

Aus dem Fachbereich 08 - **Biologie** und Chemie -
der Justus-Liebig-Universität Gießen
angefertigt am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung,
Bad Nauheim

**Die Rolle von Early Growth Response 1 bei der
Regulation von Timp1, Tenascin C und Elastin
während des kompensatorischen Lungenwachstums
und der postnatalen Alveolarisierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Peter Rauschkolb
aus Mainz

Gießen 2015

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn
Institut für Chemie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Lakes-Harlan
Institut für Tierphysiologie, FB 08
Abteilung Integrative Sinnesphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Giessen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Werner Seeger
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Lungenzentrum der Universität Gießen (UGMLC)
Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinikstraße 36, 35392 Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML) am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim in der Zeit von November 2009 bis Dezember 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Lakes-Harlan angefertigt. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. med. Werner Seeger und Prof. Dr. med. Robert Voswinckel bereitgestellt, unter deren Betreuung diese Arbeit entstand

Indes sie forschten, röntgten, filmten und funkten, entstand von selbst die köstlichste

Erfindung:

der Umweg als die kürzeste Verbindung zwischen zwei Punkten.

Erich Kästner

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	8
2	Einleitung	15
2.1	Anatomie und Physiologie der Lunge	15
2.1.1	Zelltypen der Lunge und Feinbau der Alveolen.....	17
2.2	Entwicklung der Lunge	20
2.2.1	Differenzierung des Lungengewebes	20
2.2.2	Alveolarisierung und postnatale Lungenentwicklung	23
2.3	Das kompensatorische Lungenwachstum	25
2.3.1	Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums.....	27
2.3.2	Molekulare Mediatoren des kompensatorischen Lungenwachstums	28
2.4	Die Extrazellulärmatrix.....	31
2.4.1	Die Extrazellulärmatrix der Lunge.....	33
2.4.2	Matrixmetalloproteinasen und deren endogene Inhibitoren	35
2.4.3	Das Extrazellulärmatrix-assoziierte Protein Tenascin C	39
2.4.4	Mechanotransduktion.....	41
2.5	Der Transkriptionsfaktor Early Growth Response 1 (Egr1)	43
2.6	Die Knockout-Maus	44
2.7	Ziele der Arbeit	46
3	Material & Methoden	48
3.1	Material	48
3.1.1	Laborgeräte	48
3.1.2	Chemikalien.....	52
3.1.3	Laborbedarfsartikel.....	53
3.1.4	Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka	55
3.1.5	Kulturmedien, Medienzusätze und Zelllinien	58
3.1.6	Kits und Standards	59
3.1.7	Oligonukleotide.....	59

3.1.8	Versuchstiere.....	63
3.2	Methoden.....	64
3.2.1	Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums.....	64
3.2.2	Versuchsgruppen	68
3.2.3	Messungen der Lungenfunktion.....	72
3.2.4	Stereologische Analysen.....	75
3.2.5	Molekularbiologische Methoden	85
3.2.6	Zellbiologische Methoden	97
3.2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	100
3.2.8	Statistische Analyse	104
4	Ergebnisse.....	105
4.1	Vergleichende Gen-Expressionsanalyse der Bestandteile elastischer Fasern während der murinen postnatalen Entwicklung (Alveolarisierung) und des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus	105
4.2	Extrazellulärmatrix-modulierende Faktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus	111
4.2.1	Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP 9 und 2) während des kompensatorischen Lungenwachstums.....	111
4.2.2	mRNA-Expression von MMP 9, Timp1 und Tenascin C während des kompensatorischen Lungenwachstums.....	112
4.3	Kompensatorisches Lungenwachstum in Timp1-defizienten Mäusen	114
4.4	Messung der Lungenfunktion bei Timp1 ^{-/-} Mäusen.....	118
4.4.1	Veränderte Zelleigenschaften von SAEC Zellen und primären Fibroblasten durch Timp1.....	119
4.5	Kompensatorisches Lungenwachstum in TnC-defizienten Mäusen	120
4.6	Messung der Lungenfunktion bei TnC ^{-/-} Mäusen.....	124
4.7	Einfluss einer mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene	126
4.8	Expressionsanalyse von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus	127
4.8.1	Expressionsanalyse von Egr1 und TnC in der murinen postnatalen Entwicklung (Alveolarisierung)	129

