avidin besitzt eine hohe Affinität zu Biotin mit jeweils 4 Bindungsstellen. In diesem Falle ist der sekundäre Antikörper aus dem Kit Biotin-gekoppelt, an welches das Reagenz bindet.

Nun werden die Objektträger erneut in einer Küvette mit 1x PBS 3-mal je 5-10 Minuten gewaschen. Anschließend wird das Chromogen auf den Objektträger pipettiert, welches das Substrat der im ABC-Reagenz gekoppelten Peroxidase darstellt und nun in der Färbereaktion umgesetzt wird. Hier findet vor allem das Chromogen Vector® NovaRED™ Anwendung, welches ein rotes Reaktionsprodukt hervorbringt. Das Chromogen setzt sich in einfachem Reaktionsansatz aus 10 ml destilliertem Wasser, 162 µl Reagenz 1, 100 µl Reagenz 2, 100 µl Reagenz 3 und 160 µl Wasserstoffperoxid Stocksolution aus dem Vector® NovaRED™ Kit zusammen und wird direkt vor Gebrauch angefertigt.

Zum anderen wird das Chromogen HISTOPRIME® HistoGreen verwendet.

Die Chromogenlösung wird für den einfachen Reaktionsansatz nach Tropfdosierung direkt vor Gebrauch aus 2 Tropfen HistoGreen Chromogen (Flasche 1), 1 ml HistoGreen Puffer (Flasche 2) und 2 Tropfen H₂O₂ (Flasche 3) hergestellt.

Je nach gewünschter Färbintensität (ca. 7-10 Minuten) erfolgt einmaliges Waschen in 1x PBS und das Trocknen der Objektträger mit anschließendem Versiegeln dieser durch DEPEX unter einem Deckgläschen.

2.5.3 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist ebenfalls eine biochemische Analysemethode und beruht auf dem Prinzip der Immunhistochemie. Das Prinzip bestimmte Proteine oder andere Gewebestrukturen sichtbar zu machen, beruht hier jedoch auf einem Fluoreszenznachweis der Antigen-Antikörper Wechselwirkung mit einem Fluorochrom - einem fluoreszierenden Farbstoff. In diesem Falle ist entweder der primäre oder der sekundäre Antikörper an ein Fluorochrom gekoppelt und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Zuerst werden die Schnitte ebenfalls für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wird analog zur IHC die Epitop Freilegung durch den Citratpuffer mit dem pH-Wert von 3 zur Demaskierung der Antigenbindungsstellen durchgeführt. („heat induced epitope retrieval“ – HIER: Seite 68ff). Für die IF der Lphn3 Knock-In Gewebe wird im Anschluss an die Demaskierung nun die Blocking Solution für 60 Minuten in der feuchten Kammer, nach erfolgter Fettstiftumrandung der Schnitte, mit je 200 µl pro Objektträger pipettiert. Nach einem 3-maligem Waschschrift in 1x PBS für je 10 Minuten erfolgt die Inkubation des primären Antikörpers – αHA (Cell Signaling Technology) – über Nacht. Am darauffolgenden Tag werden die Schnitte erneut 3-mal in 1x PBS für je 10 Minuten gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper für eine Stunde. Hier fand der Alexa Fluor 548 Cy3-Antikörper donkey-anti-rabbit (Merck Millipore) Anwendung. Dieser Schritt, so wie auch die Folgenden, geschehen nun unter Lichtabschluss, um einen Verlust der Fluoreszenz bzw. das Ausbleichen der Schnitte zu vermeiden. Der überschüssige Antikörper wird anschließend wieder 3-malig in 1x PBS für je 10 Minuten abgewaschen.

Für die IF der Lphn2 Knock-In Gewebe wird im Anschluss an die Demaskierung eine sogenannte Quenching Solution verwendet, in die die Schnitte in einer Küvette für 10 Minuten eingetaucht werden, um auftretende Hintergrundfluoreszenz besonders im grünen Fluoreszenzspektrum zu mindern. Es folgt ein Waschschrift in 1x PBS für 5 Minuten und nach erfolgter Fettstiftumrandung in der feuchten Kammer das Pipettieren der Blocking Solution, die für 60 Minuten auf den Schnitten verbleibt. Im Anschluss daran erfolgt ein 3-maliger Waschschrift in 1x PBS für je 5 Minuten und die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper – NanoTag® αGFP FluoTag (NanoTag Biotechnologies GmbH) – über Nacht. Der Antikörper wird anschließend wieder 3-malig in 1x PBS für je 10 Minuten ausgewaschen. Im Anschluss daran erfolgte bei beiden Gewebetypen hier eine DAPI-Färbung, mit Hilfe dessen Zellkerne durch Anlagerung von 4'6'-Diamidin-2-Phenylindol an doppelsträngige DNA und anschließender Anregung mit UV-Licht im Mikroskop cyanfarbend angefärbt werden.

Methodik

Diese Färbung kann gleichzeitig mit der Antikörperimmunfluoreszenz durchgeführt werden, da DAPI kurzwelligere Emissionsmaxima aufweist und somit eine Signalüberschneidung oder ein Ausbleichen des Schnittes kaum vorkommt.

Zur Minderung der Autofluoreszenz der Gewebe findet im Anschluss an die DAPI-Färbung die Behandlung der Gewebe mittels des VECTOR® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching Kits Anwendung (Seite 73). Dieses wird nach Protokoll aus gleichen Anteilen der Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:1:1 (je 50 µl pro Schnitt) angesetzt und für 4 Minuten inkubiert.

Nach erneutem waschen in 1x PBS für 5 Minuten werden die noch feuchten Schnitte mittels MOWIOL versiegelt. Nun können die Gewebestrukturen im Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) sichtbar gemacht werden. Die Schnitte werden bei Nichtverwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.6 Auswertung, Statistik und graphische Darstellung

Für die Auswertung der Experimente erfolgt die Bestimmung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehlern (S.E.M.: standard error of the mean) und die Diagrammdarstellung mit Hilfe von Microsoft-Excel. Für die Signifikanztestung wird der Student-t-Test mit einem festgelegtem Signifikanzwert von $p < 0,05$ (und Hochsignifikanzwert von $p < 0,01$) angewendet.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird für die Untersuchung zur Ausprägung der Latrophilins in der Lunge unter besonderer Berücksichtigung des *Lphn3* zunächst der Weg des *Lphn* Gens zur Umsetzung in das *Lphn* Protein verfolgt. Für diese Untersuchungen werden genetisch modifizierte Tiere (Mäuse) bzw. deren Gewebe herangezogen, bei denen der für *Lphn* kodierende Genabschnitt zur Detektion markiert wurde (Knock-In Tiere).

Der hier aufgezeigte Weg wird anhand des DNA-Nachweises mittels PCR, gefolgt von der Transkription der DNA in die mRNA, dessen Transkriptionsprodukte mittels der RT-qPCR detektiert werden können, aufgezeigt. Anschließend erfolgt der Proteinnachweis durch Antikörpernachweis mittels Western Blot. Abschließend erfolgt eine histologische Gewebeuntersuchung durch Protein-Immunreaktionen (IHC/ IF) in ausgewählten Gewebeproben.

Die Tiere wurden von Dr. Maxeiner zur Verfügung gestellt. Bei der Züchtung und Verpaarung der Tiere gilt es die Mendelschen Vererbungsregeln zu beachten. Nach diesen ergibt sich laut der 1. Regel (Uniformitätsregel) bei der Kreuzung zweier homozygoter Elternteile, die sich in mindestens einem Allelpaar unterschieden (hier: *Lphn* Knock-In oder Wildtyp-Allel) eine Tochtergeneration mit einheitlichem heterozygotem Genotyp. Bei der Verpaarung von zwei dieser heterozygoten Tiere, kommt es laut 2. Mendel'scher Regel (Spaltungsregel) zu einer genotypischen Aufspaltung in einem Zahlenverhältnis von 1:2:1. Hieraus ergeben sich nun in Bezug auf diese Arbeit bezogen folgende Genotypen: ein homozygotes Knock-In Tier, zwei heterozygote Tiere (Knock-In/ Wildtyp) und ein homozygotes Wildtyp-Tier).

3.1 Identifikation der Tiere

Die Polymerase Kettenreaktion ist wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, ein Verfahren, um spezifische Gensequenzen zu amplifizieren und somit die Allel-Konstellation des Tieres bestimmen zu können. Diese dient während der gesamten Arbeit dazu, eine gesicherte Probenauswahl zur Untersuchung der jeweiligen Proteine treffen zu können.

Die *Lphn2*-Knock-In Tiere sind genetisch modifizierte Tiere, denen an das *Lphn2*-Gen eine kodierende Sequenz des Markerproteins namens „mVenus“, angehängt wurde.

Ergebnisse

Auf Grund der Ableitung des mVenus von GFP („green fluorescent protein“ aus der Quallenpezies *Aequoria victoria*) fungiert dieses als Erkennungsepitop für Antikörper, mit Hilfe dessen die Expression des Lphn2 detektiert werden kann

Die Oligonukleotid-Primerkombination aus MX11603 und MX11604 identifiziert die Tiere in Bezug auf das genetisch modifizierte *Lphn2*-Gen oder den entsprechenden Lphn2-Wildtyp.

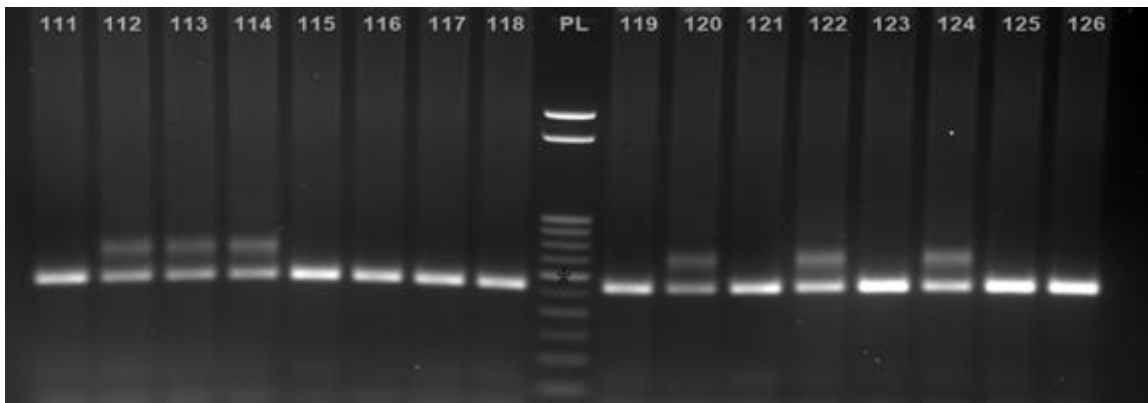


Abbildung 12 Lphn 2 PCR der Tiere #111-126 (Oligonukleotid Primerkombination MX11603 und MX11604) und einem 50 Basenpaarleiter (PL: 50 bp Probenleiter mit * bei 300 bp) mit sichtbarer Lphn2 Allel Bande bei 333 bp und einer Wildtyp Allel Bande bei 266 bp.

Exemplarisch handelt es sich bei den Tieren #112-114, 120, 122 und 124 um ein heterozygotes Tier in Bezug auf das modifizierte *Lphn2* Gen und bei den Tieren #111, 115-119, 121, 123, 125 und 126 entsprechend um ein homozygotes Wildtyp tier (Abbildung 12).

Die Lphn3 Knock-In Tiere sind genetisch modifizierte Tiere, denen an die Lphn3-kodierende Sequenz (*Adgrl3*) eine kodierende Sequenz des Proteins Hämagglutinin (kurz: HA) angehängt wurde. Mit Hilfe der angehängten HA-Sequenz, die als Erkennungsepitop für Antikörper dient, kann somit die Expression des Lphn3 detektiert werden.

Die Oligonukleotid-Primerkombination aus MX14656 und MX14658 identifiziert die Tiere in Bezug auf das genetisch modifizierte *Lphn3*-Gen oder den entsprechenden Lphn3-Wildtyp.

Exemplarisch handelt es sich bei den Tieren #107 und 110 um ein homozygotes Tier in Bezug auf das modifizierte *Lphn3* Gen und bei den Tieren #111 und 118-121 entsprechend um ein heterozygotes Tier (Abbildung 13).

Bei den Tieren # 108, 112, 114, 116 und 117 kam es zu keinen bzw. keinen eindeutigen Bandensignalen, weswegen diese somit nicht in die Probenauswahl fallen.

Ergebnisse

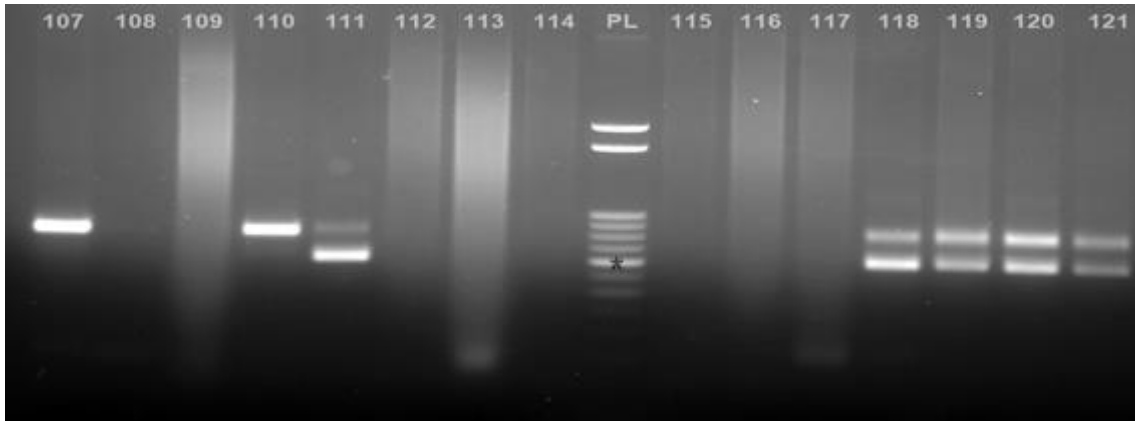


Abbildung 13 Lphn3 PCR der Mäuse #107-121 (Oligonukleotid- Primerkombination MX14656 und MX14658) und einem 50 Basenpaarleiter (PL: 50 bp Probenleiter mit * bei 300 bp) mit sichtbarer Lphn3-Allel Bande bei 419 bp und einer Wildtyp-Allel Bande bei 318 bp.

3.2 Lokalisation der Latrophiline (Lphn2 und Lphn3)

Der Kern dieser Arbeit beschäftigt sich mit der explorativen Untersuchung der Latrophiline mit Hauptaugenmerk auf Lphn3 und dessen Expression sowie genaueren Lokalisation in der Lunge. In vorherigen Veröffentlichungen wird bereits die Expression des Lphn3 in der Lunge beschrieben und die Lokalisation u.a. von *Faiz et al.* (2017) im Abschnitt der glatten Muskelzellen vermutet.

In dieser Arbeit wird versucht, die Ausprägung der Latrophiline mit Hilfe von genetisch veränderten, d.h. Epitop markierten (mVenus oder HA) Proteinen, genauer aufzeigen und beschreiben zu können, um somit über ein besseres Verständnis über mögliche physiologische und pathophysiologische Funktionen verfügen zu können.

3.2.1 Präparation des Gewebes – Differenzierung der unterschiedlichen Lphn3 Lokalisationen

Zur weiterführenden Untersuchung des Gewebes erfolgt eine Auftrennung des thorakalen respiratorischen Traktes in die Abschnitte „Trachea“, „Margo“ und „Rest“.

Das Ziel dieser Aufteilung ist es, im Folgenden die mRNA-Konzentration durch die RT-qPCR und die Proteinkonzentration durch den Western Blot nicht nur auf die Lunge im Gesamten zu beschränken, sondern eine genauere Zuteilung bzw. Lokalisation des Latrophilin 3 möglich zu machen (Abbildung 14).

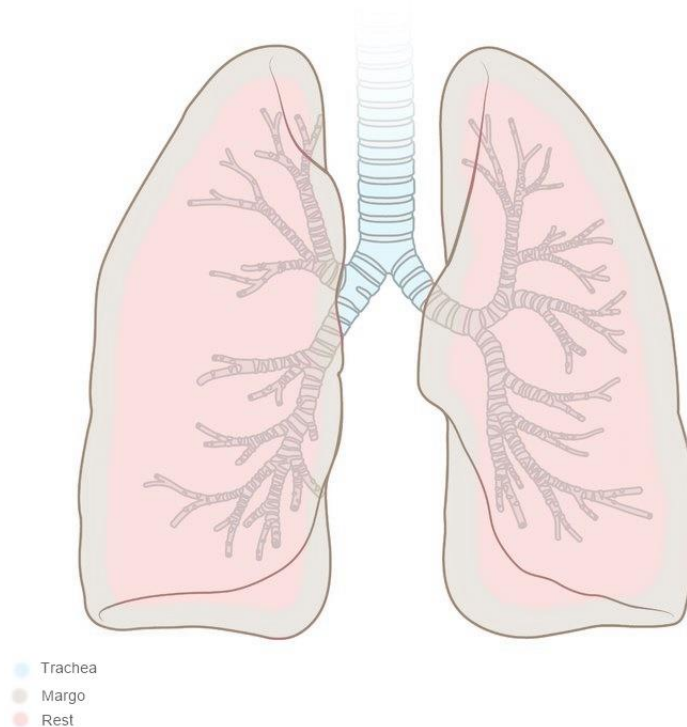


Abbildung 14 Darstellung der Lunge mit Aufteilung in die Abschnitte Trachea (blau), Margo (braun) und Rest (rosa).
Original: https://media-de.amboss.com/media/thumbs/big_5c5c209fbb9d2.jpg, Amboss GmbH (2020) [64] anschließend eigene Bearbeitung.

Hierfür wird unter dem Mikroskop zuerst die Trachea in einer Petrischale bis zur Bifurkation hin frei präpariert. Als nächstes wird der Teil des Lungengewebes präpariert, welcher als „Margo“ bezeichnet wird und im Randbereich des Lungengewebes liegt. In diesem Abschnitt sollen sich bevorzugt die kleinsten Einheiten des Bronchialsystems wiederfinden – die Alveolen. Das übrige Gewebe wird im Folgenden als „Rest“ bezeichnet.

3.2.2 RT-qPCR - Transkriptmengen von Lphn1, 2 und 3 in Lphn3 Knock-In Geweben unterschiedlicher Lokalisationen

Die RT-qPCR ist wie in Kapitel 2.3 bereits erläutert ein Verfahren, um Ribonukleinsäuren, genauer gesagt spezifische DNA-Transkripte, nachweisen und quantifizieren zu können. Diese Ribonukleinsäuresequenz (mRNA) ist somit die transkribierte DNA-Kopie und enthält nur den für die Lphn-Proteine kodierenden DNA-Abschnitt des Gens.

Ergebnisse

In der hier durchgeführten RT-qPCR des Latrophilin 3 Knock-In-Gewebes gilt es herauszufinden, in welchen Abschnitten des präparierten respiratorischen Traktes sich jeweils Latrophilin 1-, Latrophilin 2- und Latrophilin 3-Transkripte befinden und in welchen Verhältnissen diese dort zueinander vorhanden sind.

In den folgenden RT-qPCR Durchführungen werden, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, die aufgearbeiteten RNA-Lösungen bzw. Proben jeweils als Triplet aufgetragen.

Aus diesem Grunde kann aus den hieraus errechneten Mittelwerten eine statistische Signifikanz gewährleistet werden.

Aufgezeigt werden hier exemplarisch drei der Lphn3-Knock-In Tiere (n=3) anhand denen die ribonukleären Transkriptmengen verglichen werden.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, ist das Lphn1-Transkript in allen drei präparierten Abschnitten des respiratorischen Traktes vorhanden:

Sowohl im Abschnitt „Trachea“ als auch im Abschnitt „Margo“ und „Rest“ können Lphn1-Transkriptmengen nachgewiesen werden. Wenn man nun das Vorkommen der Transkriptmenge der jeweiligen Abschnitte in ein Verhältnis zueinander setzt, lässt sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Der t-Test ergibt hier jeweils einen p-Wert > 0,05).

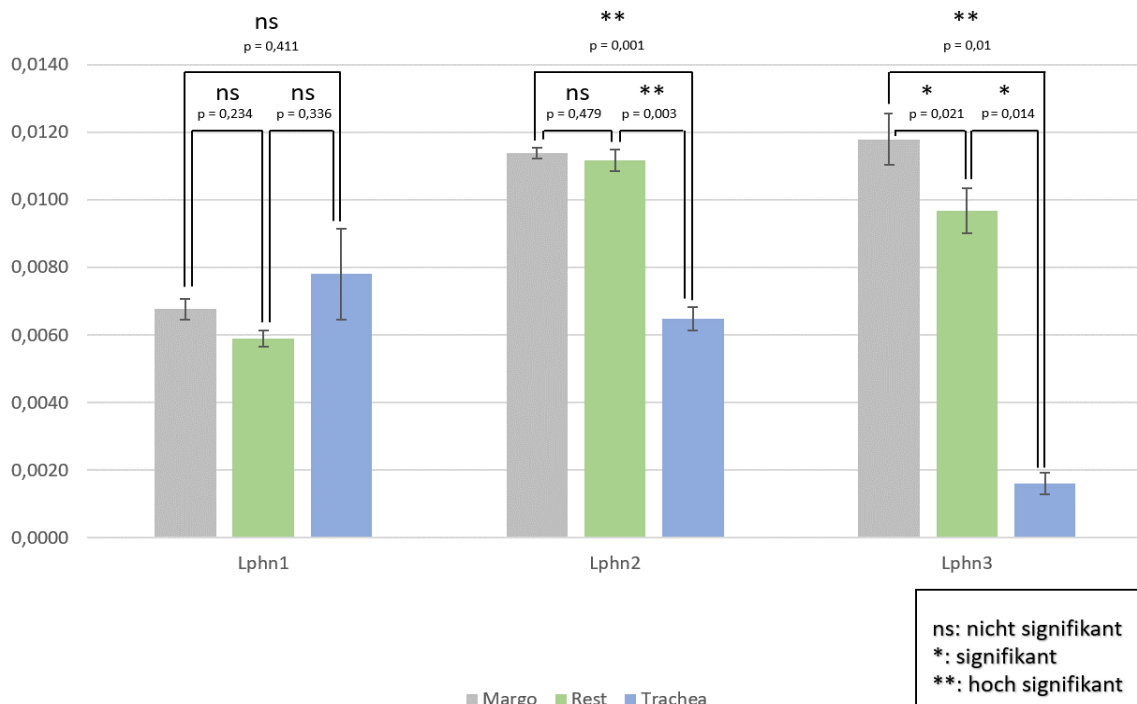


Abbildung 15 RT-qPCR Vergleich der Latrophilin 1, 2 und 3 mit Aufteilung des Gewebes in Margo Trachea und Rest. Statistische Darstellung der Mittelwerte und SEM unter Verwendung des t-Tests (zweiseitig bei gleicher Gruppengröße mit n=3). Statistisch nicht signifikant (ns bei $p > 0,05$), signifikant (* bei $p < 0,05$) und hoch signifikant (** bei $p < 0,01$).