4.9	Einfluss einer Deletion des Gens für Egr1 auf die mechanische Stimulation der mRNA-Expression der untersuchten Gene	131
4.10	Analyse der Expression von Elastin in primären Egr1 ^{-/-} Fibroblasten	132
4.11	Expression von Bestandteilen elastischer Fasern während des kompensatorischen Lungenwachstums in Egr1-defizienten Mäusen	133
4.12	Expression von TnC und Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums in Egr1-defizienten Mäusen	134
4.13	Einfluss einer Deletion des Gens für Egr1 auf das kompensatorische Lungenwachstum der Maus	135
5	Diskussion	140
5.1	Die Expression der Bestandteile elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums und der postnatalen Alveolarisierung	141
5.2	Matrixmetalloproteinase 9 und Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums	145
5.3	Tenascin C (TnC) während des kompensatorischen Lungenwachstums	151
5.4	Early Growth Response 1 (Egr1) während des kompensatorischen Lungenwachstums	157
5.5	Ausblick	167
6	Zusammenfassung	169
7	Summary	171
8	Literaturverzeichnis	173
9	Abbildungsverzeichnis	189
10	Tabellenverzeichnis	192
11	Anhang	194
12	Eidesstattliche Erklärung	199
13	Danksagung	200
14	Lebenslauf	201
15	wissenschaftliche Beiträge	202

1 Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
%	Prozent
Δ	Delta, Differenz
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen
AF	Atemfrequenz
ALI	<i>Acute lung injury</i> (akute Lungenverletzung)
ANOVA	analysis of variance Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Compliance
ca.	circa
CaCl_2	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cdc20	<i>Cell division cycle 20 homolog</i> (Zelldivisionszyklus 20 homolog)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_{dyn}	dynamische Compliance
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
cmH_2O	Zentimeter Wassersäule
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Col	Kollagen

COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Ct bzw. C ^T	<i>cycle threshold</i> (Schwellenzyklus)
D	Tag
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EBS	Egr1-Bindesequenz
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)
Egr1	<i>Early growth response 1</i> (frühe Wachstumsantwort 1)
ERK	<i>Extracellular signal-related kinases</i> (Extrazellulärsignal-verwandte Kinasen)
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
EZM	Extrazellulärmatrrix
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Käberserum)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
For	<i>forward</i> (vorwärts)
FVC	forcierte Vitalkapazität
G	Gauss
G	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> (Hepatozyten Wachstumsfaktor)
Hz	Hertz
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
ID	Identifikationsnummer
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
IP	Inositoltriphosphat
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
IVC	<i>Individually ventilated cages</i> (Individuell ventilierte Käfige)
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> (Keratinozyten Wachstumsfaktor)
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
ko	knockout
KOH	Kaliumhydroxid
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
log	Logarithmus
L _T	Länge einer Testlinie
LTBP	Latentes Tgfβ-Bindungsprotein
m	Meter
M	molar

m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
MAGP	Matrix-assoziiertes Glykoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
min ⁻¹	Frequenz pro Minute
ml	Milliliter
Mm	Milimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
Mut	Mutant
MW	Mittelwert

N	Anzahl der Messungen/ Proben
N.	<i>Nervus</i> (Nerv)
N/A	<i>Not applicable</i> (nicht zutreffend)
N ₂	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NAB	NGFI-A-bindendes Protein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg.	negativ
NFKB	Nukleärer Faktor KB
Ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Nerven-Wachstumsfaktor)
NGFI-A	<i>Nerve growth factor induced clone A</i>

	(Nerven-Wachstumsfaktor induzierter Klon A) bzw. Egr1
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
N _v	Anzahl von Objekten innerhalb eines Volumens
O ₂	Sauerstoff
P	Druck
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> (Blutplättchen-stämmiger Wachstumsfaktor)
pFB	primäre Fibroblasten
pH	Oxoniumionenkonzentration
PH	pulmonale Hypertonie
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	pikomolar
PNX	Pneumonektomie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	<i>parts per million</i> (Teile von einer Million)
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
R	Resistance
rev	<i>Reverse</i> (Rückwärts)
RIPA	Radioimmunoprecipitations Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>

	(Umdrehungen pro Minute)
RQ	relative Quantität
RT	Reverse Transkription
S	Septum/ alveolare Oberfläche
s.c.	subkutan
SAEC	<i>Small airway epithelial cells</i> (distale Atemwegs Epithelzellen)
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sek	Sekunde
SEM	<i>Standard error of mean</i> (Standardfehler)
Sham	imitiert
SMA	<i>smooth muscle actin</i> (Glattmuskelaktin)
SPC	Surfactant protein C
SRE	<i>Serum response element</i> (Serum-reagierendes Element)
SRF	<i>Serum Response Factor</i> (Serum-reagierender Faktor)
SURS	<i>systematic uniform random sampling</i> (systematisch einheitlich zufällige Probenziehung)
T	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>tris buffered saline with tween</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tgf β	<i>Transforming growth factorβ</i> (transformierender Wachstumsfaktor β)
Timp1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i> (Gewebeinhibitor der Metalloproteinasen 1)
T _m	Schmelzpunkt
TnC	Tenascin C
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
t _{sept}	alveolare Septendicke
TTF1	Thyroid Transkriptionsfaktor

TV	<i>tidal volume</i> (Atemzugvolumen)
u	units
U	Umdrehungen
u.a.	und andere
V	Volt oder Volumen
V.	<i>Vena</i> (Vene)
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (vaskular endothelialer Wachstumsfaktor)
V_{lung}	Lungenvolumen
Vol. %	Volumenprozent
vs.	gegen
V_v	Volumenfraktion
W	Watt
w/v	Gewicht (<i>weight</i>) pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

2 Einleitung

2.1 Anatomie und Physiologie der Lunge

Als größtes Organ unseres Körpers ist die Lunge die effektivste Lösung für eines der schwierigsten Probleme, die Lebewesen mit einem großen Körper zu überwinden hatten: Durch die Bereitstellung einer ausreichenden Oberfläche auf kleinstem Raum ermöglicht sie einen adäquaten Gasaustausch, der für die Aufrechterhaltung aller lebensnotwendigen Prozesse essentiell ist [1].

Diese Oberfläche gewährleistet die Aufnahme des zur Energiegewinnung nötigen Oxidans Sauerstoff (O_2), als auch die Abgabe des Stoffwechselprodukts Kohlenstoffdioxid (CO_2). Dabei besteht zumindest bei Säugetieren eine lineare Beziehung zwischen der respiratorischen Oberfläche und der Sauerstoffaufnahme [2].

Die Struktur der Lunge variiert zwar unter den verschiedenen Vertebratenspezies bezüglich ihrer Komplexität, aber die Position entlang des Vorderdarms, ventral des Ösophagus zwischen Schilddrüse und Magen, ist hoch konserviert. Lungen sind räumlich stets entlang der cephalo-caudalen und dorsal-ventralen Achse vorzufinden [3]. Als sackartiges Organ ist die Lunge von Säugetieren (*Mammalia*) in die Brusthöhle (*Cavitas thoracis*; Thorax) eingebettet und liegt dem Zwerchfell (*Diaphragma*) auf. Dabei wird die Lunge durch das Brustfell (*Pleura*) und den Pleuraspalt vom Thorax abgegrenzt [4]. Als einschichtige, plattenepithelartige Grenzstruktur kleidet sie als *pleura parietalis* die Thoraxwände aus, schlägt am Hilus als auch am *Ligamentum pulmonale* um und überzieht als *Pleura visceralis* die Lunge [5]. Die typische Säugerlunge ist paarig aufgebaut und ist zunächst in einen rechten und linken Lungenflügel (*Pulmo dexter* und *Pulmo sinister*) unterteilt. Beide Lungenflügel gliedern sich weiter in asymmetrisch angeordnete Lungenlappen (*Lobi*) auf [3, 6]. Beim Menschen besteht der rechte Lungenflügel aus drei Lobi (*Lobus superior*, *Lobus medius*, *Lobus inferior*) und der linke Lungenflügel aus dem *Lobus superior* und *Lobus inferior*. Im Vergleich zur humanen Lunge wird die Lunge der Maus ebenfalls aus fünf Lungenlappen gebildet, allerdings setzt sich der rechte Lungenflügel aus vier Lappen (dem *Lobus cranialis*, *medialis*, *caudalis* und *accessorius* (kardialer Lappen) zusammen, wobei der linke Lungenflügel nur aus einem Lobus besteht. Da auf der linken Körperseite das Herz Raum einnimmt, ist im Allgemeinen der linke Lungenflügel kleiner als der Rechte [7, 8].