Ergebnisse

Das Lphn2-Transkript kommt in den untersuchten Lphn3 Knock-In-Geweben ebenfalls in allen drei präparierten Abschnitten des respiratorischen Traktes vor. Jedoch lässt sich hier ein Unterschied verzeichnen: Die Lphn2 Transkriptmenge ist im Abschnitt „Trachea“ im Vergleich zu den Abschnitten „Margo“ und „Rest“ jeweils hoch signifikant vermindert. Sowohl im Verhältnis „Margo“ zu „Trachea“ als auch im Verhältnis „Rest“ zu „Trachea“ ergibt der t-Test hier einen p-Wert $< 0,01$.

Allerdings ist der Unterschied der Lphn2 Transkriptmengen der Abschnitte „Rest“ und „Margo“ im Verhältnis nicht signifikant.

Die Lphn3-Transkriptmenge ist im Abschnitt „Trachea“ im Vergleich zur Transkriptmenge des Abschnitts „Margo“ im Lphn3 Knock-In Gewebe hoch signifikant vermindert.

Die Lphn3-Transkriptmenge des Abschnitts „Rest“ ist im Vergleich zum Abschnitt „Margo“ signifikant vermindert. Gleichermäßen verhält sich die Lphn3 Transkriptmenge im dargestellten Vergleich vom Abschnitt „Trachea“ zur Transkriptmenge im Abschnitt „Rest“. Hier ergibt der t-Test jeweils einen p-Wert $< 0,05$.

3.2.3 Proteinanalytik: differenzierte Gewebelokalisationen von Latrophilin 3

Ergänzend zur RT-qPCR, die den Nachweis und die Quantifizierung der Lphn-Transkriptmenge darstellt, wird in dieser Arbeit zur Analyse der darauffolgenden Proteinexpression der sogenannte Western Blot durchgeführt. Es existieren zahlreiche Faktoren, die regulatorische Einwirkungen auf die Proteinexpression haben können.

Damit das Lphn3 Protein exprimiert wird, muss die in der RT-qPCR nachgewiesene Transkriptmenge (mRNA-Sequenz) in eine Aminosäuresequenz des Proteins ‚übersetzt‘ werden. Dieser Prozess wird Translation genannt.

Wie in Kapitel 2.4 erläutert, gliedert sich die Proteinanalyse in:

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben zur Standardisierung dieser, die Auftrennung des Proteingemisches in einem elektrischen Feld nach dessen Molekularmasse, der Proteintransfer (das sog. ‚Blotting‘) auf eine Nitrocellulosemembran und abschließender Immundetektion zur Visualisierung der Lphn3 Proteine mit Hilfe eines spezifischen HA-Antikörpers.

Ergebnisse

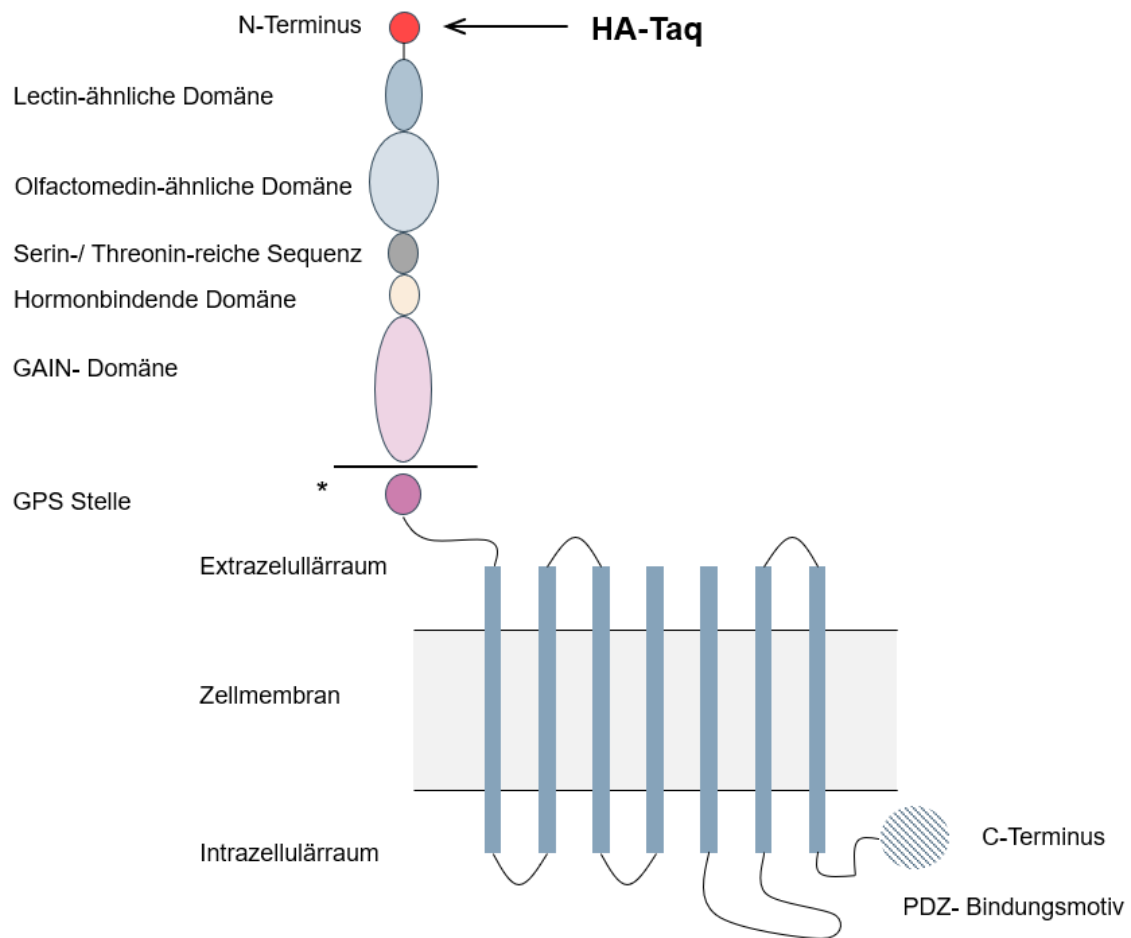


Abbildung 16 modifiziertes Lphn3 Protein mit detektierbarem HA-Tag am N- terminalen Ende. Dargestellt ist hier die autoproteolytische Spaltung des Lphn3 an der GPS-Stelle (*).

Abbildung 16 zeigt das modifizierte Lphn3 Protein zusammen mit der hier eingefügten HA-Modifikation am N-Terminus mit einem erwarteten Molekulargewicht von insgesamt ca. 177 kDa. Aufgrund der autoproteolytischen Spaltung des Proteins an der GPS-Stelle beträgt der extrazelluläre Anteil, der durch den HA-Antikörper detektiert werden kann, ca. 102 kDa. Infolgedessen würden wir im Western Blot eine charakteristische Bande in diesem Bereich erwarten. Der somit verbleibende nicht detektierbare membranständige Anteil des Lphn3 Proteins beträgt dementsprechend ca. 75 kDa.

Das Gewebe wird für die Western Blots analog zur RT-qPCR, in die Abschnitte „Margo“, „Trachea“ und „Rest“ eingeteilt, um eine genauere Aussage über die Lokalisation der Proteinexpression treffen zu können.

Ergebnisse

Zunächst ist wie in Abbildung 17 zu sehen, der Western Blot eines direkten Vergleiches zwischen den Gewebeabschnitten „Margo“, „Rest“ und „Trachea“ eines Lphn3 Knock-In-Tiers und eines nicht genetisch veränderten, sprich nicht mit dem HA-Epitop markierten Tier (Wildtyp-Tier) aufgezeigt, um eine mögliche charakteristische Bande für Lphn3 validieren zu können.

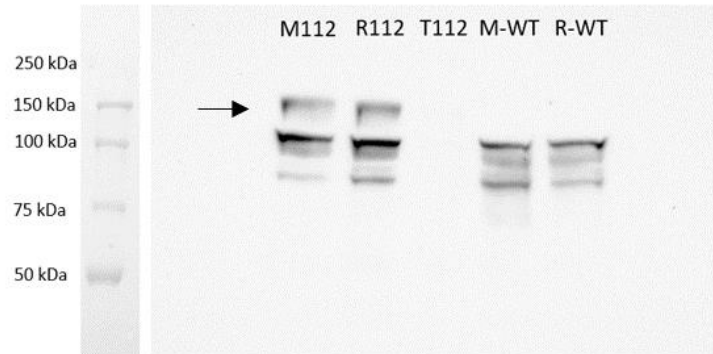


Abbildung 17 Western Blot mit primärem HA-Antikörper in 1:8000 Verdünnung. Dargestellt sind hier ein Wildtyp- (WT) und Lphn3 Knock-In Tier (#112) aufgeteilt in Margo (M), Trachea (T) und Rest (R). Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande.

Hierbei wird deutlich, dass bei dem Lphn3 Knock-In Tier im Gewebeabschnitt „Margo“ und „Rest“ eine Bande im Bereich von 120-140 kDa erkennen, die bei dem Wildtyp-Tier fehlt. Dementsprechend handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um eine Lphn3-Proteinspezifische Bande. Die Auftrennung scheint hier nicht ideal zu sein, da das erwartete Molekulargewicht des zu detektierenden extrazellulären Lphn3-Anteils bei ca. 102 kDa liegen soll. Oftmals kommt es jedoch v.a. bei großen extrazellulären Anteilen zu posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen. Diese haben zwar keinen wesentlichen Einfluss auf das Molekulargewicht des Proteins an sich, jedoch können sie das Laufverhalten dieser verändern. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass der extrazelluläre Anteil des Lphn3-Proteins im hier durchgeführten Western Blot eine höhere Molekularmasse zu haben scheint.

Bei den weiteren niedermolekularen Banden in den beiden Wildtyp und Knock-In Proben, handelt es sich vermutlich um unspezifische Antikörper Kreuzreaktionen, die in dem hier durchgeführten Western Blot keine weitere Auflösung zulassen.

Des Weiteren wird in dieser Abbildung deutlich, dass im Gewebeabschnitt „Trachea“ des Lphn3 Knock-In keine solche Bande zu erkennen ist. Dementsprechend lässt dieses vermuten, dass Lphn3 in diesem Abschnitt nicht exprimiert wird.

Ergebnisse

Diese Vermutung wird auch durch die weiteren durchgeführten Western Blots bestätigt (Abbildung 18, Abbildung 19). Hier sind die Proben der einzelnen Abschnitte als Triplet aufgetragen (#1-3) um eine statistische Signifikanz zu gewährleisten. Somit können Pipettierfehler als Fehlerquelle weitgehend ausgeschlossen und fehlerhafte Rückschlüsse vermieden werden. In den hier durchgeführten Western Blots, unter Verwendung des HA-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 (Abbildung 18), weist Lphn3 die erwartete charakteristische Bande entsprechend dem Molekulargewicht im extrazellulären Anteil bei 120-140 kDa auf.

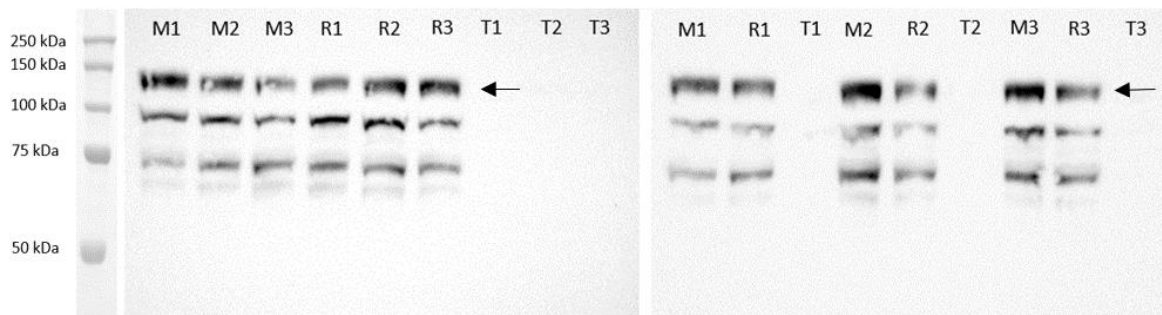


Abbildung 18 Western Blot mit primären HA-Antikörper in **1:2000** Verdünnung. Dargestellt sind hier Lphn3 Knock-In Tiere #41 (1) #42 (2) und #43 (3) je aufgeteilt in Trachea (T) Margo (M) und Rest (R). Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande.

Ebenso verhält es sich im Western Blot mit einer HA-Antikörper-Verdünnung 1:8000. Als Ladekontrolle hierzu dient der Tubulin-Antikörper, mit einer sichtbaren Bande bei seinem errechneten Molekulargewicht von 55kDa (Abbildung 19).

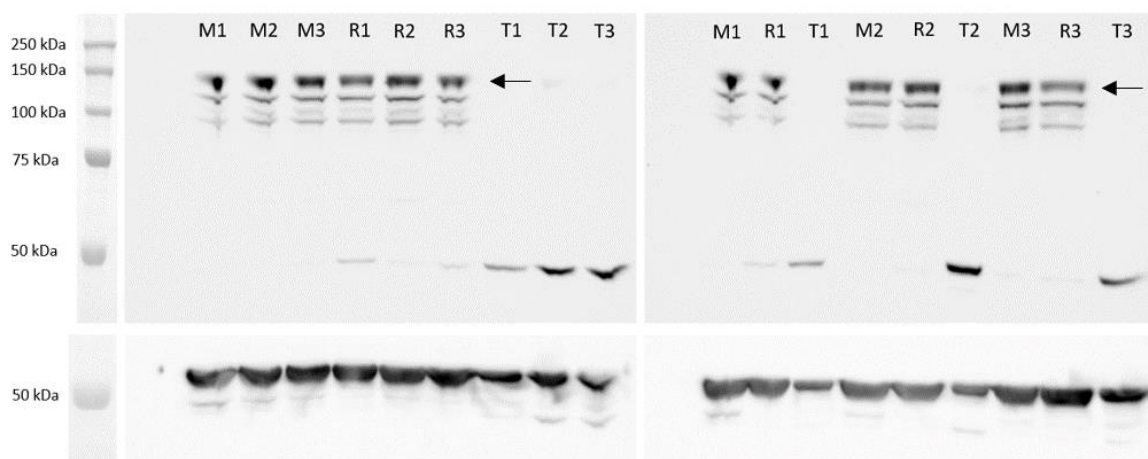


Abbildung 19 Western Blot mit primärem HA-Antikörper in **1:8000** Verdünnung. Dargestellt sind hier Lphn3 Knock-In Tiere #41 (1) #42 (2) und #43 (3) je aufgeteilt in Trachea (T) Margo (M) und Rest (R) mit zusätzlichem Tubulin Antikörper als Referenz-/ Ladekontrolle. Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande.

Ergebnisse

Durch die Auftrennung des Gewebes in die einzelnen Abschnitte wird deutlich, dass die Lphn3 -Proteine in den Abschnitten „Margo“ und „Rest“ exprimiert werden (übereinstimmend zu den nachgewiesenen Lphn3 RNA-Transkriptmengen), jedoch nicht im Abschnitt „Trachea“, da hier die spezifische Lphn3-Proteinbande nicht zu erkennen ist.

3.2.4 Histologische Untersuchungen und Nachweise von Lphn3

Histologische Untersuchungen von Gewebe stellen ein bisher unverzichtbares Werkzeug in der naturwissenschaftlichen Forschung dar und werden demzufolge auch in dieser Arbeit für die Untersuchungen bzgl. der Latrophilin 3 Lokalisation eingesetzt.

HE-Färbung

Exemplarisch ist in Abbildung 20 der mikroskopische Aufbau der Lunge anhand eines Kryoschnittes mit anschließender HE-Färbung aufgezeigt.

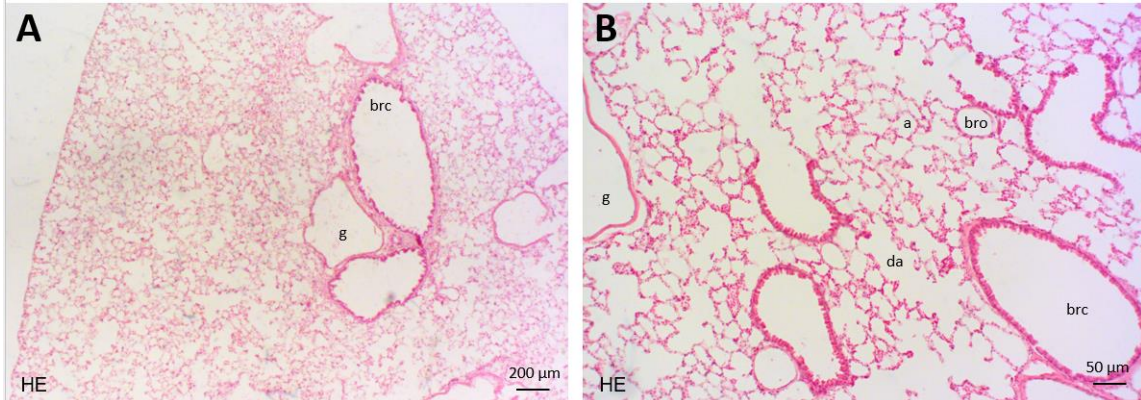


Abbildung 20 HE-Färbung des Lungengewebes eines Lphn 3 Knock-In Tieres. (A): in Übersichtsvergrößerung. (B): in 10-facher Vergrößerung. Abk.: g: Gefäß, brc: Bronchus, bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) dient, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, zum histologischen Nachweis der Lphn3-Proteine im vorliegenden Gewebe und der Bestimmung ihrer genauen Lokalisation.

Ergebnisse

Bei der IHC kann es durch verschiedene Einflussfaktoren zu einer verminderten Antikörper-Antigen-Reaktion kommen. Diese gilt es hier zu optimieren, um eine möglichst aussagekräftige Immunreaktion zu erreichen.

Etablierung der Immunhistochemie

Um den Immunhistochemischen Nachweis der Lphn3-Proteine zu optimieren, werden im Folgendem die Aspekte der thermischen Epitop Demaskierung zur verbesserten Antikörper-Antigenbindung und die Reduzierung der Hintergrundsignale genauer betrachtet.

Reduzierung der Hintergrundsignale:

Um zu starke Hintergrundsignale durch das VECTASTAIN® ABC-Kit zu reduzieren, fand hier das VECTOR® Avidin-/Biotin Blocking Kit Anwendung.

Mit diesem können unspezifische Avidin-/Biotin-Bindungen blockiert werden. Dieser dritte Blockierungsschritt erfolgt nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen. Nach erfolgtem Waschschrift in 1x PBS werden die Schnitte für 15 Minuten mit der Avidin-Blocking Solution in der feuchten Kammer inkubiert.

Es folgt erneut ein kurzer Waschschrift in 1x PBS und die Inkubation mit der Biotin-Blocking Solution, ebenfalls für 15 Minuten. Anschließend kann wie gewohnt die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht in der feuchten Kammer erfolgen.

Thermische Demaskierung (HIER- ,heat induced epitope retrieval')

Die thermische Demaskierung ist ein Verfahren zur Verbesserung der verlorengegangenen Immunreaktivität bzw. Antigenität von Gewebe durch dessen Fixierung. Durch die Hitzebehandlung wird die Strukturveränderung der Antigene, die durch die Fixierung entsteht, wieder aufgehoben, sodass die entsprechenden Epitope freigelegt, die Antigene besser präsentiert werden und die Antikörper verstärkt binden können. Dadurch kann das Signal der IHC verstärkt werden.

Für die Demaskierung werden die Kryoschnitte auf dem Objektträger für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend werden die Schnitte in einer Küvette, gefüllt mit 10 mM Citratpuffer der pH-Stufe 6 inkubiert und in der Mikrowelle behandelt (siehe unten).

Ergebnisse

Die Küvette wird hierfür mit dem dazugehörigen Deckel in eine Glasschale gestellt, die mit ca. 700 ml Leitungswasser befüllt wird und in die Mikrowelle gestellt.

Nun werden die Schnitte in der Mikrowelle bei maximaler Leistung aufgeköcht und 5 Minuten in dieser belassen. Falls nötig werden die Küvetten mit destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass ein Austrocknen der Objektträger verhindert wird.

Nach dem Kochen werden die Schnitte mindestens 15-30 Minuten bei Raumtemperatur und geöffnetem Deckel heruntergekühlt, danach kann mit der Immunmarkierung, bzw. Immunhistochemie begonnen werden.

Zusätzlich zu der Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit dem Citratpuffer, der auf den pH-Wert 6 eingestellt ist, wird ein Vergleich der immunhistochemischen Reaktion in Bezug auf die primäre Antikörperkonzentration durchgeführt. Dafür wird der HA-Antikörper zunächst im Verhältnis 1:100 eingesetzt.

Wie in Kapitel 2.5.2 erläutert, bringt das Chromogen Vector® NovaRED™ rote Präzipitate als Reaktionsprodukt der Immunreaktion hervor. Hier ist ein deutlicher Unterschied der Immunreaktion im Vergleich von unbehandelten Kryogewebeschnitten zu den mit Citratpuffer-vorbehandelten Kryogewebeschnitten zu erkennen (Abbildung 21).