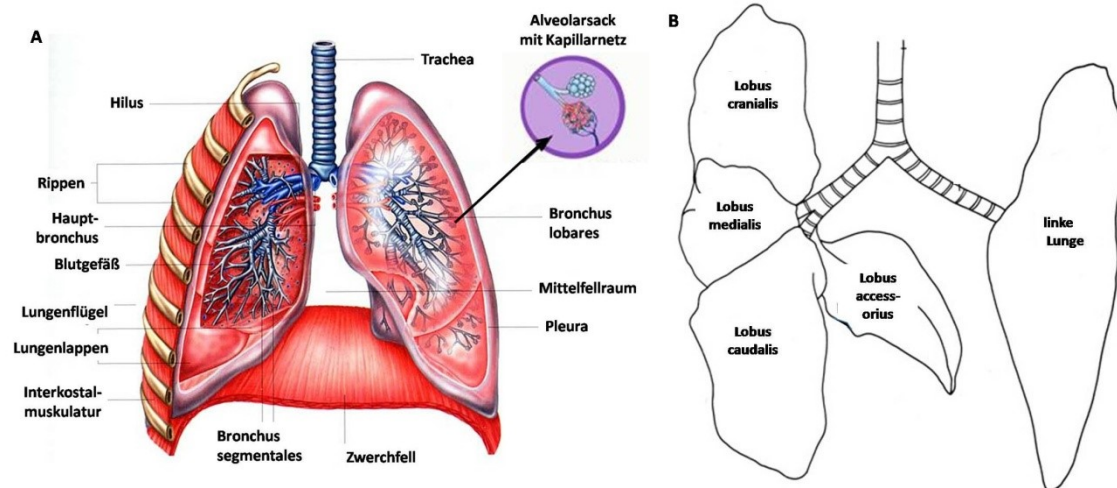


Abbildung 2.1: schematische Darstellung der Lunge

A) schematische Darstellung der humanen Lunge und ihre Unterteilung

B) schematische Darstellung der Lungenlappen der Maus
modifiziert nach [9]

Als apikaler Teil der Lunge verbindet die atemluftleitende Luftröhre (Trachea) mit ihren hyalinen Knorpelspangen den Kehlkopf mit dem Bronchialsystem. Von ihr ausgehend verästelt sich das Bronchialsystem zunächst in zwei Hauptbronchien (*Bronchi principales*), woraus weitere luftleitende Bronchien (*Bronchi lobares*) hervorgehen, die jeweils die Lungenlappen mit Luft versorgen. Dem fraktalen Aufteilungsmodus des Bronchialbaumes folgend, bilden die Lungensegmente (*Segmenta bronchopulmonalia*) die nächste Gliederungseinheit der Lunge. Jedes Segment der Lunge wird dabei von einem Segmentbronchus (*Bronchi segmentales*) versorgt und durch schmale Bindegewebssepten (*Septa interlobularis*) eingegrenzt (Abbildung 2.1). Dies verleiht jedem Segment eine polygonale Form, welche auf der Lungenoberfläche sichtbar ist. Die Segmentbronchien sind der Ursprung der Bronchiolen, welche die nächste Untereinheit einer Lunge – die *Lobuli pulmonales* – mit Luft versorgen. Die 14. Verzweigung des dichotomen Bronchialsystems ist die der Bronchiolen in die terminalen Bronchien (*Bronchioli terminales*). Die Gesamtheit des bisher erwähnten Bronchialbaumes wird als konduktiver Teil der Lunge oder als anatomischer Totraum bezeichnet, da dieser Teil ausschließlich zum Transport der Atemluft dient [10]. Ab der durchschnittlich 15. Verzweigung der Bronchialstruktur beginnt mit den respiratorischen Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*), das respiratorische System der Lunge. Über dessen Oberfläche findet der Gasaustausch zwischen dem Blut eines Organismus und der Umgebungsluft statt. Mit den Alveolargängen (*Ductuli alveolares*), welche sich in blind endenden Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) öffnen, erfolgt die finale Aufteilung des luftleitenden Systems einer Lunge. Die Wände der Alveolarsäckchen werden hierbei aus Lungenbläschen (Alveolen, *Alveoli pulmonales*) gebildet, welche zusammen mit allen Alveolen, die aus einer terminaler Bronchiole entspringen, als kleinste respiratorische Einheit (Acinus) bezeichnet werden [11]. Aufgrund dieser Architektur der Lunge steht beispielsweise dem Menschen eine etwa 100 m² große

Oberfläche für den Gasaustausch von O_2 und CO_2 zur Verfügung, was der Fläche eines Tennisplatzes entspricht [10].

Für einen effektiven Gasaustausch ist allerdings nicht nur die Belüftung (Ventilation) sondern ebenfalls die Durchblutung der Lunge (Perfusion) entscheidend. Bis es zu einem Gasaustausch zwischen den Alveolen und dem Blut kommt, muss die Lunge zunächst durch Einatmen (Inspiration) mit Luft gefüllt werden. Dies geschieht durch Kontraktion der Zwischenrippenmuskeln (Interkostalmuskulatur) und des Zwerchfells. Hierdurch erweitert sich der Thorax und das Zwerchfell senkt sich in Richtung des Abdomen ab, was zu einer Erhöhung des Thoraxvolumens führt [12]. Aufgrund des im Thorax herrschenden Unterdrucks folgt die Lunge passiv der Erweiterung der Brusthöhle und vergrößert somit ebenfalls ihr Volumen. Hierdurch füllen sich die Lungen gemäß der Druck-Volumen-Beziehung des Boyle-Mariotteschen Gesetzes mit Luft und der darin enthaltene Sauerstoff (20,9 %) wird mittels Konvektion über den konduktiven Teil des Bronchialsystems bis zu der respiratorischen Oberfläche – den Alveolen – geleitet [13]. Dort erfolgt der eigentliche Gasaustausch von O_2 und CO_2 durch passive Diffusion aufgrund unterschiedlicher Partialdrücke. Die Alveolen sind hierfür von einem feinen Netzwerk von Kapillaren umspannt. Durch die sequentielle Anordnung der Alveolen eines Acinus werden diese in Serie ventiliert, aber aufgrund der Architektur des umliegenden Blutgefäßsystems parallel durchblutet [10]. Hierdurch wird sichergestellt, dass der Partialdruck des Sauerstoffs des Blutes an jeder Alveole immer niedriger ist, als der O_2 -Partialdruck der eingeatmeten Luft. Da Gase stets von Arealen mit einem hohen Partialdruck in Areale mit niedrigerem Partialdruck diffundieren (Fick'sches Gesetz) wird das im Verhältnis sauerstoffarme Blut mit O_2 angereichert. Gleichzeitig diffundiert CO_2 aus dem Blut in die mit Luft gefüllten Alveolen, da der CO_2 -Partialdruck des Blutes höher ist als der Partialdruck der eingeatmeten Luft [12]. Mit dem Ausatmen (Expiration) nimmt bis zur nächsten Inspiration frischer Luft der Gasaustausch ab. Durch den gedehnten Thorax und die darin gespeicherte Energie der elastischen Verformung nach der Inspiration, ist die Expiration ein passiver Vorgang und erfordert in der Regel keine Kontraktion von Muskeln. Nach jedem Atemzug, verbleibt dabei ein Residualvolumen an Luft in der Lunge, um ein Kollabieren der Alveolen oder der gesamten Lunge zu verhindern [6, 12, 13].

2.1.1 Zelltypen der Lunge und Feinbau der Alveolen

Die zelluläre Beschaffenheit der Lunge variiert entlang ihrer proximo-distalen Achse und im Laufe der Evolution bildeten sich Regionen mit bestimmten Funktionen aus [14]. So bestehen die tracheobronchialen Regionen einer Lunge aus einem pseudostratifiziertem Epithelium, das sich aus Basalzellen, Flimmerzellen und sekretorisches (Clara)-Zellen zusammensetzt (Abbildung 2.2 A). Die Basalzellen sind relativ undifferenzierte Zellen und haben vorwiegend