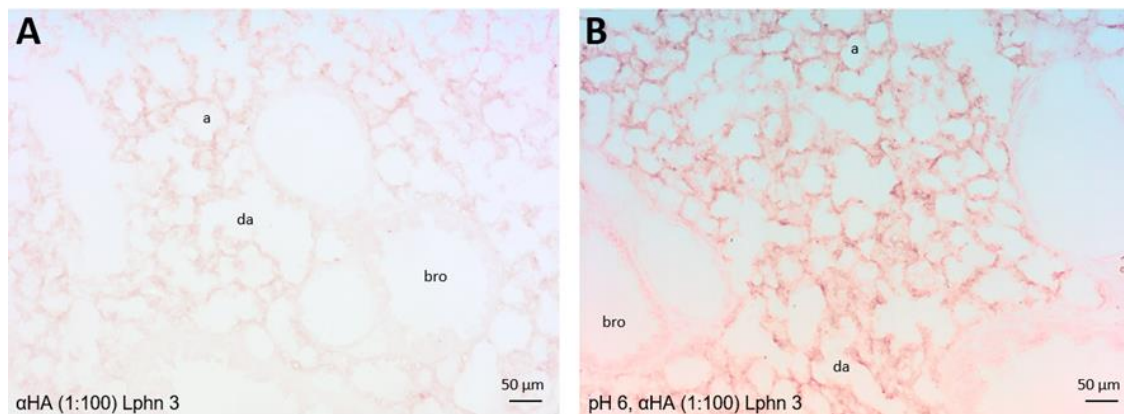


Abbildung 21 Vergleich - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere mit der HA-Antikörper Verdünnung in 1:100 jeweils in 10-facher Vergrößerung: (A): Immunhistochemie ohne Demaskierung links, (B): Demaskierung mit Citratpuffer der pH Stufe 6 rechts. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares

Ergebnisse

Bei Einsatz des HA-Antikörpers im Verhältnis 1:1000 (Abbildung 22) ist eine vergleichbar gute Immunreaktion der demaskierten Gewebeschnitte zu erkennen. Aus diesem Grund wird bei den folgenden Immunhistochemischen Reaktionen der HA-Antikörper in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. [Vergleich Abbildung 21 (B) und Abbildung 22 (B)]

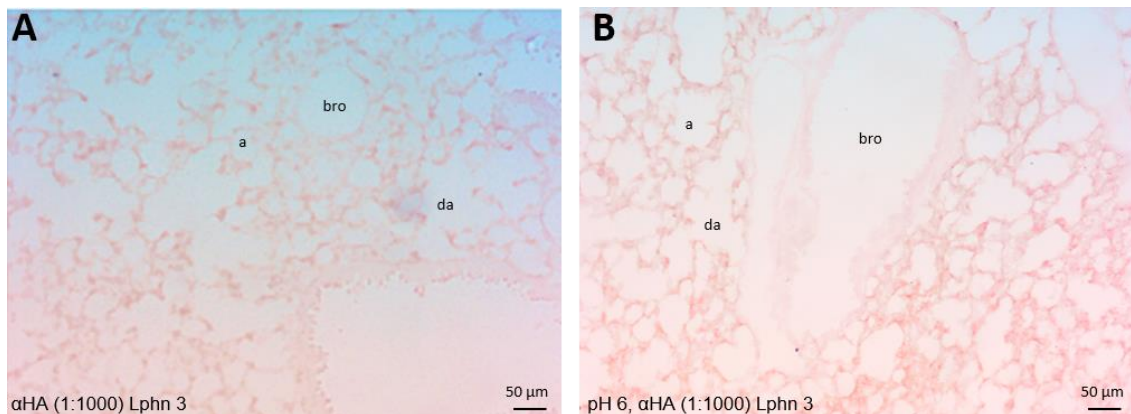


Abbildung 22 Vergleich - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere mit der HA-Antikörper Verdünnung 1:1000 jeweils in 10-facher Vergrößerung: (A): Immunhistochemie ohne Demaskierung links, (B): Demaskierung mit Citratpuffer der pH Stufe 6 rechts. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares

Hier wird der Citratpuffer standardmäßig mit einem pH-Wert von 6 verwendet. Im Verlauf stellt sich jedoch zusätzlich die Frage, wie sich die Antigen-Antikörper Immunreaktion im Hinblick auf eine Demaskierung der Epitope mit unterschiedlichen pH-Stufen des Citratpuffers verhält.

Hierfür wird eine Immunhistochemie mit den pH-Stufen von 3, 6 und 9 des Citratpuffers im Vergleich durchgeführt. Es zeigt sich eine sehr gute immunhistochemische Färbung bei einer Citratpuffer Vorbehandlung mit einem pH-Wert von 9, eine zufriedenstellende Reaktion mit einem pH-Wert von 6 und eine ebenfalls gute Immunreaktion bei einer Citratpuffer Vorbehandlung mit einem pH-Wertes von 3 (Abbildung 23).

Ergebnisse

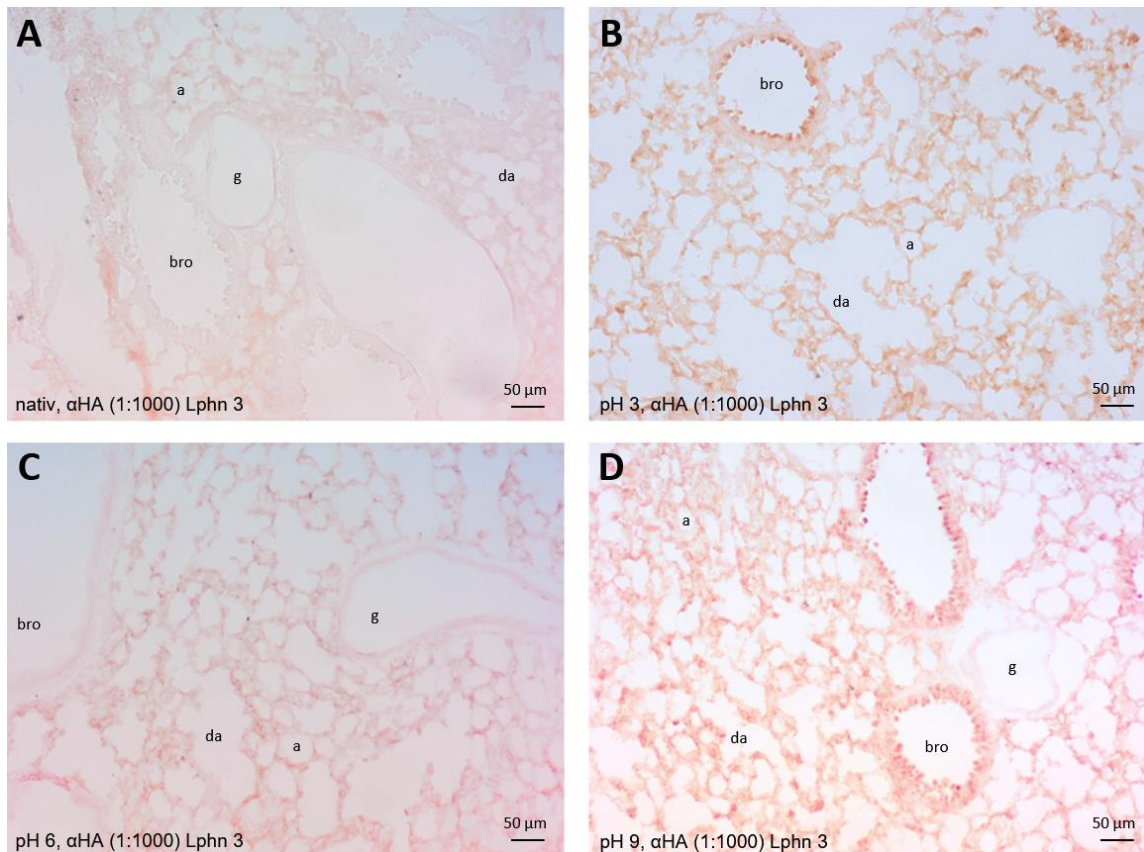


Abbildung 23 Etablierung - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere jeweils in 10-facher Vergrößerung. Natives Gewebe vs. Vorbehandlung des Gewebes mit unterschiedlichen pH Stufen des Citratpuffers zur Demaskierung: (A): unbehandelt, (B): Vorbehandlung des Gewebes mit Citratpuffer der pH Stufe 3, (C): Vorbehandlung mit Citratpuffer der pH Stufe 6, (D): Vorbehandlung mit Citratpuffer der pH Stufe 9. Abk.: g: Gefäß, bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares.

Ergebnisse der Immunhistochemie

Thorax-Paket: Anhand der Zusammenschau der durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen mit Hilfe einer optimierten Vorbehandlung zeigen sich verstärkt Immunsignale für Lphn3 im Bereich der Bronchioli, als auch im Bereich der Alveolen.

Dies lässt vermuten, dass Lphn3 dort lokalisiert sein könnte. Die IHC bestätigt somit die in der RT-qPCR nachgewiesene Transkriptmenge in diesen Bereichen.

Hier ist exemplarisch eine Immunhistochemische Reaktion in verschiedenen Vergrößerungen anhand eines Gewebes mit pH 6 Citratpuffer Vorbehandlung und einer 1:100 Antikörper Verdünnung dargestellt (Abbildung 24).

Ergebnisse

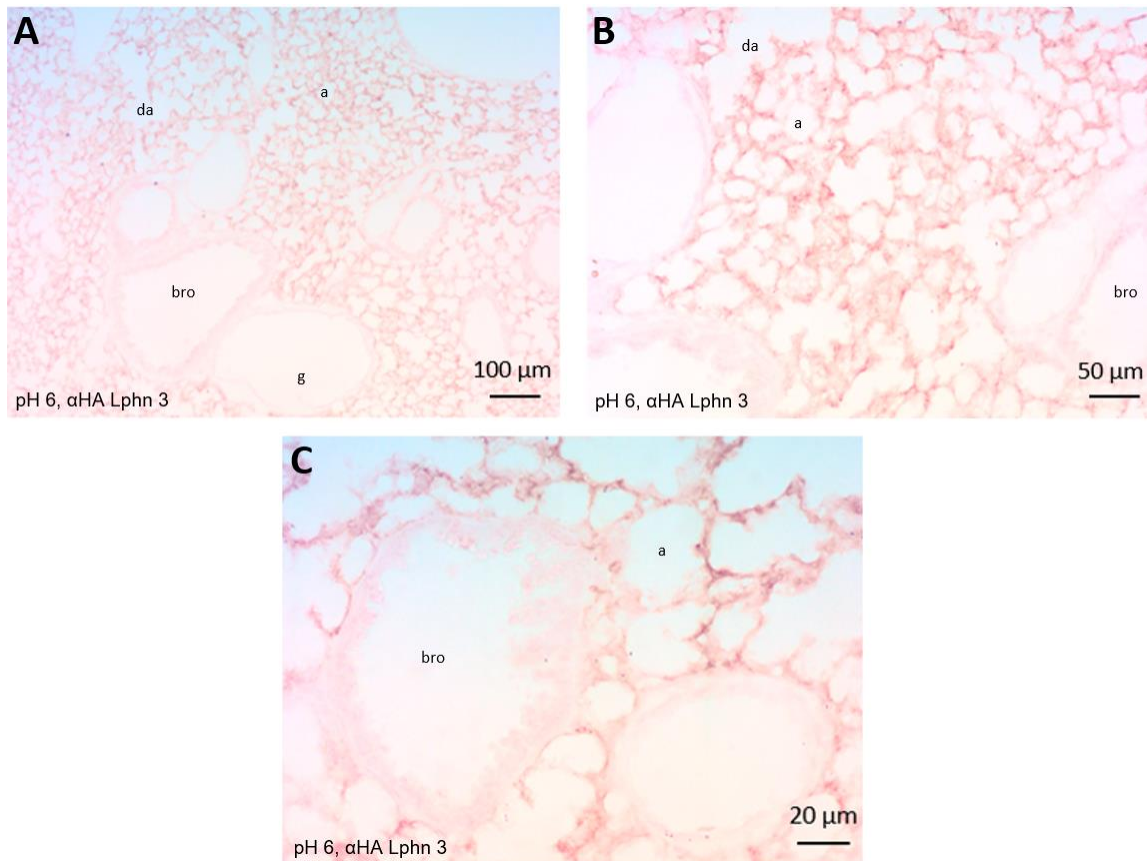


Abbildung 24 Immunhistochemische Reaktion (Vector® NovaRED™ -Chromogen Färbung) und Gewebepreparation mit Citratpuffer der pH Stufe 6 und einer HA-Antikörperverdünnung im Verhältnis 1:100 bei einem Lphn3 Knock-In Tier: (A) in 5-facher Vergrößerung, (B) in 10-facher Vergrößerung, (C) in 20-facher Vergrößerung. Abk.: g: Gefäß, bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares

Immunfluoreszenz

Ergänzend zur Immunhistochemie wird hier die Immunfluoreszenz durchgeführt, welche möglicherweise eine (sub-) zelluläre Darstellung der Lphn3 Proteine im Gewebe erlaubt, so dass die Lokalisation der Lphn3 Proteine auf eine andere Art verifizieren werden könnte.

Etablierung der Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz kann es wie bei der Immunhistochemie zu ähnlichen Störphänomenen kommen, deswegen gilt es auch hier verschiedene Bedingungen zu optimieren.

Ergebnisse

Thermische Demaskierung (HIER- ‚heat induced epitope retrieval‘)

Da es bei der Immunhistochemie zu deutlich besseren Immunreaktionen durch die HIER kam wird analog zur bereits durchgeführten IHC von Beginn an das Gewebe bei der IF ebenfalls vorbehandelt und die Epitope mit Hilfe der Citronensäure des pH-Wertes von 3 thermisch demaskiert.

Reduzierung der Autofluoreszenz des Gewebes

Da es bei der Durchführung der Immunfluoreszenz häufig zur Problematik der unerwünschten Gewebeeigenfluoreszenz kommen kann, gilt es hier diese möglichst zu minimieren, um die spezifischen Fluoreszenzsignale des zu untersuchenden Lphn3 Proteins genauer beurteilen zu können.

Hierzu wird das VECTOR® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching-KIT (VECTOR LABORATORIES) verwendet, welches der Inhibierung der Autofluoreszenz des Gewebes dient, die unter anderem durch die zugrunde liegende Aldehydfixierung bedingt sein kann. Somit wird versucht eine bedeutende Verbesserung des Signal/-Rausch-Verhältnisses zu schaffen. Somit kann im optimalen Fall die Erfassung bzw. die Lokalisation des Zielantigens (hier: Lphn Protein) exakter bestimmt werden (Abbildung 25).

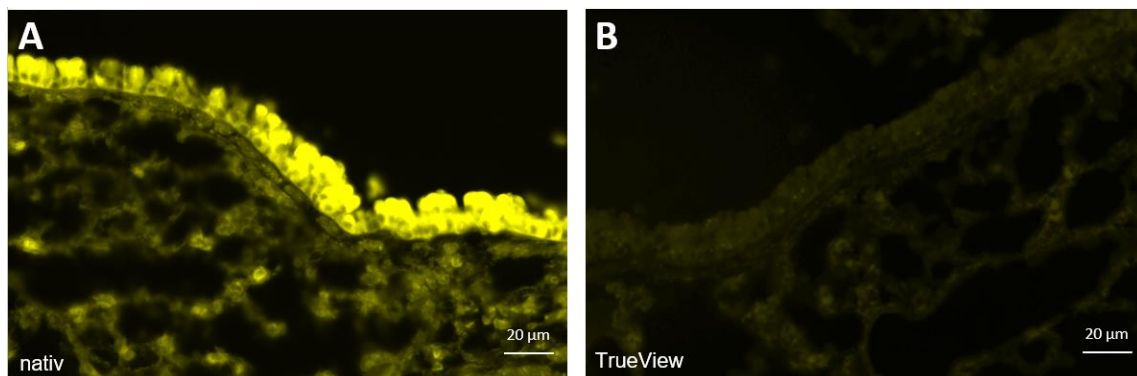


Abbildung 25: Vergleich der Immunfluoreszenz: (A): Immunfluoreszenz ohne VECTOR® TrueView Blockierung mit deutlicher Autofluoreszenz, (B) Immunfluoreszenz mit vorheriger VECTOR® TrueView Blockierung

Ergebnisse

Ergebnisse der Immunfluoreszenz

Nachdem deutlichere Ergebnisse durch die Verwendung des VECTOR® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching-KIT (VECTOR LABORATORIES) zu verzeichnen waren, wurde dieser Blockierungsschritt in den darauffolgenden Immunfluoreszenzen etabliert.

α HA-Cy3

Zunächst wurde der primäre HA-Antikörper (Cell Signaling Technology) bei den Lphn2 und Lphn3 Knock-In Tieren gleichermaßen verwendet, um zu schauen, ob die hier sichtbaren Immunfluoreszenzsignale spezifisch für die mit dem HA-Epitop modifizierten Lphn3 Knock-In Tiere sind. Die Lphn2 Knock-In Tiere gelten hier als Negativkontrolle, da diese die HA-Modifikation nicht besitzen und somit der HA-Antikörper nicht gebunden werden kann.

Bei der Verwendung des primären HA-Antikörpers und des sekundären Antikörpers Cy3 (donkey-anti-rabbit, Merck Millipore), jeweils in 1:1000 Verdünnung, ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf eine spezifische Signalgebung mit der Anwendung des Antikörpers.

Es zeigen sich hier diverse unspezifische Immunfluoreszenzsignale, v. a. in Zellkernnähe (Abbildung 26). Anhand dieser Immunfluoreszenz kann keine Aussage in Bezug auf die Lokalisation des Lphn3 getroffen werden.

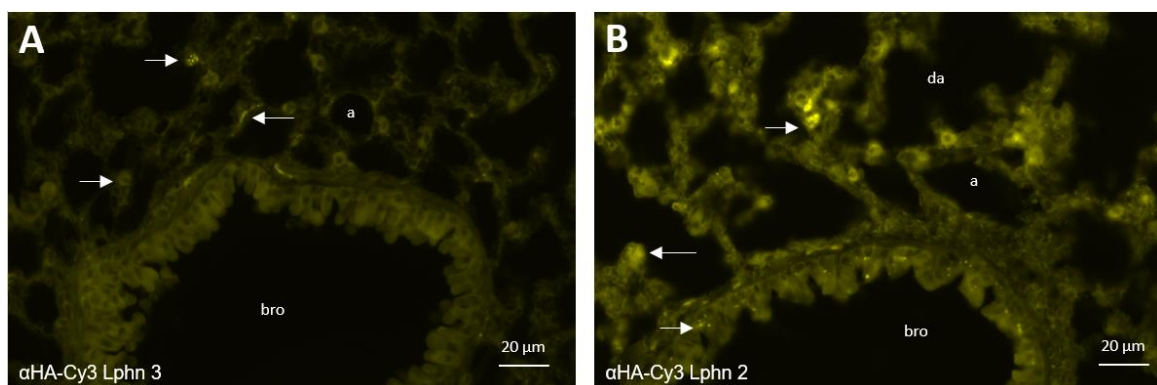


Abbildung 26 Immunfluoreszenz mit α HA-Cy3 (jeweils in der Verdünnung 1:1000) im Vergleich: (A): Lphn3 Knock-In Tier, (B): Lphn2 Knock-In Tier. Die Pfeile deuten auf unspezifische Signale der Immunfluoreszenz. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares

Ergebnisse

NanoTag® α GFP

Nach der Immunmarkierung des Gewebes mit Hilfe des Nanobodys NanoTag® α GFP (NanoTag Biotechnologies GmbH) ist in der Fluoreszenzmikroskopie (mit einer standardisierten Belichtungszeit von jeweils 800 ms) des Lphn2 Knock-In-Tieres eine deutliche Immunreaktion im Bereich der Basalmembran der Bronchien/ Bronchioli zu erkennen (Abbildung 27).

Das Gewebe des Kontrolltieres, des Lphn3 Knock-In Tieres, weist an dieser Stelle keine Immunreaktion auf. Dies lässt somit auf ein spezifisches Immunfluoreszenzsignal des NanoTag® α GFP gegen das endogene ‚mVenus‘ und somit auf das Lphn2 Protein schließen.

Es zeigt sich bei dieser Immunfluoreszenz allerdings auch eine Lphn2-positive Immunfluoreszenzsignallinie im Bereich der Basalmembran der Bronchien/ Bronchioli bei der Antikörper-negativ Kontrolle des Lphn2 Knock-In Gewebes, in dem NanoTag® α GFP nicht aufgetragen wurde.

Möglicherweise ist dies durch die hohe Expression des endogenen ‚mVenus‘-Proteins und infolgedessen der unverstärkten Eigenfluoreszenz des ‚mVenus‘ zu erklären.

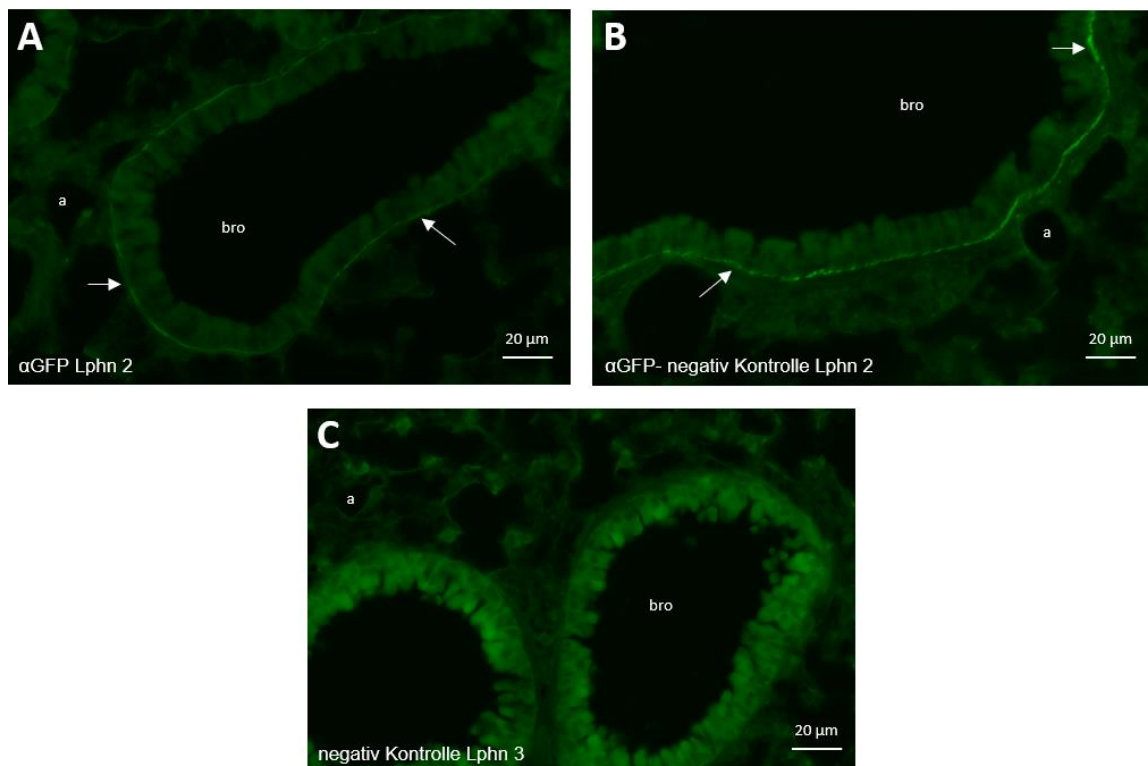


Abbildung 27: Immunfluoreszenz mit NanoTag α GFP im Vergleich: (A): Lphn2 Knock-In Tier, (B): Lphn2 Knock-In Tier als AK-negativ Kontrolle, (C): Lphn3 Knock-In Tier als ges. negativ-Kontroll-Tier. Die Pfeile zeigen auf die verstärkte Immunreaktion. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole.

Ergebnisse

SMA (Abk.: smooth muscle actin)

Da die glatte Muskulatur bei der Pathogenese des Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle spielt und in der Literatur eine Ausprägung der Lphns in dieser vermutet wird, ist im Folgenden eine kombinierte IF zur Detektion der Lphns und glatten Muskulatur aufgezeigt. Durch die Verwendung des fluoreszierenden Antikörpers SM- α Aktin, der sich spezifisch gegen das Zytoskelettprotein Aktin der glatten Muskulatur richtet, wird die Lokalisation dieser in den Lungenschnitten der Tiere deutlich (Abbildung 28). Hier wird die zirkulär verlaufende glatte Muskulatur in den Bronchioli durch ein gelbes fluoreszierendes Signal deutlich.

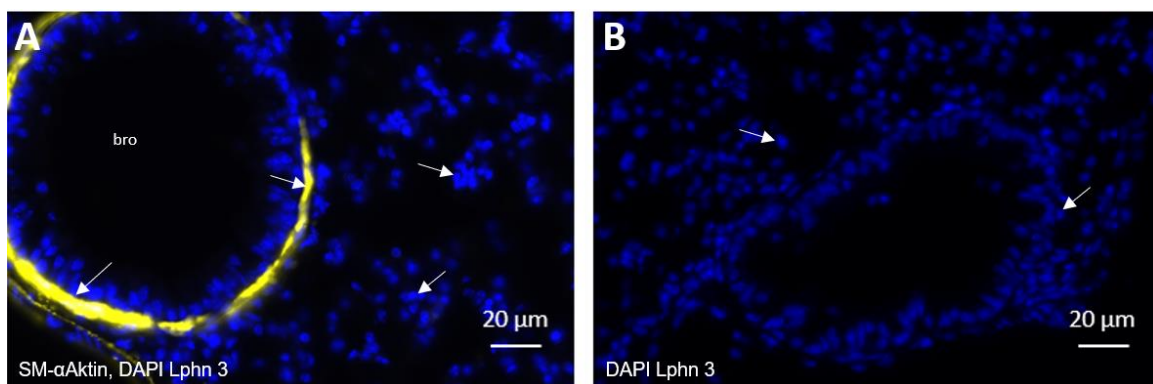


Abbildung 28 Immunfluoreszenz eines Lphn3 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin mit kombinierter DAPI-Färbung, (B): SM- α Aktin negativ-Kontrolle bei durchgeführter DAPI-Färbung. Abk.: bro: Bronchiolus.

In Abbildung 29 ist in einem Lphn2 Knock-In Gewebeschnitt sowohl deutlich ein gelbliches ringförmiges Fluoreszenzsignal, entsprechend der glatten Muskulatur durch das SM α Aktin im Bereich der Bronchioli (Mitte) und Gefäßwände (links und rechts oben), als auch die vorher schon beschriebene grüne Fluoreszenzsignallinie des Lphn2 durch das endogene ‚mVenus‘ im Bereich der lumenwärts liegenden Basalmembran zu erkennen.

Ergebnisse

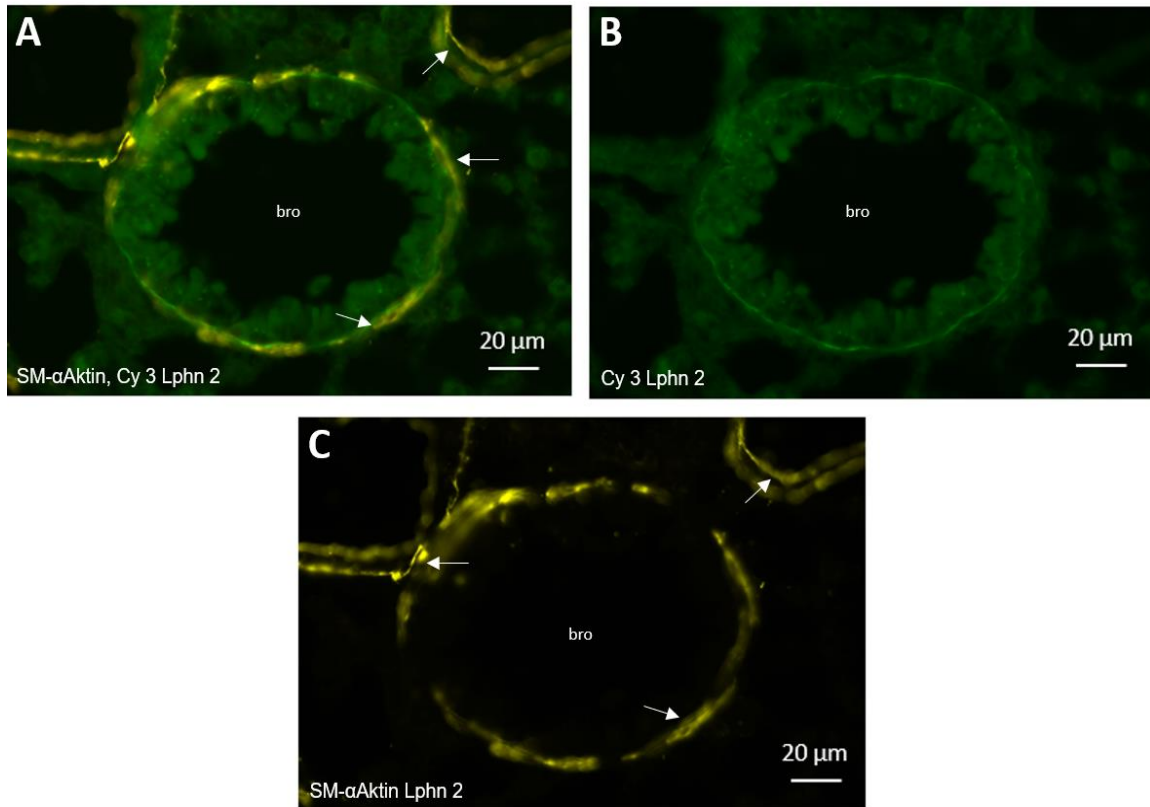


Abbildung 29 Immunfluoreszenz eines Lphn2 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin und des Cy3-Farbstoffes, (B): Fluoreszenzsignale des Cy3-Farbstoffes, (C): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin. Abk.: bro: Bronchiolus,

In Abbildung 30 ist ebenfalls ein sehr deutliches gelbliches ringförmiges Fluoreszenzsignal der glatten Muskulatur im Bereich der Bronchioli der Lphn3 Knock-In Tiere durch das SM α Aktin zu erkennen. Dieses erscheint hier auch ein bisschen stärker ausgeprägt zu sein, welches für eine verstärkte Ausprägung der glatten Muskulatur in diesen Bereichen der Lphn3 Knock-In Tiere sprechen könnte.

Ergebnisse

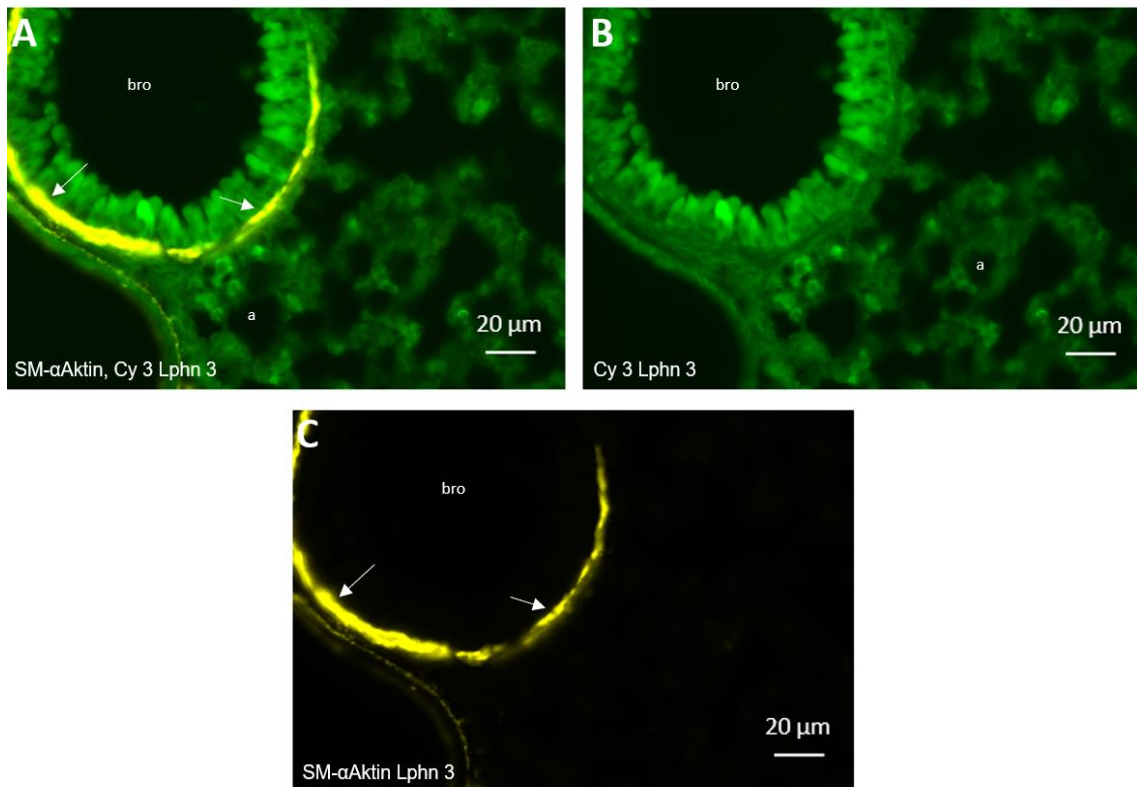


Abbildung 30 Immunfluoreszenz eines Lphn3 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin und des Cy3-Farbstoffes, (B): Fluoreszenzsignale des Cy3-Farbstoffes, (C): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole.

In der Zusammenschau der Immunfluoreszenzen der verschiedenen Lungengewebschnitte unter Berücksichtigung der hier verwendeten Antikörper, lässt sich die glatte Muskulatur im Bereich der Bronchioli eindeutig darstellen. Latrophilin 2 kann hier im Bereich der Basalmembran vermutet werden, jedoch gelingt es anhand der hier durchgeführten Immunfluoreszenz nicht, eine eindeutige Aussage über die Lokalisation des Latrophilin 3 treffen zu können.

3.3 Latrophilin 3 Knock-Out

Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit ist der Versuch, Aussagen darüber treffen zu können, welchen Einfluss bzw. möglichen Auswirkungen das Ausschalten des für Lphn3 kodierenden Genabschnitts auf die potenziell regulatorische Expression von Lphn1 und Lphn2 haben kann. Hierfür werden die Tiere genetisch modifiziert und der Lphn3 kodierende Genabschnitt Cre-vermittelt ausgeschaltet (Lphn3 Knock-Out).

Die Tiere wurden von Dr. Maxeiner zur Verfügung gestellt und wie bereits auf Seite 58 erläutert, miteinander verpaart.

Die Lphn3 Knock-Out Tiere müssen nun vorerst als solche identifiziert werden, wobei der Fokus zunächst auf der Etablierung geeigneter PCR Bedingungen lag.

3.3.1 Identifizierung der Lphn3 Knock-Out-Tiere

Mit Hilfe der PCR und der Oligonukleotid-Primerkombination aus MX14656 und MX15659 werden die Lphn3 Knock-Out-Tiere identifiziert. Um beurteilen zu können, ob es sich hierbei um ein homozygotes oder heterozygotes Tier in Bezug auf das ausgeschaltete Lphn3-Allel handelt, werden für jede Probe sowohl die Knock-Out-PCR als auch die Wildtyp-PCR durchgeführt. Anhand der hier als sicher identifizierte Knock-Out und Wildtyp-Tiere erfolgt die Probenauswahl für die weiteren Versuche.

Etablierung der Lphn3 Knock-Out-PCR

Das Verfahren der Knock-Out-PCR kann durch verschiedene Einflussvariablen und Komponenten beeinflusst werden. Da noch kein etabliertes Verfahren hierzu vorliegt, gilt es die Einflussvariablen in dieser Arbeit zu identifizieren und zu optimieren.

Methodik:

Eine dieser veränderbaren Einflussvariablen der PCR stellt die Methodik an sich dar. Die optimale Reaktionstemperatur ist hierbei von besonderer Bedeutung.

Wie in Kapitel 2.2.2 erläutert, gliedert sich der Ablauf der PCR in drei sich zyklisch wiederholenden temperaturabhängigen Reaktionsschritten

Hier ist ein besonderes Augenmerk auf den zweiten Reaktionsschritt der PCR – die Primer-Anlagerung – zu legen. Dieser ist von der Reaktionsweise der hier verwendeten Oligonukleotid-Primer abhängig.

Ergebnisse

Um in diesem Reaktionsschritt nun die optimale Temperaturbedingung für die Amplifizierung der DNA-Sequenzen etablieren zu können, wird ein Temperaturgradient programmiert.

Der Gradient wurde wie folgt eingestellt (in °C): 56/ 56,7/ 57,9/ 59,8/ 62,1/ 64/ 65,3/ 66. Nachdem repräsentativ die Gleiche DNA-Probe unter den veränderten Reaktionsbedingungen amplifiziert wurde, zeigte sich, das beste Bandensignal in der darauffolgenden Agarose-Gelelektrophorese bei den Temperaturen von 57,9°C und 59,8°C (Abbildung 31).

Hieraus ergibt sich die Erkenntnis, dass die optimale Reaktionstemperatur für die Primer-Anlagerung der hier verwendeten Oligonukleotid-Primer unter 60°C liegt. Daher wurde im Folgenden ein Kompromiss bei 59°C gewählt. Diese Temperatur findet somit in den darauffolgenden Reaktionen Anwendung und wird in das Programm etabliert.

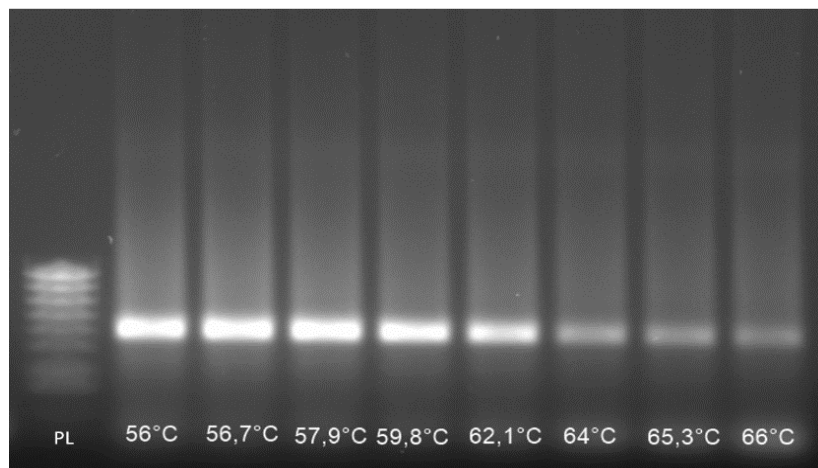


Abbildung 31 Etablierung der PCR-Methodik anhand eines Temperaturgradienten in der Lphn3 Knock-Out PCR (Oligonukleotid-Primerkombination aus MX14656 und Mx14659) mit einfach konzentrierter Taq-Polymerase (PL: Probenleiter)

Ergebnisse

Material:

Das optimale Bandensignal der Agarose-Gelelektrophorese, in Bezug auf die Intensität, ist neben der optimalen Methodik auch von dem Material, genauer gesagt von den verwendeten Reagenzien und dessen Konzentrationen abhängig.

Um diese für die Reaktion optimieren zu können, wurden hierfür bei optimaler Methodik - einer Primer-Annealing Temperatur von 59°C - unterschiedliche Konzentrationen der Taq-Polymerase #2 (einfach, 2-fach und 4-fach) im Vergleich zu der einfach konzentrierten Taq-Polymerase (#1) aufgetragen (Abbildung 32).

Der Unterschied zwischen diesen beiden Taq-Polymerasen besteht lediglich in einer etwas unterschiedlichen Aufreinigung dieser. Es handelt sich nicht um eine kommerzielle Polymerase, sondern um eine in *E. coli* Kulturen zur Ausprägung gebrachten DNA-Polymerase, deren Qualität je nach Herstellungszeitpunkt variieren kann.

Es zeigt sich hier, dass die 4-fache Konzentration der Taq-Polymerase #2 das beste Bandensignal liefert. Sie wird somit für die weiteren Durchführungen der PCR eingesetzt.

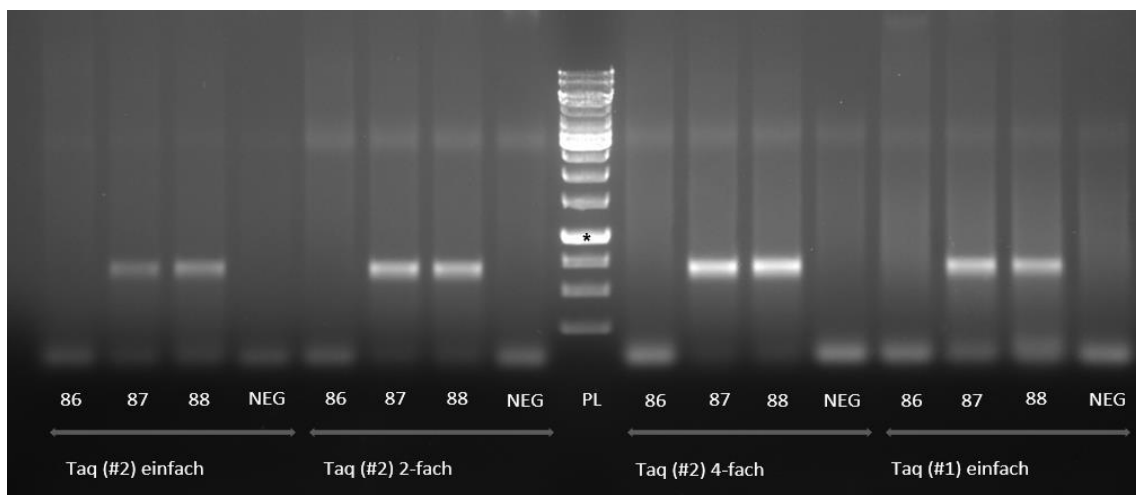


Abbildung 32 Etablierung der PCR anhand des Materials bzw. der Reagenzien (Taq-Polymerase): Konzentrationsunterschiede in der Lphn3 Knock-Out PCR - Cre-Rekombinase Gen Nachweis- (CZ805/CZ806 Primer) durch 4-fache Auftragung einer Wildtyp-DNA Probe (86) und zwei KO-DNA Proben (87/88) im Vergleich zu einer negativ Kontrolle (keine DNA), je mit der Taq-Polymerase#2 in ein-, 2- und 4-facher Konzentration und der Taq-Polymerase (#1) in einfacher Konzentration. (PL: 100 bp Probenleiter mit *500 bp)

Ein weiterer möglicher veränderbarer Reaktionsansatz zur Optimierung des Bandensignals stellt die Verwendung der „DreamTaq-PCR“-Reagenzien (Thermo Scientific) dar. Dies ist ein kommerzielles PCR-Reaktionsansatz-KIT, in dem für einen einfachen Reaktionsansatz die Komponenten, wie in Tabelle 19 beschrieben, hinzugefügt werden. Der DreamTaq-Buffer enthält bereits $MgCl_2$, Betaine, DMSO und BSA.

Ergebnisse

| Reagenz | Konzentration | Menge (µl) |
|---------------------------------|---------------|------------|
| DreamTaq Buffer | 10x | 2,5 |
| dNTPs | 25 mM | 0,2 |
| Oligonukleotid-Startermolekül 1 | 100 µM | 0,2 |
| Oligonukleotid-Startermolekül 2 | 100 µM | 0,2 |
| DreamTaq-DNA-Polymerase | N/A | 0,2 |

Tabelle 19 Einfacher Reaktionsansatz der DreamTaq-PCR

Durch die Verwendung der DreamTaq PCR-Reagenzien können zuvor unklare Bandensignale in der Knock-Out-PCR als auch in der Wildtyp-PCR durch intensivere bzw. eindeutiger Bandensignale bestätigt werden. Abbildung 33 zeigt exemplarisch den Vergleich einer zuvor unklaren Wildtyp-PCR der Tiere #292-301 zur deutlicheren Wildtyp-PCR unter Verwendung des DreamTaq-Reagenzien-KITs. Somit kann den Mäusen #292-300 eindeutig ein Wildtyp-Allel zugeordnet werden.

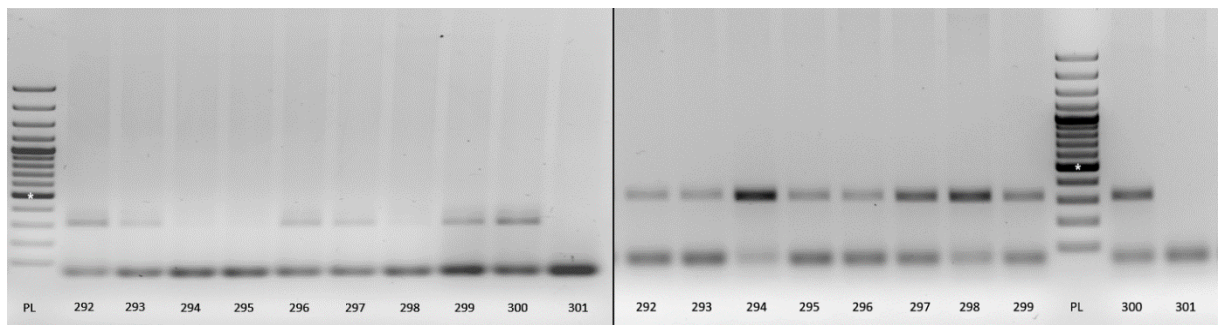


Abbildung 33 Wildtyp PCR der Mäuse #292-301 (Primer MX14656 und MX15658) mit Taq Polymerase #2 4-fache Konzentration (links), Wildtyp PCR der Tiere #292-301 (Primer Mx14656 und MX15658) mit DreamTaq-Polymerase (rechts) in Negativdarstellung. (PL:100 bp Probenleiter mit *500 bp)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kommerziellen DreamTaq PCR-Reagenzien für diese PCR geeigneter erscheinen.

Ergebnisse der Genotypisierung

Für eine geeignete Probenauswahl für die in der Arbeit folgenden Versuche, wird hier die Genotypisierung mit Hilfe der Wildtyp- in Verbindung mit der Knock-Out-PCR exemplarisch anhand der Tiere #292-309 aufgezeigt. (Abbildung 34 und Abbildung 35).