eine strukturelle Rolle. Zum Beispiel sind sie wichtig für die Anlagerung anderer Zelltypen in den tracheobronchialen Regionen und interagieren aufgrund ihrer zentralen Position mit anderen Zellen (Immunzellen, mesenchymale Zellen) [15]. Die Flimmerzellen sind unter anderem zusammen mit den sekretorischen Zellen für die so genannte mukozilliäre Reinigung der Lunge verantwortlich. Die Population der sekretorischen Zellen ist sehr heterogen und deren Subtypen werden oft sehr ungenau als Clara-Zellen verallgemeinert. Dennoch produzieren und sekretieren all diese Zellen die schleimähnlichen Glykoproteine [16], an denen auch Fremdstoffe haften bleiben. Die Flimmerzellen sind mit haarförmigen Strukturen (Zilien) besetzt, die durch koordinierte Bewegungen den Schleim in Richtung Rachen (Pharynx) transportieren. Flimmer- sowie sekretorische Zellen sind ebenfalls Bestandteil des einschichtigen kubischen Epitheliums der intralobaren Bronchiolen. Weiterhin sind Becherzellen (Goblet-Zellen) Teil dieses Epitheliums (Abbildung 2.2 B). Hierbei handelt es sich um Drüsenzellen, welche vermutlich von Clara-Zellen abstammen [17]. Diese Zellen produzieren und scheiden Mukus aus, welcher für die mukozilliäre Selbstreinigung der Lunge eine wichtige Rolle spielt, da dort beim Atmen inhalierte Mikroorganismen und Partikel haften bleiben und wie bereits beschrieben mittels Flimmerzellen in Richtung Mund transportiert und abgehustet werden [14]. Es ist zu erwähnen, dass Goblet-Zellen in einer recht großen Anzahl in der menschlichen Lunge vertreten sind, allerdings nur sehr spärlich bei Labormäusen, die unter pathogenfreien Bedingungen gehalten werden [18, 19]. Auch reicht das pseudostratifizierte Epithelium des Menschen bis in tiefere Regionen der Lunge (distale Luftwege < 0,5 mm) verglichen mit dem der Maus [20, 21]. Neuroendokrine Zellen sind ebenfalls gruppenförmig (NEB; Neuroendothelial bodies) in den intralobulären Atemwegen und vereinzelt auch in den proximalen Atemwegen vorzufinden, wobei dieser Zelltyp für die Rezeption bestimmter Stimuli (z.B. Hypoxie, Nikotin) verantwortlich ist und einen Einfluss auf die Ventilation und Perfusion der Lunge als auch auf Epithel- und Immunzellen zu haben scheint [22].

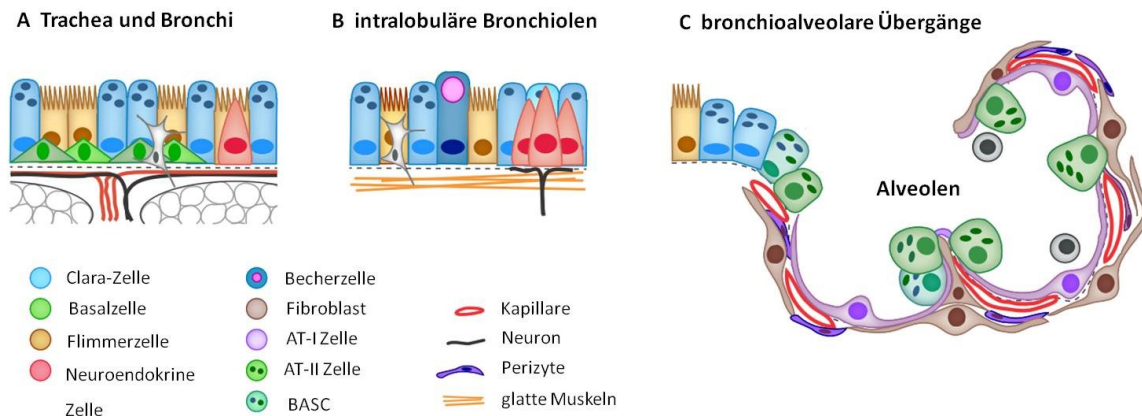


Abbildung 2.2: Zelltypen der Lunge

Modifiziert nach Rock et al.[14]