Ergebnisse der Wildtyp PCR

Für die Tiere #292-300, 304, 306 und 309 lässt sich ein eindeutiges Bandensignal für das Wildtyp-Allel erkennen (.Abbildung 34).

Ergebnisse

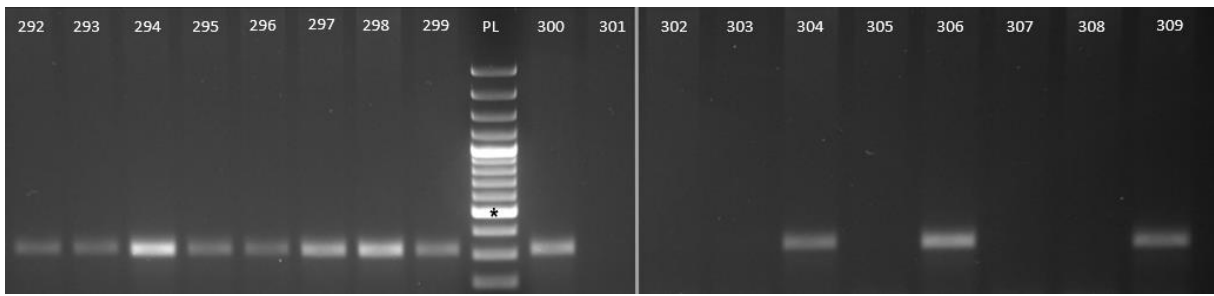


Abbildung 34 Wildtyp PCR (Oligonukleotid-Primer Kombination MX14656 und MX14658) der Tiere #300-309 mit sichtbarer Wildtyp-Bande im Bereich von 318 kDa, aufgetragen neben einem 100 Basenpaarleiter (PL: Probenleiter mit * 500 bp) – Referenzbanden.

Ergebnisse der Knock-Out-PCR

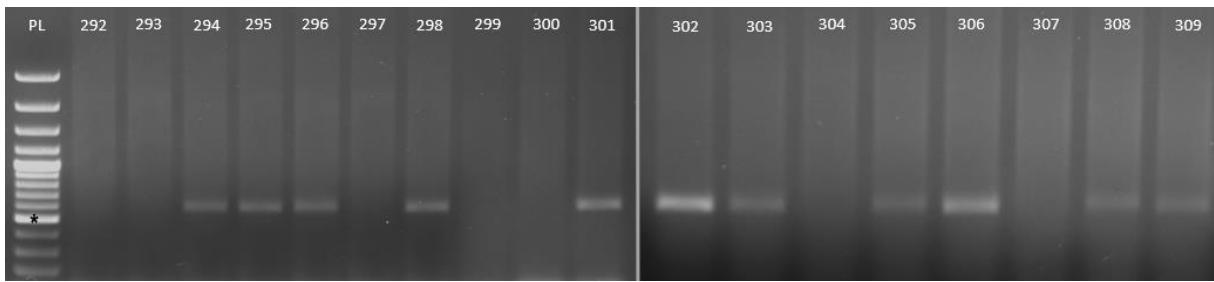


Abbildung 35 Knock-Out-PCR (Oligonukleotid-Primer Kombination MX14656 und MX14659) der Tiere #292-309 mit sichtbarer Lphn3 Knock-Out-Bande im Bereich von 601 kDa, aufgetragen neben einem 100 Basenpaarleiter (PL: 100 bp Probenleiter mit * 500 bp) - Referenzbanden.

Erkennen lässt sich hier für die Tiere #294-296, 298, 301-303, 305, 306, 308 und 309 ein Bandensignal für das KnockOut-Allel.

In der Zusammenschau der beiden hier durchgeführten PCR Verfahren (Wildtyp- und Knock-Out-PCR) und ergänzender Verifizierung unklarer Bandensignale mit Hilfe der DreamTaq-PCR, ergeben sich für die hier exemplarisch dargestellte Genotypisierung der Tiere #292-309 folgende Allel-kombinationen:

- ➔ Homozygoter Wildtyp der Tiere #292, 293, 297, 299, 300 und 304
- ➔ Homozygoter Knock-Out der Tiere #301-303, 305 und 308
- ➔ Heterozygoter Genotyp (Wildtyp/ Knock-Out) der Tiere #294-296, 298, 306 und 309.

Der Genotyp des Tieres #307 ist anhand der hier durchgeführten PCR-Verfahren unklar und fällt somit nicht in die Probenauswahl.

3.3.2 RT-qPCR – Lphn1, 2 und 3 Transkriptmengen: Vergleich zwischen Lphn3 Knock-Out- und Wildtyp-Tieren

In Abbildung 36 werden die Transkriptmengen der einzelnen Latrophiline (Lphn1, Lphn2 und Lphn3) in Lphn3 Knock-Out-Tieren mit der Transkriptmenge dieser in Lphn3 Wildtyp-Tieren verglichen.

Die Auftragung der RNA-Proben ist hier nicht als Triplet, sondern 4-fach erfolgt.

Analysiert werden hier vier Lphn3 Knock-Out-Tiere (n=4), die mittels der etablierten Lphn3 Knock-Out-PCR, wie auf den Seiten 79-82 beschrieben, definitiv als Lphn3 Knock-Out-Tiere identifiziert werden konnten. Im Vergleich dazu sind die Lphn-Transkriptmengen aus vier Lphn3 Wildtyp-Tieren aufgetragen (n=4).

In dieser RT-qPCR ist zu erkennen, dass es bei den Lphn3 Knock-Out-Tieren zu keiner signifikanten Veränderung der Lphn1 und auch Lphn2 Transkriptmengen im Vergleich zu den Transkriptmengen derselben Latrophiline in den Wildtyp-Tieren kommt. Der t-Test ergibt hier jeweils einen p-Wert > 0,05. Somit ist bei den Lphn3 Knock-Out-Tieren kein signifikanter Anstieg der Lphn1- und Lphn2-Transkriptmengen im Sinne einer in Frage kommenden kompensatorischen Hochregulierung dieser zu verzeichnen.

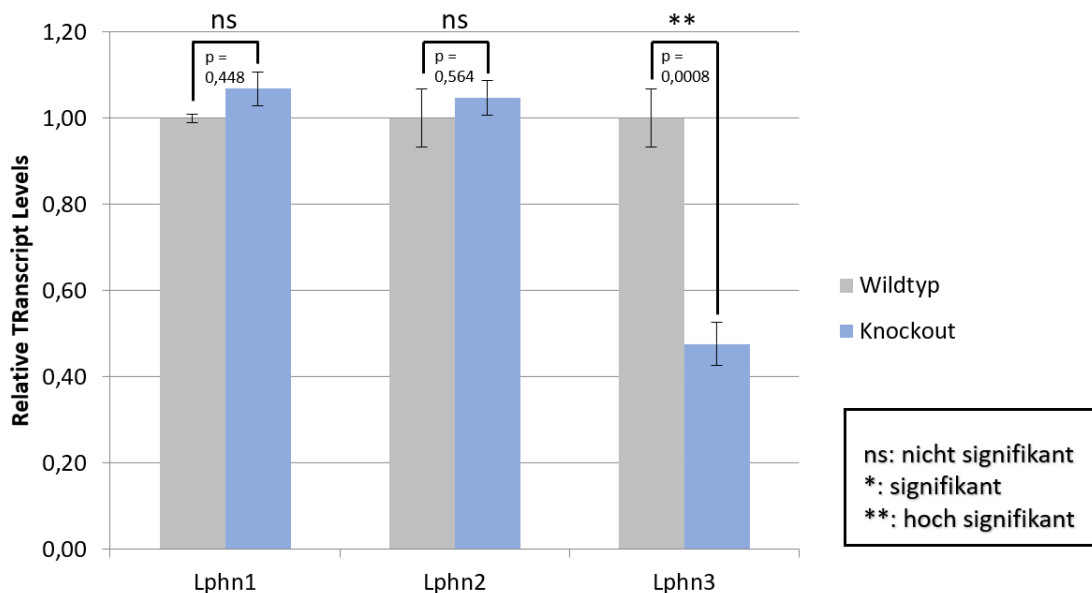


Abbildung 36 RT-qPCR Vergleich der Transkriptmengen des Lphn1, Lphn2 und Lphn3 in Lphn3- Knock-Out Tieren im Vergleich zu Lphn3 Wildtyp-Tieren. Statistische Darstellung der Mittelwerte und SEM unter Verwendung des t-Tests (zweiseitig bei gleicher Gruppengröße mit n=4). Statistisch nicht signifikant (ns bei $p > 0,05$), signifikant (* bei $p < 0,05$) und hoch signifikant (** bei $p < 0,01$).

Ergebnisse

In Bezug auf die Lphn3-Transkriptmenge lässt sich jedoch eine Transkriptmengenreduktion auf knapp 50% bei den Lphn3 Knock-Out-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren verzeichnen. Somit ist die Latrophilin 3 Transkriptmenge in den Knock-Out Tieren hoch signifikant vermindert. Der t-Test ergibt hier einen p-Wert $< 0,01$.

Da in den Lphn3 Knock-Out Tieren jedoch Lphn3-Transkriptmengen vorhanden sind, lässt sich nicht ausschließen, dass Lphn3 Proteine noch durch andere Spleißvarianten oder Gensequenzen kodiert werden könnten, die final jedoch nicht exprimiert werden.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisbewertung in Bezug auf die aktuelle Forschung

Die Labormaus (*Mus musculus*), die bereits seit dem 17. Jahrhundert als Versuchstier verwendet wird, stellt ein häufig verwendetes und wichtiges Versuchstier in der biomedizinischen Forschung dar und trägt maßgeblich zum Verständnis vieler biomolekularer Mechanismen bei [58]. *M. musculus* ist dementsprechend auch ein wichtiges Tiermodell, welches häufig für die Untersuchung der Lungenphysiologie und Pathophysiologie verwendet wird und bereits zu vielen Fortschritten in der biomedizinischen Forschung beigetragen hat [38].

Jedoch sollten signifikante Unterschiede, neben dem beträchtlichen Größen- und Formunterschied, in der anatomischen Organisation, Gewebsverteilung und Zellzusammensetzung berücksichtigt werden.

Während die anatomischen Strukturen der humanen Lunge bereits in Kapitel 1.3.1 und 1.3.2 ausführlich beschrieben sind, werden hier kurz die wichtigsten Unterschiede zu der murinen Lunge aufgezeigt [38].

Die murine Lunge besteht aus einem großen linken und vier kleineren rechten Lungenlappen. Die rechten Lungenlappen werden als oberer, mittlerer, unterer oder assessorischer (postkavaler) Lungenlappen bezeichnet [58].

Bei der Maus werden zudem keine weiteren Einteilungen der Lungeneinheiten vorgenommen, sodass auch die knorpeligen Anteile der Atemwege mit den Lappenbronchien enden. Außerdem ist die Verzweigung des murinen Bronchialbaums asymmetrischer und geringer ausgeprägt, als die des Menschen und umfasst nur 13-17 Verzweigungen. Hier verläuft entlang des Lappens eine zentrale Bronchiole, die sich in mehrere, laterale Bronchiolen bis hin zu den terminalen Bronchiolen aufzweigt, die dann an der bronchoalveolären Verbindung rasch in die am Gasaustausch teilnehmenden Alveolargänge übergehen. Die luftleitenden Atemwege sind bei der Maus vornehmlich mit Flimmerepithel und Keulenzellen ausgekleidet, wobei Basal- und schleimproduzierende Zellen fehlen bzw. nur selten anzutreffen sind [38].

Für die Pathophysiologie des Asthma bronchiale sind vor allem die im Folgenden genannten Aspekte maßgeblich von Bedeutung:

Die murinen Atemwege weisen einen deutlich geringeren Anteil an glattem Muskelgewebe auf [19].

Diskussion

Des Weiteren unterscheidet sich die bronchiale Reaktionsfähigkeit sowie auch die Entzündungsmechanismen und -mediatoren, die den Tonus der glatten Atemwegsmuskelzellen regulieren, bedeutend von denen des Menschen [19].

Zusätzlich gibt es zwischen Maus und Mensch teilweise deutliche Expressionsunterschiede mancher aGPCRs zu verzeichnen [17]. Dieses sollte im Allgemeinen zusammen mit den oben erwähnten Unterschieden in der Lungenarchitektur, mit besonderem Augenmerk auf den glatten Muskelgewebsanteil, berücksichtigt werden.

Im Vergleich dazu haben Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) in Bezug auf die Reaktion der glatten Muskelzellen und die autonomen Reflexe eine bedeutendere Nähe zum Menschen [19]. *C. porcellus* wird bereits seit ca. 200 Jahren in der biomedizinischen Forschung, u.a. in Bereichen der Anaphylaxie, Infektiologie und immunologischen Forschung, als Versuchstier eingesetzt und konnte in den dazu durchgeführten Studien maßgeblich zum Verständnis einiger molekularer Mechanismen beitragen [46].

So konnte *C. porcellus* auch bereits in der Asthma Forschung erhebliche Beiträge leisten [46], weshalb es nicht verwunderlich ist, dass bereits Meerschweinchen Asthmodelle etabliert wurden [19].

Jedoch ging der Anteil an Meerschweinchen Tierversuchsmodellen in letzter Zeit stark zurück [46], da bei Meerschweinchen nicht zu vernachlässigende Einschränkungen in der Forschung vorhanden sind [37]. So sind zum einen die biologischen Techniken bei Meerschweinchen weniger entwickelt und zum anderen können bei Mäusen und Ratten bereits erfolgreich zahlreiche genetische Modifikationen durchgeführt werden, welche bei Meerschweinchen noch nicht in solch einem hochentwickeltem Maße etabliert werden konnten [37], [46].

So werden bei *M. musculus* häufig Genommodifikationen durch zielgerichtete Genmutationen, -deletionen oder -insertionen durch das Einfügen von Transgenen mittels homologer Rekombination erzielt [58].

So ist auch in dieser Arbeit das Genom von *M. musculus* durch Cre- vermittelte homologe Rekombination zum Lphn Knock-In oder Knock-Out modifiziert worden (analog zu [1], [41]). Diese genetische Modifikation dient in dieser Arbeit vorrangig dazu, ein besseres Verständnis über Latrophiline, ihre Expression und Lokalisation im Lungengewebe erlangen zu können.

Dementsprechend ist hier der Lphn3 kodierenden Exonsequenz ein HA-Tag angehängt worden, der somit transkribiert und translatiert wird und dessen Expression am N-Terminus durch einen HA-Antikörper sichtbar gemacht und überwacht werden kann [41].

Diskussion

In dem für das Lphn2-Protein kodierenden Genabschnitt ist die kodierende Sequenz eines Markerproteins namens ‚mVenus‘, das sich vom endogenem GFP ableitet, eingefügt worden, dessen Ausprägung sich durch die Verwendung eines GFP-Antikörpers am C-Terminus darstellen lässt [1], [41] (Abbildung 37).

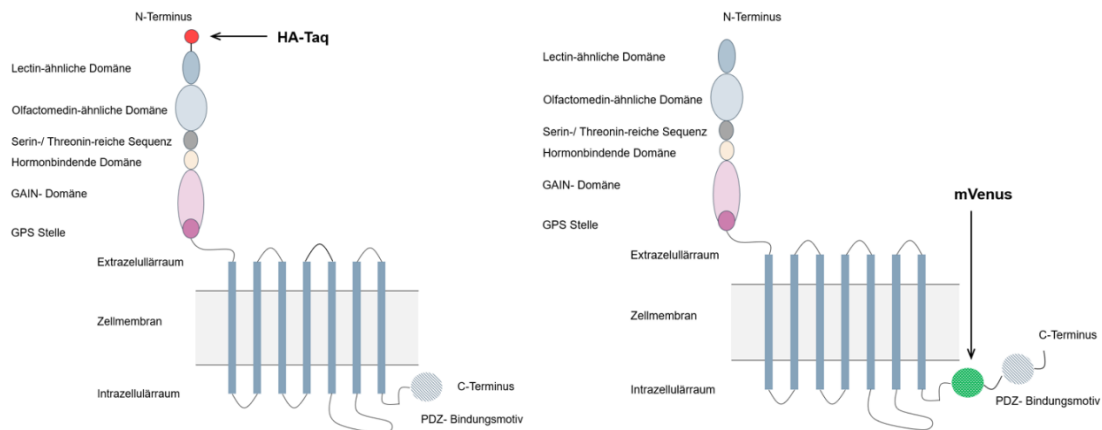


Abbildung 37 modifiziertes Lphn 3 Protein (links) mit detektierbarem Ha-Tag und modifiziertes Lphn 2 Protein (rechts) mit detektierbarem endogenem ‚mVenus‘, frei nach [1], [41].

Lphn3 Knock-Out Tiere erhielten einen doppelten HA-Tag mit eingefügten FRT und LoxP Stellen, die Cre- und Flp-vermittelt die Deletion des Lphn3 kodierenden Genabschnitts generieren. So kann die Abwesenheit des Lphn3 Proteins gezielt durch die Verwendung spezifischer Antikörper überwacht werden.

4.1.1 Expression und Lokalisation der Latrophiline in der Lunge

Latrophiline gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, genauer gesagt zu den Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [34], [36]. In zahlreichen Vorarbeiten sind bereits viele physiologische Funktionen und Auswirkungen von dysregulierten und pathophysiologischen Zuständen verschiedener GPCR beschrieben worden, die somit einen wichtigen pharmakologischen Angriffspunkte zur Regulierung und Modifizierung zellulärer Mechanismen darstellen [14].

Diskussion

Auf Grund der Entdeckungsgeschichte der Latrophiline über α -Latrotoxin und dessen Wirkung auf das periphere Nervensystem über Neurotransmitter-Freisetzungen in den verschiedensten Arten von Synapsen, sind diese bisher vorwiegend neurozentrisch erforscht worden [34].

Sie sind jedoch auch bereits in ihren verschiedenen Isoformen durch ihren mRNA- oder Proteingehalt in mehreren Geweben nachgewiesen worden. So konnten diese u.a. auch in der Lunge detektiert werden und mit besonderem Augenmerk auf Lphn3, ebenfalls mit pulmonalen Erkrankungen, wie Asthma bronchiale in Verbindung gebracht werden [11], [31].

Dieser potenzielle Zusammenhang wird unter anderem durch eine erhöhte Expression von Lphn3 (und Lphn1) in den glatten Muskelzellen der Atemwege bei Patienten mit Asthma bronchiale im Vergleich zu gesunden Patienten beschrieben. Außerdem wird eine erhöhte Bindungsrate der glatten Muskelzellen zum Latrophilin Liganden FLRT3 beschrieben, dessen Interaktion mit einer Verstärkung der Adhäsion und Proliferation, sowie einer verstärkten Kontraktion assoziiert ist, wie sie beim Asthma bronchiale typisch ist [11], [31]. Des Weiteren wird diese erhöhte Expression mit einer verstärkten Interaktion und Adhäsion von Entzündungszellen bzw. Entzündungsmediatoren assoziiert, wie sie bei einer Atemwegsentzündung vorkommen [11].

Die klinisch bewiesene Wirksamkeit eines rekombinanten humanen Lphn3-Antikörpers durch dessen positive Wirkung in Bezug auf die Regulation von Adhäsion, Proliferation und Kontraktion der glatten Atemwegsmuskelzellen, sowie die Einflussnahme auf die Expression von Entzündungsmediatoren bestärkt den vermuteten Zusammenhang [31].

Um ein genaueres Verständnis über Latrophiline, dessen Expression und Lokalisation in der Lunge und somit ihrer möglichen Korrelation zur Pathophysiologie des Asthma bronchiale erhalten zu können, ist in dieser Arbeit, mit Fokus auf Lphn3, der mRNA- und Proteinnachweis in der Lunge gelungen und konnte durch die Präparation der Lunge in verschiedene Abschnitte (siehe Kapitel 3.2.1) genauer differenziert werden. So werden hier in einem Lphn3 Knock-In Tier die Transkriptmengen der verschiedenen Latrophilin-Isoformen in verschiedenen Abschnitten nachgewiesen und im Vergleich zueinander dargestellt. Die Lphn1 Transkriptmenge war in den hier präparierten Abschnitten gleichermaßen nachgewiesen worden, wobei die Lphn2 Transkriptmenge im Abschnitt „Trachea“ hoch signifikant zu den Abschnitten „Margo“ und „Rest“ vermindert war.

Die Lphn3 Transkriptmenge war im Abschnitt „Trachea“ ebenfalls signifikant vermindert. Diese Ergebnisse decken sich mit bisherigen Ergebnissen aus anderen Arbeiten zur Transkription in der Lunge, wurden jedoch differenzierter betrachtet.

Diskussion

Sie bestätigen den mRNA-Nachweis der Latrophiline in der Lunge [17] und zeigen zusätzlich erstmalig einen mRNA-Nachweis in der Trachea.

Des Weiteren gelang der Proteinnachweis im Western Blot für Lphn3 in den Abschnitten „Margo“ und „Rest“, jedoch nicht in der Trachea. Der fehlende Lphn3 Proteinnachweis könnte ergänzend zu der Arbeit von *Faiz et al.* (2017) die Vermutung unterstützen, dass der endogene Lphn3-Ligand FLRT3 die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskelzellen in der Trachea über einen indirekten Acetylcholin-Neurotransmitterfreisetzungsmechanismus fördert und nur direkt auf die Atemwegsmuskelzellen in der Lunge wirkt.

In dieser Arbeit gelang es ebenso, einen immunhistochemischen Nachweis des Lphn3 Proteins in der Lunge, durch eine vorherige Etablierung mittels Reduzierung der Hintergrundsignale, Hitze-induziertes Epitop Retrieval (HIER) und optimierter Antikörperkonzentration, aufzuzeigen. Hier zeigten sich immunhistochemische Präzipitate im Bereich der Bronchien, Bronchioli und Alveolen. Dies steht im Einklang zu den hier detektierten Transkriptmengen im Abschnitt „Margo“, der vornehmlich Alveolargewebe enthalten soll, und dem Abschnitt „Rest“, in dem Anteile des respiratorischen und konduktiven Trakts vorhanden sein sollen. Diese Ergebnisse wären vereinbar, mit der bisher von *Faiz et al.* vermuteten Lokalisation der Lphn3 Proteine in den glatten Muskelzellen der Atemwege. Der Versuch Lphn3 in der Immunfluoreszenz nachzuweisen, und die Lokalisation mit den glatten Muskelzellen in Verbindung zu bringen, gelang hier jedoch nicht. Es zeigten sich für Lphn3 lediglich unspezifische Signale, die einen ausschließlichen Nachweis in der glatten Muskulatur der Atemwege nicht möglich machten.

Für Lphn2 sind hier jedoch spezifische Signale im Bereich der Basalmembran detektiert worden, dessen Funktion in der zukünftigen Forschung einer weiteren Aufschlüsselung bedarf.

Im Hinblick auf den potenziellen Zusammenhang zwischen Latrophilin 3 und pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung Asthma bronchiale, können zukünftige Forschungen in Bezug auf die Ausschaltung des Proteins von Bedeutung sein.

Hierfür sind genetisch modifizierte Lphn3 Knock-Out Tiere generiert worden, die zunächst zweifelsfrei anhand einer hierfür etablierten PCR identifiziert werden müssen.

Dies wird in dieser Arbeit durch optimierte Reaktionsbedingungen anhand von Material und Methodenmodifikationen erreicht.

Eine neue Erkenntnis in dieser Arbeit liefern die im Knock-Out Tier detektierten Lphn-Transkriptmengen. Es zeigt sich keine kompensatorische Hochregulierung der Lphn1 und Lphn2 Transkriptmengen im Vergleich zu einem Wildtyp-Tier. Der Lphn3 mRNA Gehalt ist hier jedoch signifikant um 50% vermindert. Dies wirft die Frage über alternative Spleißvarianten des Lphn3 Proteins auf, die final jedoch nicht exprimiert würden und lässt diese Diskussion für zukünftige Forschungen offen.

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit als solche angesehen werden, die einen Teil zum besseren Verständnis der Latrophiline, seiner Expressionsverhältnisse und seiner Lokalisation in der Lunge, mit Hauptaugenmerk auf das Lphn3 Protein, beitragen können.

Es bleiben jedoch noch Fragen über die genaue Lokalisation, physiologische Funktion und pathophysiologischen Zusammenhang der Latrophiline in der Lunge offen, die es bedarf, im Rahmen von potenziellen zukünftigen Forschungen, wie sie u.a. in Kapitel 4.2 und 4.3 angedeutet werden, diskutiert zu werden.

4.1.2 Signalwege und Interaktionsproteine

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erläutert sind aGPCRs und ihre Signalwege in der Regulierung des physiologischen Gleichgewichtes, durch ihre zentrale Funktion in der Kommunikation zwischen Zellen und Geweben, von großer Bedeutung. Sie regulieren und beeinflussen somit maßgeblich die Zellphysiologie und werden damit als Schnittstelle zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen angesehen [29].

Um diesen Zusammenhang genauer aufzeigen und verstehen zu können, ist eine Aufklärung der Signalwege unumgänglich. So sind bereits zahlreiche Versuche anhand verschiedener Modellorganismen [27] unternommen worden, die GPCR-Signalisierungswege zu entschlüsseln [33]. Die Signalisierungskonzepte verschiedener GPCRs werden bisher oft anhand von Methoden beschrieben, die auf Ebene der *second messenger*, wie z.B. anhand der Detektion einer cAMP-Veränderung [33], [27] funktionieren und somit Rückschlüsse auf beteiligte und/ oder gekoppelte Rezeptoren und Proteine zulässt [33].

Wie bereits beschrieben, werden die aGPCR an ihrer autoproteolytischen GPS-Stelle während der Biosynthese gespalten, sodass die nicht-kovalent gebundenen Fragmente CTF und NTF entstehen [33]. Diese Aktivierung durch die Fragmentdissoziation initiiert bzw. fördert die Signalübertragung der aGPCR [56]. Sie ist jedoch nicht für jede Aktivierung bzw. jeden Signalweg erforderlich [44].

Für eine verstärkte Signalübertragung ist das unmittelbar der GPS-Stelle folgende Peptidsegment, auch als Stielpeptid, „Stachel“ oder TA (engl.: *tethered agonist*) bezeichnet, als interner Agonist und somit Aktivator der aGPCR maßgeblich von Bedeutung [33].

Anhand dieser Erkenntnis und dem bedeutenden methodischen Fortschritt konnte in neusten Forschungsergebnissen für Lphn3 neuronal die Aktivierung von $G_{12/13}$ und G_q Signalwegen beschrieben werden [33], [56].

Diskussion

GPCR, die bisher bekanntermaßen ihre Wirkung über den $G_{12/13}$ Signalmechanismus entfalten, regulieren sogenannte Rho-GEFs (Rho-Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren), die RhoA, eine kleine GTPase aus der Ras-Familie, aktivieren. Diese wiederum reguliert über verschiedene Mechanismen, u.a. die Aktivitätsregulierung der Rho-Kinase und Myosin Phosphatase, zahlreiche zelluläre Funktionen. Hier werden vor allem Migration, Adhäsion, Formänderungen und Kontraktion genannt [33], [59].

Da bereits viele aGPCR, die an $G_{12/13}$ Rezeptoren koppeln, so wie in diesem Falle ihre Wirkungen ebenfalls über G_q -Signalwege entfalten [33], ist ein möglicher Synergismus zu diskutieren [59].

Wie zudem vorher in Kapitel 1.2.1 erwähnt, können Latrophiline drei Klassen von Proteinliganden binden. Zu diesen Interaktionsproteinen werden bisher Teneurine, Neurexine und FLRTs gezählt, welche mit der Lectin-ähnlichen bzw. Olfactomedin-ähnlichen Domäne der Latrophiline interagieren können [56], [33]. Es wird vermutet, dass durch die Bindung dieser Interaktionsproteine Konformationsmodulationen vermittelt werden, die folglich Signaltransduktionen induzieren können [56] und somit viele physiologische Prozesse wie u.a. die Synapsenbildung, -morphologie und -stabilisierung steuern, sowie auch durch die Einflussnahme auf die Aktin-Zytoskelettdynamik in Bezug auf Zellwachstums- und Adhäsionsereignissen [33] beitragen können.

Hervorgehoben werden soll hier auch besonders die Interaktion des Liganden FLRT3 mit Latrophilin3, dessen Wechselwirkung eine bedeutende Rolle in der Regulation der glatten Atemwegsmuskulatur, in Bezug auf Kontraktion, Proliferation, Remodeling- und Adhäsionsfunktionen erfüllen soll. Somit wird dieser auch in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben [11], [31].

Der Mechanismus dieser physiologischen Prozesse bleibt bisher nur unvollständig verstanden. Jedoch zeigen Lphn2 und Lphn3 in hippocampalen Synapsen eine typische GPCR-Aktivität, die Einfluss auf den cAMP-Spiegel haben und somit vermutlich einen klassischen GPCR-Signalweg aktivieren, um regulatorische Funktionen vermitteln zu können. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Lphn-Signale höchstwahrscheinlich kontextabhängig durch Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern, die es teilweise noch zu identifizieren gilt, in spezifische Aktivitäten übersetzt werden könnten [40].

In vorherigen Arbeiten ist für Lphn3 im Pankreas bspw. eine Aktivierung G_i -Signalweg beschrieben, die mit den o.g. cAMP Detektionen übereinstimmen könnten.

Hier sind jedoch auch bereits Vermutungen über den Einfluss von verschiedenen gewebespezifischen Spleißvarianten und dementsprechend Aktivierungsmodi und Signalwege aufgestellt worden [51].

Diskussion

Des Weiteren haben neuere Erkenntnisse ergeben, dass das Latrophilin Homolog Latrophilin/dCIRL in *Drosophila melanogaster* mechanosensorische Eigenschaften besitzt und durch die Umwandlung von mechanischen Signalen in intrazelluläre Reaktionen, eine bedeutende Rolle in der Verarbeitung von mechanischen Reizen spielt [8], [27], [43], [44]. Diese umfassen Berührungen, Dehnungen/ Verformungen, sowie Propriozeption als auch die Nozizeption [8].

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Lphn/dCIRL durch mechanische Belastungen und Scherkräfte entweder eine Entfernung des NTF oder die mechanisch induzierte Konformationsänderung der extrazellulären Domäne zur ‚TA‘-Freilegung führt und somit die Signalgebung aktiviert oder diese ‚TA‘ unabhängig beeinflusst [33].

Diese Lphn/ dCIRL vermittelte Signalisierung bedingt laut neuester Studien eine erhöhte cAMP- abhängige Neuronensensibilität und somit auch Mechanosensitivität, die der Signaldiskriminierung dienen und einen entscheidenden Einfluss auf die Nozizeption haben, in dem sie durch einen veränderten cAMP-Spiegel die Aktivität von Nozizeptoren regulieren können [8]. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass die Liganden ihre Wirkung durch Wechselwirkungen mit den Latrophilinen entfalten, als auch die Einflüsse von mechanischem Stress mitunter ebenfalls über die o.g. Signalwege laufen können [33], [56]. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass Latrophilin Fragmentdissoziationen und somit Aktivierungsmechanismen durch Liganden und mechanischen Stress vermittelt werden können. Jedoch wäre ein vollständiges Verständnis über die beteiligten Signaltransduktionswege und Aktivierungsmechanismen wünschenswert [56]. Des Weiteren wird eine Vielzahl an Interaktionspartnern (Effektoren/ Modulatoren und Regulatoren) mit oftmals noch unklarer Interaktionsbedeutung vermutet und sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [59].

Für folgende Forschungen wird vorgeschlagen die Funktion der Latrophilin vermittelten Signalübertragungsmechanismen genauer zu untersuchen. Denn diese stellen neue unerforschte Aspekte dar, die nicht nur im Gehirn genauer untersucht werden sollten, um ein besseres Verständnis über die damit assoziierten neurophysiologischen und -psychologischen Erkrankungen gewinnen zu können, sondern auch analog dazu in anderen Geweben. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit herausgearbeiteten Aspekte, wäre hier besonders die Funktion dieser im Lungengewebe von großem Interesse. Die in den bisherigen Arbeiten vorgestellten Interaktionspartner und Signalwege der Latrophiline mögen, vor allem im Hinblick auf den möglichen Zusammenhang mit der glatten Muskelzellkontraktion, als auch die Einwirkung mechanischer Kräfte in der Lunge, erwähnt werden, die einen neuen Ansatzpunkt bieten, neue Möglichkeiten über das Verständnis pathophysiologischer Merkmale des Asthma bronchiale in Verbindung mit Lphn3 aufzeigen zu können.

4.2 Experimentdurchführung in aktuellem Forschungsbezug

Um die Lokalisation der Latrophiline in der Lunge genauer beschreiben zu können, werden in dieser Arbeit α HA und α GFP Antikörper für die histologischen Untersuchungen verwendet, die bereits erfolgreich in Vorarbeiten von *Sando et al.* (2019) in Kryoschnitten des Gehirns etabliert wurden. Jedoch kann Wirksamkeit und somit auch die Einsatzfähigkeit des Antikörpers in Bezug auf unterschiedliche Gewebe variieren. Auf Grund dessen wird in diesem Kapitel auf Etablierungsmöglichkeiten der Verfahren eingegangen.

4.2.1 Immunhistochemische Reaktionen: Vergleich von IHC und IF-Strategien

Wie bereits erwähnt, dienen Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis und zur Positions- bzw. Lokalisationsbestimmung von Proteinen und weiteren Antigenen. Dieser Nachweis kann chromogen (IHC) oder fluoreszierend (IF) erfolgen. Je nachdem können diese für optimale Ergebnisse nach unterschiedlichen Ansätzen etabliert werden. Das Ergebnis kann u.a. durch die Gewebeerarbeitung (Fixierung und Einbettung), dementsprechend von Antigen-Retrieval Methoden als auch durch den Antikörper an sich beeinflusst werden [67].

Die hier verwendeten Antikörper funktionieren durch einen indirekten Lphn Nachweis über die eingefügten HA- oder GFP-Sequenzen, da ein direktes Nachweisverfahren Antikörpertechnisch noch nicht entwickelt ist. Da diese im Gehirngewebe bereits erfolgreich etabliert sind, stellt sich nun die Frage nach einer gewebspezifischen Proteinstruktur, die den Nachweis in der Lunge erschweren könnten, nach einer ungenügenden Entparaffinierung oder nach unzureichenden Retrieval Methoden. Da in dieser Arbeit Lphn3 indirekt durch den hier verwendeten Antikörper α HA im Western Blot erfolgreich im Lungengewebe nachgewiesen werden konnte, wird der Fokus zur Optimierung im Folgenden auf die Retrieval Methoden gelegt.

Erwähnt werden sollen hier zusätzlich kurz die Möglichkeiten, Signalwege der Latrophiline, wie sie anhand verschiedener Modellorganismen bereits durchgeführt werden [27], sowie Funktionen der Latrophiline in der Lunge, analog zu [40] im Gehirn, aufzuzeigen. Durch u.a. den beliebten Einsatz von FRET- basierten genetisch kodierten Sensoren zur Verfolgung intrazellulärer Konzentrationsänderungen von wichtigen GPCR modulierten Botenstoffen wie bspw. cAMP oder Ca^{2+} , konnten zahlreiche GPCR-Signalisierungskonzepte entschlüsselt werden [27].

4.2.2 Immunhistochemische Reaktionen: Vergleich von Antigen-Retrieval (AR) /Epitop- Retrieval (ER) Strategien

Wie bereits auf Seite 68 im Unterkapitel „Thermische Demaskierung [...]“ erläutert, ist die durch Hitze induzierte Antigen- oder Epitop Freilegung eine weit verbreitete Methode, die für histologische Gewebeuntersuchungen wie z.B. die Immunhistochemie und/ oder Immunfluoreszenz eines standardmäßig in Formaldehyd fixiertem und Paraffin eingebettetem Gewebe, zur Verbesserung der Antigenität bzw. Immunreaktionen verwendet wird.

Auf Grund der Fixierung mittels der standardmäßig verwendeten 4%-igen PFA (p-Formaldehyd-) Fixierungslösung, kommt es vermutlich durch diverse Vernetzungen zu Konformationsänderungen bzw. Veränderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur, wodurch die Antikörperbindungsstellen (Epitope) maskiert bzw. unzugänglich gemacht werden und somit keine oder nur eine geringere Interaktionsmöglichkeit mit den Antikörpern besteht. Es kommt dementsprechend zu einer Beeinträchtigung der Zell- und Gewebeintegrität [21].

Durch diese verlorengegangenen Immunreaktivität auf Grund der geringeren Verfügbarkeit der Epitope ist eine Rückgewinnung und Wiederherstellung dieser unumgänglich und wird als Schlüsselprozess für eine optimale Immunreaktion von fixierten Geweben angesehen [16].

Es existiert bereits eine große Vielfalt an sog. Retrieval Methoden. Dies ist auch dem Grund geschuldet, dass Proteine der unterschiedlichen Organe bzw. Gewebe zum einen unterschiedlich auf die Gewebeaufarbeitung reagieren können und somit auch zum anderen unterschiedliche Reaktionen auf Antigen Retrieval Methoden zeigen und dementsprechend eine unterschiedliche Wirksamkeit dieser auf verschiedene Proteine besteht [13] ,[21]. Hierbei ist jedoch der genaue Mechanismus der Retrieval Methoden [26] als auch die genaue Auswirkung der PFA Fixierung und Paraffin Einbettung [21] auf die Proteine noch nicht vollständig geklärt und wird als komplex verstanden [13].

Zahlreiche Hitze induzierten Retrieval Methoden, sowie auch Retrieval Methoden durch proteolytische Enzymreaktionen wurden bereits für unterschiedliche Gewebe modifiziert und etabliert [13], [15], [16], [21], [26], [57], wobei die Etablierung einer geeigneten Retrieval Methode auf Grund der proteinspezifischen Reaktionseigenschaften meist einen empirischen Prozess darstellt [57].

Diskussion

Bei dem Hitze-induzierten Antigen Retrieval werden z.B. die Temperatur, die Wärme-expositions-dauer, sowie der pH-Wert und die Zusammensetzung der Antigen Retrieval Lösung als einen bedeutenden Faktor in Bezug auf die Effektivität der verschiedenen Methoden angesehen und dementsprechend proteinspezifisch modifiziert [21], [26].

Gängige Wärmequellen für diese Verfahren stellen Mikrowellen, Autoklaven, Schnellkochtöpfe [26], Dampferhitzer [15] oder Wasserbäder dar [15], [26].

Als Retrieval Lösungen werden häufig Citrat-, TRIS-HCl- oder EDTA-haltige Lösungen, [26] sowie Citraconsäureanhydrid [15] als auch Kombinationen aus diesen Lösungen in unterschiedlichen pH-Stufen und Konzentrationen verwendet [26]. Des Weiteren können Detergenzien, wie z.B. Ca^{2+} Chelatbildner hilfreich sein und die Leistung verschiedener Retrieval Methoden verbessern [21]. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Einfluss der verwendeten (primären) Antikörperkonzentrationen, die in dieser Arbeit bereits etabliert werden konnten, sowie auch das sekundäre Detektionssystem, die für das Ergebnis der Immunfärbungen ebenfalls entscheidend sind [13].

Hitze-induzierte Retrieval Verfahren sind häufig mit einem Gewebeverlust assoziiert, wie er auch in dieser Arbeit vorgekommen ist. Dieser kann bei Verfahren mit einer geringeren Temperatur [13] aber auch durch die Verwendung von proteolytischen Enzymen verringert werden [16].

Gängige proteolytische Retrieval Verfahren, die bei PFA-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben angewendet und teilweise bereits vor dem HIER entdeckt wurden, sind u.a. der Protease-Spaltung mittels Pepsin [16], oder Trypsin [13], [57].

Diese führten teilweise zu effektiveren Immunreaktionen [16], die u.a. von einer intensiveren Immunfärbung begleitet werden können [13], [21]. Des Weiteren wurde die Handhabung dieses Verfahrens teilweise als einfacher und zeitlich weniger aufwändig beschrieben [16]. Jedoch kann es sich auch um einen schmalen Grat zwischen Effektivität, für die besonders die Expositions-dauer der Fixierung von Bedeutung ist [13], [57], und Ineffizienz des Verfahrens, durch Gewebeerstörung, handeln [26].

Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten [16], ist ein Verfahren für eine verbesserte Gewebeintegrität mit Hilfe von mechanischer Kompression etabliert worden, die bei effektivem Retrieval den Verlust oder die Beeinträchtigung der Gewebemorphologie durch die erhaltende Haftung des Gewebes am Objektträger verhindern kann [10].

Die hier erläuterten Aspekte, stellen ggf. den Bedarf weiterer Modifikationen und Etablierungen für potenziell verbesserungswürdigere immunhistochemische und Immunfluoreszenz basierende Methoden im Rahmen des o.g. empirischen Prozesses dar.

4.3 Potenzielle Folgeversuche

In dieser Arbeit wurde bereits ausführlich erläutert, dass zwischen den Latrophilinen (insbesondere Lphn3) und der Pathogenese des Asthma bronchiale ein potenzieller Zusammenhang bestehen könnte.

Um die Beziehung zwischen den Latrophilinen und den pathophysiologischen Merkmalen des Asthma bronchiale genauer untersuchen und herausarbeiten zu können, wird hier versucht, potenzielle Folgeversuche anhand von Asthmodellen bei Mäusen, wie sie in mehreren Arbeiten bereits durchgeführt wurden [24], [28], [39], [47], [50], [60], [61], [62], [63], zu entwickeln bzw. modifizieren.

Bisher sind bereits viele verschiedene Asthma-Tiermodelle verwendet worden, um ein genaueres Verständnis über die Pathogenese und verschiedene molekulare Mechanismen der Erkrankung Asthma bronchiale und ihrer Subtypen zu erlangen [61], [63]. Diese können sich jedoch je nach den zu analysierenden Gesichtspunkten wie z.B. die Art der induzierten allergischen Atemwegsentszündung oder dem Einfluss von verschiedenen Effektor Elementen unterscheiden. So differenzieren sich diese Asthma-Tiermodelle beispielsweise in dem verwendeten Allergen zur Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung, dessen Dosis, Applikationsweg und -zeitraum, sowie auch in dem verwendeten Mausstamm [61].

Studien anhand von Asthma-Tiermodellen können unter der Anwendung verschiedener genetischer Ansätze analysieren, wie das Vorhandensein oder das Fehlen eines pot. Effektorelementes die Expression verschiedener Asthmarkerkmale beeinflusst [62].

Anhand der Durchführung solcher Versuche konnten bisher in diversen Studien bedeutende Rollen einiger Entzündungszellen, sowie Effektorelemente und deren Signalwege (v.a. eosinophile, neutrophile Lymphozyten, Mastzellen [47], [62] und diverse Interleukine [24]) herausgearbeitet werden. Jedoch ist die Pathogenese des Asthma bronchiale noch nicht vollständig aufgeklärt [24], [28], [47], [60], [61], [62], [63].

Hauptsächlich werden zwei Verfahren angewendet, um eine entzündliche Atemwegsreaktion zu induzieren. Auf Grund dessen werden im Folgenden die Sensibilisierung und Provokation durch Ovalbumin (OVA) [47], [60], [62] und Hausstaubmilbenextrakt (HDM) der Gattung *Dermatophagoides pternyssinus* oder *D. farinae* [24], [28], [47], [61] vorgeschlagen und ausführlicher diskutiert.

Etabliert sind jedoch auch weitere Modelle, wie z.B. die Verwendung von *Aspergillus fumigatus* (Af), *Alternaria alternata* (Alternaria Pilzextrakt), Liposacchariden (LPS) oder Schabenextrakt (CE) [39], [61].

Diskussion

Ovalbumin (OVA) ist ein kostengünstiges Proteinantigen, welches häufig in Studien zur Induktion von Allergien und auch Atemwegsentzündungen in Tiermodellen verwendet wird, da es sich gut zur Analyse der Immunantwort eignet [61].

Für die hier diskutierten Asthma-Tiermodelle wird, analog zu den Untersuchungen von Yao *et al.* (2015), eine Einteilung von Latrophilin 3 Knock-In Tiere in zwei Gruppen zum Vergleich vorgeschlagen. Zum einen die OVA-exponierte Tiergruppe, in der eine primäre Sensibilisierung und anschließende Provokation mit OVA stattfindet, zum anderen eine Kontrollgruppe, in der selbiges jeweils ohne OVA-Exposition mit PBS durchgeführt wird.

Es wird ebenfalls vorgeschlagen, die Latrophilin 3 Knock-In Mäuse in Bezug auf ihren **mRNA Gehalt** (Lphn-Transkriptmengen analog zu Kapitel 2.3) und ihrer **Protein-expression** (wie in Kapitel 2.4 beschrieben) zu untersuchen. Zusätzlich hierzu können die Gewebe anhand Immunhistochemischer- (Kap. 2.5.2) und Immunfluoreszenz-basierender (Kap. 2.5.3), sowie auch histologischen Untersuchungen (wie in Kapitel 4.2 diskutiert) verglichen werden.

So kann eine potenzielle Heraufregulierung, oder auch potenzielle ‚Dysregulierung‘ der Latrophiline bei einer OVA- induzierten allergischen Atemwegsentzündung analysiert werden. Zusätzlich wird vorgeschlagen die Korrelation zwischen Latrophilinen und einer **entzündlichen Atemwegsreaktion** zu analysieren (siehe unten).

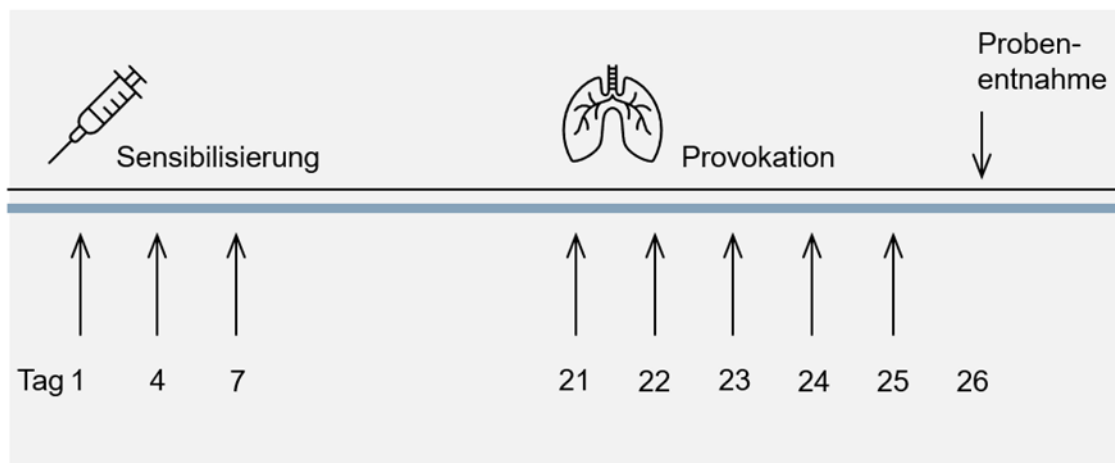


Abbildung 38 Vorschlag eines Ovalbumin (OVA-induziertes) Asthma Mausmodells, welches sich an den Untersuchungen von Yao *et al.* (2015) orientiert [60]. Die Pfeile entsprechen der Probeentnahme an den genannten Tagen.

In dem hier im Folgenden beschriebenen Asthma-Mausmodell (Abbildung 38) wird Ovalbumin zur Sensibilisierung den Latrophilin 3 Knock-In Tieren, zusammen mit Aluminiumhydroxid und PBS, dreimalig intraperitoneal (i.p.) appliziert. Exemplarisch wird hier die Sensibilisierung an den Tagen 1, 7 und 14 mit 40 µg OVA, 4 mg AlOH₃ in 100 µl PBS vorgeschlagen.

Diskussion

Anschließend erfolgt eine Provokation der Tiere, hier exemplarisch an den Tagen 21-25 unter 30-minütiger Exposition mit aerosolisiertem OVA (5%-ig) durch ein Kammer-Verneblersystem, dargestellt. Die Kontrolltiergruppe erhält wie bereits beschrieben die Sensibilisierungs- und Provokationsmaßnahmen mit PBS.

Daraufhin kann 24 Stunden postexpositionell (Tag 26) eine Probeentnahme zur genauen Analyse der induzierten allergischen Atemwegsentzündung erfolgen.

Wie bereits beschrieben sind jedoch auch Variationen und Modifizierungen bezüglich der Applikationsabstände, -wege (bspw. die Sensibilisierung subkutan und die Provokation intranasal) und auch Konzentrationen möglich [47], [62], [63]. So kann beispielsweise auch eine weitere Kontrollgruppe der Latrophilin Knock-In Tiere, analog zu der Arbeit von *Sibilano et al. (2016)* [47], mit der Behandlung eines Lphn3-Antikörpers (entsprechend der Arbeit von *Liu et al. (2018)* [31] und methodisch vergleichbar zu den Arbeiten von *Tomlinson et al. (2010)* [53]) in Betracht gezogen werden.

Um die Auswirkung von Latrophilin 3 bzw. die Korrelation zwischen Latrophilin 3 und der zu erwartenden **Atemwegsentzündung** analysieren zu können, wird vorgeschlagen, diese anhand verschiedener Parameter zu untersuchen.

Für die Quantifizierung der induzierten Atemwegsentzündung eignet sich zum einen eine Bestimmung der **Atemwegs-Hyperreagibilität** (AHR) in Form einer Lungenfunktionsmessung unter Metacholinprovokation in steigender Konzentration, im Vergleich zu einem vorher bestimmten Basalwert. Diese kann nicht-invasiv, durch Provokation in einem Einkammer Ganzkörper-Bodyplethysmographen [60], oder invasiv anhand einer Metacholin-Provokation von anästhesierten, tracheotomierten und beatmeten Tieren [47], [62], erfolgen. Hierfür ist der Lungenwiderstand (R_L) und die dynamische Compliance (C_{dyn}) von besonderem Interesse, welche durch Fluss-, Druck- und Volumenmessungen bestimmt werden können.

Des Weiteren wird die Durchführung einer **Bronchoalveolären Lavage** (BAL) für die Untersuchung einer entzündlichen Zellinfiltration, mit Augenmerk auf die Entzündungszellen (Gesamtlymphozyten, eosinophile-, neutrophile-, und basophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen), sowie Mediatoren (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17A, INF γ), vorgeschlagen, da diese bei einer allergischen Atemwegsentzündung und somit in der Pathogenese des Asthma bronchiale von nicht unbedeutender Relevanz sind.

So werden z.B. IL-5 [24], [61] und IL-13 [53], [52] in der Entwicklung einer AHR, IL-9 für die Mastzellproliferation [61], die mit ihrer Funktion mehrere Merkmale der Asthmapathologie hervorrufen und beeinflussen können [47], [62], sowie IL-13 [52] und IL-17A [24] für die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur eine bedeutende Rolle zugeschrieben.

Diskussion

Die BAL-Flüssigkeit kann durch Spülung der Lunge mit kaltem PBS [28], [60] oder HBSS [47] gewonnen werden und mittels ELISA oder Zellfärbung in Kombination mit einer Zell-Zählungsmethode analysiert werden.

Eine **Serumbestimmung** von Gesamt-IgE, OVA-spezifischen IgE und IgG's durch bspw. retroorbitale Blutentnahme kann einen weiteren Aufschluss über das Ausmaß der induzierten Atemwegsreaktion geben.

Zusätzlich zu den bisher erwähnten histologischen Untersuchungen, können neben der HE-Färbung für die Darstellung der (Entzündungs-) Zellinfiltration, weitere Färbungen des Lungengewebes, wie bspw. die PAS-, Masson-Goldner-Trichrom Färbung, zur Darstellung des Atemweg-**Remodelings** unter Berücksichtigung der Kollagenfasern, muzinhaltigen Zellen, sowie auch der Becherzellen, durchgeführt werden [60].

Ergänzend hierzu wird eine Untersuchung der potenziellen Proliferation der glatten Atemwegsmuskelzellen als weiterer Remodelingfaktor vorgeschlagen, die ebenfalls mit der Latrophilin-Expression korrelieren könnte. Diese könnte bspw. durch histologische Untersuchungen, wie die hier beschriebene IF der ASM (S. 76ff) durchgeführt werden.

Zu diskutieren gilt es bei diesem Asthmodell, dass die Sensibilisierung beim Menschen nicht intraperitoneal oder subkutan verläuft. Zudem kann die intraperitoneale Applikation und somit Allergensensibilisierung die Immuntoleranz gegenüber diesem fördern [61], weshalb zunehmend eine intranasale Applikation in Betracht gezogen wird. [61], [63]. Bei einer intranasalen Applikation wird zudem die Notwendigkeit zur Verwendung eines Adjuvants (meist Aluminiumhydroxid) hinfällig, wie sie bei der subkutanen oder intraperitonealen Applikation erforderlich ist [61].

Neben der durch OVA induzierten Atemwegsentszündung und Immunreaktion in Tiermodellen [60], [61]. kann solch eine Reaktionen ebenfalls durch Hausstaubmilbenextrakt (HDM) ausgelöst werden [23], [28].

HDM stellt ein physiologisches Asthmodell dar und ersetzt fortlaufend das OVA-induzierte Asthma Tiermodell [61], da OVA ein Modellantigen, jedoch kein typisches Atemwegsallergen des Menschen darstellt [39]. Des Weiteren wird das HDM-induzierte Asthma-Tiermodell vorzugsweise auf Grund der hohen Ähnlichkeit zur menschlichen Asthmasymptomatik für die Analyse und Untersuchung der Asthmapathophysiologie verwendet und dem menschlichen Asthmodell als ähnlich erachtet [61].

Die HDM-Sensibilisierung, dessen Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung, unter Berücksichtigung der geographischen Unterschiede ca. 100 Millionen Menschen beträgt, ist mit einem hohen Risiko zur Entwicklung einer Atemwegsentszündung (v.a. der Erkrankung Asthma bronchiale), sowie einer Exazerbation dieser vergesellschaftet. Aus diesem Grunde liegt die Anwendung dieses Asthma Tiermodells nahe [61].

Diskussion

Da die Allergenexposition beim Menschen jedoch meist über einen längeren Zeitraum erfolgt, kann des Weiteren versucht werden, den Versuchsaufbau optimaler an das Expositionsmuster anzupassen.

Auf Grund dessen wird hier analog zu der Arbeit von *Le et al. (2014)*, ein Alternatives HDM Asthma-Tiermodell vorgeschlagen.

Da wie bereits erwähnt beim Menschen die Allergenexposition und somit Sensibilisierung meist über die Atemwege erfolgt, wird eine mögliche (sub-) kutane Sensibilisierung [24] ausgeklammert. In dem hier dargestellten Asthmodell (Abbildung 39 [28]) erfolgt eine intranasale Applikation eines HDM-Extraktes (exemplarisch 25 µg HDM-Extrakt mit 50 µl einer Kochsalzlösung) fünf Mal wöchentlich über einen Zeitraum von sieben Wochen. Eine Probeentnahme für die Auswertung in Hinblick auf die oben bereits erläuterten Parameter erfolgt hier ebenfalls 24 Stunden nach der zuletzt stattgehabten HDM-Exposition (Tag 48).

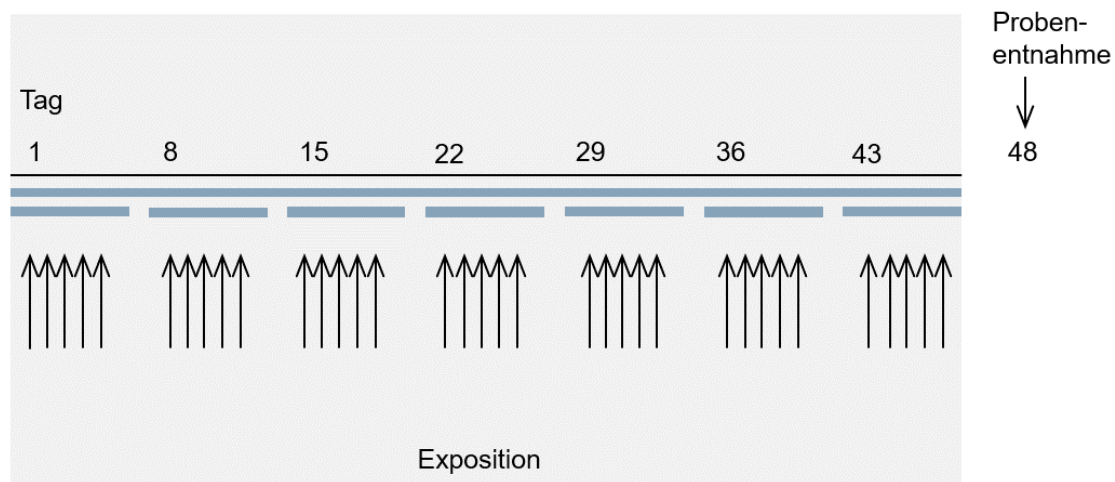


Abbildung 39 Vorschlag eines Hausstaubmilben (HDM-Extrakt induziertes) Asthma Mausmodells, welches sich an den Arbeiten von *Le et al. (2014)* orientiert. [28]. Die Pfeile entsprechen der Probeentnahme innerhalb der Woche.

Es sollte jedoch bedacht werden, dass Unterschiede der verschiedenen Hausstaubmilbenextrakte berücksichtigt werden müssen und somit eine individuelle Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die Fragestellung erfolgen sollte [61].

In den hier vorgeschlagenen Asthma-Tiermodellen wird allein die Probeentnahme zur Analyse am generellen Versuchsendpunkt beschrieben. Jedoch kann man die OVA-, analog dazu auch die HDM-induzierte allergische Atemwegsentzündung zusätzlich in einem zeitlichen Verlauf und somit in ihrer Entwicklung betrachten, sowie analog zu den Untersuchungen von *Yao et al. (2015)* eine potenzielle Veränderung der Latrophilin 3 Transkriptmengen und Proteinexpression.

Diskussion

Zusätzlich dazu könnten die hier beschriebenen Asthma-induzierenden Folgeversuche der Latrophilin3 Knock-In Mäuse im Vergleich zu Latrophilin 3 Knock-Out Mäusen durchgeführt werden, um die Bedeutung der Latrophiline in Bezug auf ihre potenziell entscheidende Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale genauer betrachten und darstellen zu können.

Abschließend dazu sollte auch berücksichtigt werden, dass gewisse Unterschiede zwischen dem Immunsystem des Menschen und dem der Maus vorhanden sind [61] sowie auch bereits die in Kapitel 4.1 erläuterten entscheidenden Unterschiede der anatomischen Organisation der Lunge bestehen [38].

Wie anfangs bereits erwähnt, stellt die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung Asthma bronchiale eines der häufigsten chronischen Erkrankung des Menschen dar [20]. Die überwiegenden pharmakologischen Therapieansätze beruhen auf der Regulation von verschiedenen GPCRs und dessen Signalwege [9], wobei sich dadurch nicht bei jedem Patienten die Erkrankung optimal therapieren lässt. Dies kann dadurch bedingt sein, dass genetische Variationen innerhalb funktioneller GPCR-Regionen für individuelle Unterschiede in Bezug auf Wirkung und auch Nebenwirkung von Medikamenten verantwortlich sein können [18].

Durch neuste Forschungen haben sich Latrophiline, eine Rezeptorgruppe der Adhäsions- GPCR, mit Hauptaugenmerk auf das Asthmakandidaten Protein Lphn3, als neues, potenziell vielversprechendes pharmakologische Ziel aufgetan [11], [31].

Verschiedene Modellorganismen haben durch ihre Fähigkeit, verschiedene bestimmte Zell- und Organismus Zustände zu erkennen und somit Hinweise auf Rezeptorfunktionen zu erhalten, ohne die genauen molekularen Grundlagen dieser Effekte zu kennen, eine große Bedeutung in der pharmakologischen Forschung [27].

So gelang es bisher verschiedene Signaltransduktionsmechanismen und Interaktionspartner der Latrophiline zu identifizieren, diese gelten jedoch als noch unvollständig verstanden und sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

Zusammenfassend betrachtet, bieten die Latrophiline mit einem zunehmenden Verständnis über ihre physiologische Funktionsweise durch Signaltransduktionswege oder Interaktionspartner, neue Möglichkeiten die pathophysiologischen Merkmale des Asthma bronchiale, besonders im Hinblick auf den möglichen Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskelzellen und Aktivitätsregulierung durch die Einwirkung mechanischer Kräfte in der Lunge, zu verstehen.

Somit kann diese Arbeit durch die Beschreibung der Expressionsverhältnisse und Lokalisation der Latrophiline in der Lunge, hoffentlich einen bescheidenen Beitrag dazu leisten.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1 | Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit 7 Transmembrandomänen (α -Helices), einem extrazellulären N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus | 6 |
| Abbildung 2 | inaktives G-Protein mit GDP an α -Untereinheit gebunden (links) und aktives G-Protein mit GTP an α -Untereinheit gebunden und dissoziierter $\beta\gamma$ -Untereinheit (rechts)..... | 7 |
| Abbildung 3 | vereinfachte Signaltransduktionswege der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, frei nach [32] und [48]..... | 9 |
| Abbildung 4 | Exemplarischer vereinfachter Aufbau der Latrophiline, frei nach [34] und [36]..... | 14 |
| Abbildung 5 | Makroskopischer Aufbau der rechten und linken Lunge in der ventralen Ansicht. | 19 |
| Abbildung 6 | Lungenlappen und Lungensegmente. Original: Endspurt Klinik Innere Medizin und Chirurgie, Georg Thieme Verlag (2017) [54], anschließend eigene Bearbeitung..... | 20 |
| Abbildung 7 | Funktioneller Aufbau des Bronchialbaums. Original: Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag (2020) [3], anschließend eigene Bearbeitung..... | 21 |
| Abbildung 8 | Schematischer Wandaufbau der Trachea. Original: Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag (2020) [3], anschließend eigene Bearbeitung..... | 22 |
| Abbildung 9 | Querschnitt durch einen kleinen Bronchus (links)..... | 23 |
| Abbildung 10 | Schematische Darstellung der Blut-Luft-Schranke. Original: N. Ulfig, Kurzlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag (2019) [55], anschließend eigene Bearbeitung..... | 24 |
| Abbildung 11 | Querschnitt durch einen Bronchus - Vergleich Normalzustand und typ. Trias bei Asthma bronchiale. | 27 |
| Abbildung 12 | Lphn 2 PCR der Tiere #111-126 (Oligonukleotid Primerkombination MX11603 und MX11604) und einem 50 Basenpaarleiter (PL: 50 bp Probenleiter mit * bei 300 bp) mit sichtbarer Lphn2 Allel Bande bei 333 bp und einer Wildtyp Allel Bande bei 266 bp. | 59 |
| Abbildung 13 | Lphn3 PCR der Mäuse #107-121 (Oligonukleotid- Primerkombination MX14656 und MX14658) und einem 50 Basenpaarleiter (PL: 50 bp Probenleiter mit * bei 300 bp) mit sichtbarer Lphn3-Allel Bande bei 419 bp und einer Wildtyp-Allel Bande bei 318 bp. | 60 |

Abbildung 14 Darstellung der Lunge mit Aufteilung in die Abschnitte Trachea (blau), Margo (braun) und Rest (rosa). 61

Abbildung 15 RT-qPCR Vergleich der Latrophilin 1, 2 und 3 mit Aufteilung des Gewebes in Margo Trachea und Rest. Statistische Darstellung der Mittelwerte und SEM unter Verwendung des t-Tests (zweiseitig bei gleicher Gruppengröße mit n=3). Statistisch nicht signifikant (ns bei $p > 0,05$), signifikant (* bei $p < 0,05$) und hoch signifikant (** bei $p < 0,01$). 62

Abbildung 16 modifiziertes Lphn3 Protein mit detektierbarem HA-Tag am N- terminalen Ende. Dargestellt ist hier die autoproteolytische Spaltung des Lphn3 an der GPS-Stelle (*). 64

Abbildung 17 Western Blot mit primärem HA-Antikörper in 1:8000 Verdünnung. Dargestellt sind hier ein Wildtyp- (WT) und Lphn3 Knock-In Tier (#112) aufgeteilt in Margo (M), Trachea (T) und Rest (R). Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande. 65

Abbildung 18 Western Blot mit primären HA-Antikörper in **1:2000** Verdünnung. Dargestellt sind hier Lphn3 Knock-In Tiere #41 (1) #42 (2) und #43 (3) je aufgeteilt in Trachea (T) Margo (M) und Rest (R). Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande. 66

Abbildung 19 Western Blot mit primärem HA-Antikörper in **1:8000** Verdünnung. Dargestellt sind hier Lphn3 Knock-In Tiere #41 (1) #42 (2) und #43 (3) je aufgeteilt in Trachea (T) Margo (M) und Rest (R) mit zusätzlichem Tubulin Antikörper als Referenz-/ Ladekontrolle. Der Pfeil zeigt auf die wahrscheinlich charakteristische Lphn3 Bande. 66

Abbildung 20 HE-Färbung des Lungengewebes eines Lphn 3 Knock-In Tieres. (A): in Übersichtsvergrößerung. (B): in 10-facher Vergrößerung. Abk.: g: Gefäß, brc: Bronchus, bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares 67

Abbildung 21 Vergleich - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere mit der HA-Antikörper Verdünnung in 1:100 jeweils in 10-facher Vergrößerung: (A): Immunhistochemie ohne Demaskierung links, (B): Demaskierung mit Citratpuffer der pH Stufe 6 rechts. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares 69

Abbildung 22 Vergleich - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere mit der HA-Antikörper Verdünnung 1:1000 jeweils in 10-facher Vergrößerung: (A): Immunhistochemie ohne Demaskierung links, (B): Demaskierung mit Citratpuffer der pH Stufe 6 rechts. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares 70

Abbildung 23 Etablierung - Immunhistochemie der Lphn3 Knock-In Tiere jeweils in 10-facher Vergrößerung. 71

Abbildung 24 Immunhistochemische Reaktion (Vector® NovaRED™ -Chromogen Färbung) und Gewebepreparation mit Citratpuffer der pH Stufe 6 und einer HA-Antikörperverdünnung im Verhältnis 1:100 bei einem Lphn3 Knock-In Tier: (A) in 5-facher Vergrößerung, (B) in 10-facher Vergrößerung, (C) in 20-facher Vergrößerung. Abk.: g: Gefäß, bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares 72

Abbildung 25: Vergleich der Immunfluoreszenz: (A): Immunfluoreszenz ohne VECTOR® TrueView Blockierung mit deutlicher Autofluoreszenz, (B) Immunfluoreszenz mit vorheriger VECTOR® TrueView Blockierung 73

Abbildung 26 Immunfluoreszenz mit α HA-Cy3 (jeweils in der Verdünnung 1:1000) im Vergleich: (A): Lphn3 Knock-In Tier, (B): Lphn2 Knock-In Tier. Die Pfeile deuten auf unspezifische Signale der Immunfluoreszenz. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole, da: Ductus alveolares..... 74

Abbildung 27: Immunfluoreszenz mit NanoTaq α GFP im Vergleich: (A): Lphn2 Knock-In Tier, (B): Lphn2 Knock-In Tier als AK-negativ Kontrolle, (C): Lphn3 Knock-In Tier als ges. negativ-Kontroll-Tier. Die Pfeile zeigen auf die verstärkte Immunreaktion. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole..... 75

Abbildung 28 Immunfluoreszenz eines Lphn3 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin mit kombinierter DAPI-Färbung, (B): SM- α Aktin negativ-Kontrolle bei durchgeführter DAPI-Färbung. Abk.: bro: Bronchiolus..... 76

Abbildung 29 Immunfluoreszenz eines Lphn2 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin und des Cy3-Farbstoffes, (B): Fluoreszenzsignale des Cy3-Farbstoffes, (C): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin. Abk.: bro: Bronchiolus,..... 77

Abbildung 30 Immunfluoreszenz eines Lphn3 Knock-In Tieres: (A): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin und des Cy3-Farbstoffes, (B): Fluoreszenzsignale des Cy3-Farbstoffes, (C): Fluoreszenzsignale des SM- α Aktin. Abk.: bro: Bronchiolus, a: Alveole. 78

Abbildung 31 Etablierung der PCR-Methodik anhand eines Temperaturgradienten in der Lphn3 Knock-Out PCR (Oligonukleotid-Primerkombination aus MX14656 und Mx14659) mit einfach konzentrierter Taq-Polymerase (PL: Probenleiter) 80

Abbildung 32 Etablierung der PCR anhand des Materials bzw. der Reagenzien (Taq-Polymerase): Konzentrationsunterschiede in der Lphn3 Knock-Out PCR - Cre-Rekombinase Gen Nachweis- (CZ805/CZ806 Primer) durch 4-fache Auftragung einer Wildtyp-DNA Probe (86) und zwei KO-DNA Proben (87/88) im Vergleich zu einer negativ Kontrolle (keine DNA), je mit der Taq-Polymerase#2 in ein-,2- und 4-facher Konzentration und der Taq-Polymerase (#1) in einfacher Konzentration. (PL: 100 bp Probenleiter mit *500 bp) 81

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 33 Wildtyp PCR der Mäuse #292-301 (Primer MX14656 und MX15658) mit Taq Polymerase #2 4-fache Konzentration (links), Wildtyp PCR der Tiere #292-301 (Primer Mx14656 und MX15658) mit DreamTaq-Polymerase (rechts) in Negativdarstellung. (PL:100 bp Probenleiter mit *500 bp) | 82 |
| Abbildung 34 Wildtyp PCR (Oligonukleotid-Primer Kombination MX14656 und MX14658) der Tiere #300-309 mit sichtbarer Wildtyp-Bande im Bereich von 318 kDa, aufgetragen neben einem 100 Basenpaarleiter (PL: Probenleiter mit * 500 bp) – Referenzbanden..... | 83 |
| Abbildung 35 Knock-Out-PCR (Oligonukleotid-Primer Kombination MX14656 und MX14659) der Tiere #292-309 mit sichtbarer Lphn3 Knock-Out-Bande im Bereich von 601 kDa, aufgetragen neben einem 100 Basenpaarleiter (PL: 100 bp Probenleiter mit * 500 bp) - Referenzbanden..... | 83 |
| Abbildung 36 RT-qPCR Vergleich der Transkriptmengen des Lphn1, Lphn2 und Lphn3 in Lphn3- Knock-Out Tieren im Vergleich zu Lphn3 Wildtyp-Tieren. Statistische Darstellung der Mittelwerte und SEM unter Verwendung des t-Tests (zweiseitig bei gleicher Gruppengröße mit n=4). Statistisch nicht signifikant (ns bei $p>0,05$), signifikant (* bei $p<0,05$) und hoch signifikant (** bei $p<0,01$). | 84 |
| Abbildung 37 modifiziertes Lphn 3 Protein (links) mit detektierbarem Ha-Tag und modifiziertes Lphn 2 Protein (rechts) mit detektierbarem endogenem 'mVenus', frei nach [1], [41]. | 88 |
| Abbildung 38 Vorschlag eines Ovalbumin (OVA-induziertes) Asthma Mausmodells, welches sich an den Untersuchungen von Yao <i>et al.</i> (2015) orientiert [60]. Die Pfeile entsprechen der Probeentnahme an den genannten Tagen..... | 98 |
| Abbildung 39 Vorschlag eines Hausstaubmilben (HDM-Extrakt induziertes) Asthma Mausmodells, welches sich an den Arbeiten von Le <i>et al.</i> (2014) orientiert. [28]. Die Pfeile entsprechen der Probeentnahme innerhalb der Woche..... | 101 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Auswahl an Rezeptoren und Liganden, die mit G-Proteinen interagieren [12] | 11 |
| Tabelle 2: Einteilung diverser Transmitter und Liganden (Pharmaka), sowie die Gewebeverteilung und Wirkung der adrenergen Rezeptoren (A: Adrenalin, NA: Noradrenalin) keine Vollständigkeit der Tabelle [12]..... | 12 |
| Tabelle 3 Lphn Rezeptoren und Interaktion mit endogenen Liganden [56]..... | 15 |
| Tabelle 4 Primäre Antikörper | 31 |
| Tabelle 5 Sekundäre Antikörper..... | 31 |
| Tabelle 6 Enzyme | 31 |
| Tabelle 7 Primer / Startermoleküle..... | 32 |
| Tabelle 8 RT-qPCR- Assays von Integrated DNA Technologies | 32 |
| Tabelle 9 Chemikalien | 33 |
| Tabelle 10 Lösungen und Puffer | 36 |
| Tabelle 11 Mausstämme..... | 37 |
| Tabelle 12 Verbrauchsmaterialien..... | 37 |
| Tabelle 13 Geräte | 38 |
| Tabelle 14 Einfacher Reaktionsansatz für die PCR..... | 43 |
| Tabelle 15 Einfacher Reaktionsansatz für die RT-qPCR..... | 47 |
| Tabelle 16 RT-qPCR Zyklus mit den einzelnen Reaktionsschritten..... | 47 |
| Tabelle 17 Zusammensetzung des Trenngels für den Western Blot | 50 |
| Tabelle 18 Zusammensetzung des Sammelgels für den Western Blot..... | 50 |
| Tabelle 19 Einfacher Reaktionsansatz der DreamTaq-PCR..... | 82 |

5 Literaturverzeichnis

1. Anderson GR, Maxeiner S, Sando R, Tsetsenis T, Malenka RC, Südhof TC (2017) Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly. *Journal of Cell Biology*. 216 (11): 3831-3846
doi: 10.1083/jcb.201703042
2. Arastéh K et al. (2018) *Duale Reihe Innere Medizin*. 4. Edition. Georg Thieme Verlag
doi: 10.1055/b-005-145255
3. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S RD et al. (2020) *Duale Reihe Anatomie*. 5. Edition. Georg Thieme Verlag
doi: 10.1055/b-007-170976
4. Bäk B, Kbv KB, Wissenschaftlichen A Der, Fachgesellschaften M (2020) *Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma*.
5. Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M (2016) *Allergologie*. 2. Edition. Springer Verlag
doi: 10.1007/978-3-642-37203-2
6. Boucard AA, Maxeiner S, Südhof TC (2014) Latrophilins Function as Heterophilic Cell-adhesion Molecules by Binding to Teneurins REGULATION BY ALTERNATIVE SPLICING *. *Journal of Biological Chemistry*. 289 (1): 387–402
doi: 10.1074/jbc.M113.504779
7. Cruz-Ortega JS, Boucard AA (2019) Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL / latrophilins 1 , 2 and 3. *Biology Open*. 8 (4):1–11
doi: 10.1242/bio.039826
8. Dannhäuser S, Lux TJ, Hu C, Selcho M, Chen JT, Ehmann N, Sachidanandan D, Stopp S, Pauls D, Pawlak M, Langenhan T, Soba P, Rittner HL, Kittel RJ (2020) Antinociceptive modulation by the adhesion GPCR CIRL promotes mechanosensory signal discrimination. *eLife*. 9: e56738
doi: 10.7554/eLife.56738
9. Deshpande DA, Penn RB (2006) Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cellular Signalling*. 18 (12):2105–2120
doi: 10.1016/j.cellsig.2006.04.008

10. Eckhard AH, Malley JTO, Jr JBN, Adams JC (2019) Mechanical Compression of Coverslipped Tissue Sections During Heat-induced Antigen Retrieval Prevents Section Detachment and Preserves Tissue Morphology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 67 (6): 441-452
doi: 10.1369/0022155419826940
11. Faiz A, Donovan C, Nieuwenhuis MAE, Van Den Berge M, Postma DS, Yao S, Park CY, Hirsch R, Fredberg JJ, Tjin G, Halayko AJ, Rempel KL, Ward JPT, Lee T, Bossé Y, Nickle DC, Obeidat M, Vonk JM, Black JL, Oliver BG, Krishnan R, McParland B, Bourke JE, Burgess JK (2017) Latrophilin receptors: Novel bronchodilator targets in asthma. *Thorax*. 72 (1): 74–82
doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207236
12. Freissmuth M, Off S (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag
doi: 10.1007/978-3-662-46689-6
13. Frost A, Grizzle WE (2000) Methods of Antigen Recovery Vary in Their Usefulness in Unmasking Specific Antigens in Immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 8 (3): 236–243
doi: 10.1097/00129039-200009000-00011
14. Ghanemi A (2015) Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 23 (2): 115–129
doi: 10.1016/j.jsps.2013.07.007
15. Gime M (2008) A New Antigen Retrieval Technique for Human Brain Tissue. *HHS Public Access PLoS ONE*. 3 (10): e3378
doi: 10.1371/journal.pone.0003378
16. Guan N, Yu L, Wu G, Xing Y, Ding J (2008) Antigen retrieval with protease digestion applied in immunohistochemical diagnosis of Alport syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 23 (11): 3509–3513
doi: 10.1093/ndt/gfn305
17. Hamann J, Aust G, Araç D, Engel FB, Formstone C, Fredriksson R, Hall RA, Harty BL, Kirchhoff C, Knapp B, Krishnan A, Liebscher I, Lin H, Martinelli DC, Monk KR (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology . XCIV . Adhesion G Protein – Coupled Receptors. *Pharmacological Reviews*. 67 (2):338–367
doi: 10.1124/pr.114.009647
18. Hauser AS, Chavali S, Masuho I, Jahn LJ, Martemyanov KA, Gloriam DE, Babu MM, (2018) Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets Article Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* 172 (1-2): 41-43.e19
doi: 10.1016/j.cell.2017.11.033

19. Henrique L, Vasconcelos C, Correia C, Costa AC, Oliveira GA De, Leão I, Souza L De, Queiroga FR, Cabral L, Cardoso GA, Roberta C, Carvalho DO, Vieira GC (2019) A Guinea Pig Model of Airway Smooth Muscle Hyperreactivity Induced by Chronic Allergic Lung Inflammation: Contribution of Epithelium and Oxidative Stress. *frontiers in Pharmacology*. 9: 1547
doi: 10.3389/fphar.2018.01547
20. Hien P (2012) *Asthma bronchiale*. Springer Verlag
doi: 10.1007/978-3-642-10209-7
21. Hrvoje Brzica, Davorka Breljak IV (2011) Role of Microwave Heating in Antigen Retrieval in Cryosections of Formalin-Fixed Tissues. IntechOpen
ISBN: 978-953-51-4479-3
22. Ichtchenko K, Bittner MA, Krasnoperov V, Little AR, Chepurny O, Holz RW, Petrenko AG (1999) A Novel Ubiquitously Expressed - Latrotoxin Receptor Is a Member of the CIRL Family of G-protein-coupled Receptors *. *Journal of Biological Chemistry - cell biology and metabolism*. 274 (9): 5491–5498
doi: 10.1074/jbc.274.9.5491
23. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, Ellis R, Inman MD, Jordana M (2003) Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. *American Journal of Respiratory and Clinical Care Medicine*. 169 (3): 378-385
doi: 10.1164/rccm.200308-1094OC
24. Julie Chesné, Faouzi Braza, Gilliane Chadeuf, et al. (2015) Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite–induced allergic asthma model. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 135 (6): 1643-1645
doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1872
25. Jung A (2021) GINA-UPDATE 2020 Asthmatherapie : Behandlungsziele.
26. Krenacs L, Krenacs T, Stelkovics E, Raffeld M (2020) Heat-Induced Antigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. *Methods in Molecular Biology*. 588: 103-119
doi: 10.1007/978-1-59745-324-0
27. Langenhan T, Barr MM, Bruchas MR, Ewer J, Griffith LC, Maiellaro I, Taghert PH, White BH, Monk KR (2015) Model Organisms in G Protein – Coupled Receptor Research. *Molecular Pharmacology*. 88 (3): 596–603
doi: 10.1124/mol.115.098764

28. Le DD, Rochlitzer S, Fischer A, Heck S, Tschernig T, Sester M, Bals R, Welte T, Braun A, Dinh QT (2014) Allergic airway inflammation induces the migration of dendritic cells into airway sensory ganglia. *Respiratory Research*. 15 (1): 73
doi: 10.1186/1465-9921-15-73
29. Leysen H, Walter D, Christiaenssen B, Al E (2021) GPCRs Are Optimal Regulators of Complex Biological Systems and Orchestrate the Interface between Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (24): 13387
doi: 10.3390/ijms222413387
30. Lingner H, Schultz K (2007) *Volkskrankheit Asthma / COPD*.
ISBN: 9783540709190
31. Liu M, Zhang J, Liu C (2018) Clinical efficacy of recombinant human latrophilin 3 antibody in the treatment of pediatric asthma. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 15: 539–547
doi: 10.3892/etm.2017.5376
32. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Edition. Springer Verlag
ISBN: 978-3-540-32680-9
33. Mathiasen S, Palmisano T, Perry NA, Stoveken HM, Mcewen DP, Okashah N, Langenhan T, Inoue A, Lambert A, Tall GG, Javitch JA, Arbor A, Faculty M (2021) G12/13 is activated by acute tethered agonist exposure in the adhesion GPCR ADGRL3. *nature chemical biology*. 16 (12): 1343–1350
doi: 10.1038/s41589-020-0617-7.G12/13
34. Meza-Aguilar DG, Boucard AA (2014) Latrophilins updated. *Biomolecular Concepts*. 5 (6): 457–478
doi: 10.1515/bmc-2014-0032
35. Montag G (2020) *Facharztprüfung Pneumologie*. 1. Edition. Springer Verlag
doi: 10.1007/978-3-662-61574-4
36. Moreno-Salinas AL, Avila-Zozaya M, Ugalde-Silva P (2019) Latrophilins: A Neuro-Centric View of an Evolutionary Conserved Adhesion G Protein-Coupled Receptor Subfamily. *frontiers in Neuroscience*. 13: 700
doi: 10.3389/fnins.2019.00700
37. Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, Gray C, Herrera EA, Hirst JJ, Kim B, Kind KL, Krause BJ, Matthews SG, Palliser HK, Regnault TRH, Richardson BS, Sasaki A, Thompson LP, Berry MJ (2018) Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *Journal of Physiology*. 596 (23): 5535–5569
doi: 10.1113/JP274948

38. Pan H, Deutsch GH, Wert SE, Subcommittee O (2019) Comprehensive anatomic ontologies for lung development: A comparison of alveolar formation and maturation within mouse and human lung. *Journal of Biomedical Semantics*. 10:18
doi: 10.1186/s13326-019-0209-1
39. Roth-Walter F (2017) Outstanding animal studies in allergy I . From asthma to food allergy and anaphylaxis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 17 (3): 169-179
doi: 10.1097/ACI.0000000000000363
40. Sando R, Südhoff TC (2021) Latrophilin GPCR signaling mediates synapse formation. *eLife*. 10: e65717
doi: 10.7554/eLife.65717
41. Sando R et al. (2019) Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins. *Science*. 363 (6429): eaav7969
doi: 10.1126/science.aav7969
42. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (2007) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 30. Edition. Springer Verlag
doi: 10.1007/978-3-540-32910-7
43. Scholz N, Gehring J, Kittel RJ, Langenhan T, Scholz N, Gehring J, Guan C, Ljaschenko D, Fischer R, Lakshmanan V (2015) The Adhesion GPCR Latrophilin / CIRL Shapes Report The Adhesion GPCR Latrophilin / CIRL Shapes Mechanosensation. *CellReports*. 11 (6): 866–874
doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.008
44. Scholz N, Guan C, Nieberler M, Grotemeyer A, Maiellaro I, Gao S, Beck S, Pawlak M, Sauer M, Asan E, Rothmund S, Winkler J, Nagel G, Langenhan T, Kittel RJ (2017) Mechano-dependent signaling by Latrophilin / CIRL quenches cAMP in proprioceptive neurons. *eLife*. 6: e28360
doi: 10.7554/eLife.28360
45. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M WK (2018) *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*. 5. Edition. Georg Thieme Verlag
ISBN: 978-3-13-139534-4
46. Shomer NH, Holcombe H, Harkness JE (2020) *Biology and Diseases of Guinea Pigs*. Elsevir Public Health Emergency Collection. *Labaratory Animal Medicine*. 247-283
doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7

47. Sibilano R, Gaudenzio N, Degorter MK, Reber LL, Hernandez JD, Starkl PM, Zurek OW, Tsai M, Zahner S, Montgomery SB, Roers A, Kronenberg M, Yu M, Galli SJ (2016) A TNFRSF14-FcεRI-mast cell pathway contributes to development of multiple features of asthma pathology in mice. *Nature Communications*. 7: 13696
doi: 10.1038/ncomms13696
48. Silbernagl S, Despopoulos jr. A DA (2018) *Taschenatlas Physiologie*. 9. Edition. Georg Thieme Verlag
doi: 10.1055/b-006-149287
49. Sullivan O' ML et al. (2012) Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development. *Neuron*. 73 (5): 903-910
doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.018
50. Sun Y, Deng M, He J, Zeng Q, Wen W, David SH, Tem EMS, Nduced CEI, Tem PLS (2012) Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Allergic Airway Inflammation in Mice. *Stem Cells*. 30 (12): 2692-1699
doi: 10.1002/stem.1241
51. Thor D, Winkler J, Rothemund S, Pro S, Thor D, Winkler J, Knierim AB, Binder C, Huth S, Kraft R, Pro S (2019) Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release Article Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release. *Cell Reports*. 26 (6): 1573–1584
doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.040
52. Tliba O, Deshpande D, Chen H, Besien C Van, Kannan M, Jr RAP, Amrani Y (2003) IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 140 (7): 1159–1162
doi: 10.1038/sj.bjp.0705558
53. Tomlinson KL, Davies GCG, Sutton DJ, Palframan RT (2010) Neutralisation of Interleukin-13 in Mice Prevents Airway Pathology Caused by Chronic Exposure to House Dust Mite. *PLoS One*. 5 (10): e13136
doi: 10.1371/journal.pone.0013136
54. Trudzinski F (2017) *Endspurt Klinik Innere Medizin und Chirurgie*. 2. Edition. Georg Thieme Verlag
ISBN: 978-3-13-241203-3
55. Ulfing N (2019) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5. Edition. Georg Thieme Verlag
doi: 10.1055/b-006-166358

56. Vizurraga A, Adhikari R, Yeung J, Yu M, Tall GG (2020) Mechanisms of adhesion G protein – coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*. 295 (41): 14065–14083
doi: 10.1074/jbc.REV120.007423
57. Vollert CT, Moree WJ, Gregory S, Bark SJ, Eriksen JL (2015) Formaldehyde scavengers function as novel antigen retrieval agents. *Scientific Reports*. 5: 17322
doi: 10.1038/srep17322
58. Whary MT, Baumgarth N (2020) *Biology and Diseases of Mice*. Elsevier Public Health Emergency Collection. *Laboratory Animal Medicine*. 43-149
doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00003-1
59. Worzfeld T, Wettschureck N, Offermanns S (2008) G₁₂ / G₁₃ -mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29 (11): 582-589
doi: 10.1016/j.tips.2008.08.002
60. Yao Y, Zeng Q, Deng X, Tang G, Guo J (2015) Connexin 43 Upregulation in Mouse Lungs during Ovalbumin-Induced Asthma. *PLoS One*. 10 (12): e0144106
doi: 10.1371/journal.pone.0144106
61. Yasuda Y, Nagano T, Kobayashi K, Nishimura Y (2020) Group 2 Innate Lymphoid Cells and the House Dust Mite-Induced Asthma Mouse Model. *Cells*. 9 (5): 1178
doi: 10.3390/cells9051178
62. Yu M, Tsai M, Tam S, Jones C, Zehnder J, Galli SJ (2006) Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 116 (6):1633–1641
doi: 10.1172/JCI25702DS1
63. Yu QLIN, Chen Z (2018) Establishment of different experimental asthma models in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 15 (3): 2492–2498
doi: 10.3892/etm.2018.5721
64. (2020) AMBOSS GmbH: Kapitel Asthma bronchiale. zitiert am 19.04.2020
URL: https://media-de.amboss.com/media/thumbs/big_5c5c209fbb9d2.jpg
65. (2022) AMBOSS GmbH: Kapitel Atemwege und Lunge. zitiert am: 31.01.2022
URL: <https://next.amboss.com/de/article/6o0j1S?q=atemwege%20und%20lunge#Zf123ed12924c4dfb05606243ba392c18>
66. (2022) AMBOSS GmbH: Kapitel Atemmechanik. zitiert am: 30.01.2022.
URL: <https://next.amboss.com/de/article/A60RnS#WKcP2W0>
67. (2022) *Immunohistochemistry Application Guide*. zitiert am: 12.03.2022
URL: <https://www.abcam.com/content/immunohistochemistry-the-complete-guide>

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen bedanken, ohne die das Verfassen meiner Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei **Univ.- Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ** bedanken, die es mir ermöglicht hat, meine wissenschaftliche Arbeit unter Ihrer Leitung am Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes verfassen zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich **Dr. rer. nat. Stephan Maxeiner** meinen besonderen Dank aussprechen, für seine hervorragende Betreuung, freundliche Unterstützung und für die Zeit, die er investiert hat, um mir mit Ideen und Ratschlägen als Betreuer zur Seite zu stehen. Vor allem mit Hilfe seiner fachlichen Expertise in Bezug auf das wissenschaftliche Arbeiten gelang mir die Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Seine stetige Erreichbarkeit und sein Zuspruch haben maßgeblich zur Umsetzung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich gerne bei der gesamten Arbeitsgruppe Krasteva-Christ, allen **wissenschaftlichen Mitarbeiter/ -innen und technischen Assistent/ -innen** bedanken, die mich freundlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben, mich mit produktiven Gesprächen hilfsbereit unterstützt und stets mit lieben Worten begleitet haben.

Zuletzt möchte ich bei dieser Gelegenheit meinen Eltern **Sandra** und **Michael Schmidt**, meiner Schwester **Kim Antje Schmidt**, meinen Großeltern **Jürgen** und **Ineke Kriena Schmidt** sowie meinen **Freunden** danken, die mich während des Studiums und auch während der Dissertation begleitet und mich bei jeglichen Zweifeln mit geduldigem Zuspruch stets zum Durchhalten ermutigt haben. Diese liebevolle und verständnisvolle Unterstützung hat besonders zur Fertigstellung meiner Dissertationsschrift beigetragen.