Drei hochspezialisierte Zellpopulationen sind in den bronchioalveolaren Regionen der Lunge und in den Alveolen selbst vorzufinden (Abbildung 2.2 C) [23]. Obwohl der Anteil der dort vorkommenden alveolaren Typ I Epithelzellen (AT1; Pneumozyt Typ I) lediglich 8 % der Gesamtzellzahl der Lunge beträgt, bedeckt dieser Zelltyp der Alveolen ca. 95 % der gesamten Oberfläche der Lunge [24], da über diese squamosen oder sehr flachen Epithelzellen der Gasaustausch stattfindet. Sie sind voll ausdifferenziert, teilungsunfähig und wichtig für den Flüssigkeit- und Ionentransport der Lunge [25]. Kubische alveolare Typ II Epithelzellen (ATII; Pneumozyt Typ II), die meist in den Ecken von Alveolen angesiedelt sind, sollen die Fähigkeit besitzen, in AT-I-Zellen ausdifferenzieren zu können [26]. Eine der wichtigsten Aufgaben dieser Zellen für eine normale Lungenfunktion ist jedoch die Produktion und Sekretion von pulmonalem Surfactant. Diese grenzflächenaktive visköse Substanz besteht aus Phospholipiden, Neutrallipiden (Cholesterinester) und Proteinen. Sie bedeckt die Oberfläche der Alveolen und senkt die Oberflächenspannung herab, wodurch die Atemarbeit/Gasaustausch erleichtert, eine korrekte Verteilung der Luft sowie ein Kollaps von Alveolen verhindert wird [27]. Weiterhin ist dieser Zelltyp als Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr zu sehen und bewerkstelligt wie AT I Zellen den Flüssigkeit- und Ionentransport [23]. In einer sehr geringen Zahl ist an den bronchioalveolaren Übergängen ein weiterer epithelialer Zelltyp vorzufinden. Diese so genannten Bronchioalveolaren Stammzellen (BASC) exprimieren verschiedene Proteine, welche normalerweise spezifisch für bestimmte pulmonale Epithelzellen (AT I-II, Clara Zellen) sind, weshalb diskutiert wird, ob es sich hierbei um Stammzellen handelt [28]. Über die mutmaßlichen Funktionen dieser Zellen ist jedoch bisher nur wenig bekannt. Allen alveolaren Epithelzellen ist gemein, dass sie stets mit mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Pericyten) assoziiert sind [14]. Spindelförmige interstitielle Fibroblasten bilden dabei ca. 30-40 % der Gesamtzellpopulation einer humanen Lunge und synthetisieren das Extrazellulärmatrix-Gerüst der Alveolen [24]. Darüber haben sie einen profunden Einfluss auf den epithelialen Phänotyp [29]. Fibroblasten

können sich stark in ihrer Genexpression als auch in ihren funktionellen Phänotypen unterscheiden, wobei der Ursprung und die Transitionen zu diesen mutmaßlichen Subfibroblastentypen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Dennoch ist eindeutig erwiesen, dass bestimmte Fibroblasten (z.B. Lipofibroblasten, Myofibroblasten) eminent wichtig für die Lungenentwicklung und die Homöostase der Lunge sind [23, 30]. Wie bereits erwähnt, bilden Fibroblasten die Matrix, in der die alveolaren Zellen eingebettet sind. Diese besteht aus einem dichten Netzwerk elastischer- und kollagener Fasern und bildet mit dem Kapillarnetzwerk, weiterem Bindegewebe (Glycane) und den alveolaren Epithelzellen eine Alveole, deren Wände auch als *Septum interalveolare* bezeichnet werden. Die elastischen Fasern, die besonders rund um alveolare Öffnungen verdichtet sind, verleihen den Alveolen Elastizität und schützen sie bis zu einem gewissen Grad vor einer Überdehnung [31]. Beim Menschen beträgt der alveolare Wanddurchmesser 0,15 – 0,6 mm. Im Verhältnis fallen alveolare Septen bei Mäusen dicker aus, allerdings ist diese nur scheinbar, da der murine Durchmesser der Kapillaren verhältnismäßig größer ausfällt und weiterhin zahlreiche lymphoide und lymphozytäre Zellen in ihr eingelagert sind. Für eine detailliertere Darstellung der Extrazellulärmatrix, dessen Funktion und Bestandteile sei auf das Kapitel 2.4.1 verwiesen.

2.2 Entwicklung der Lunge

Die Morphogenese der Lunge erfordert eine koordinierte Abfolge von Prozessen, damit nach der Geburt eine funktionierende und ausreichend große Blut-Luft-Schranke für den Gasaustausch zur Verfügung steht.

2.2.1 Differenzierung des Lungengewebes

Obwohl die Entwicklung der Lunge ein kontinuierlicher Prozess ist, kann sie bei Säugetieren grob in fünf Entwicklungsstadien eingeteilt werden, wobei jede ihre anatomischen und histologischen Charakteristika aufweist [32, 33].

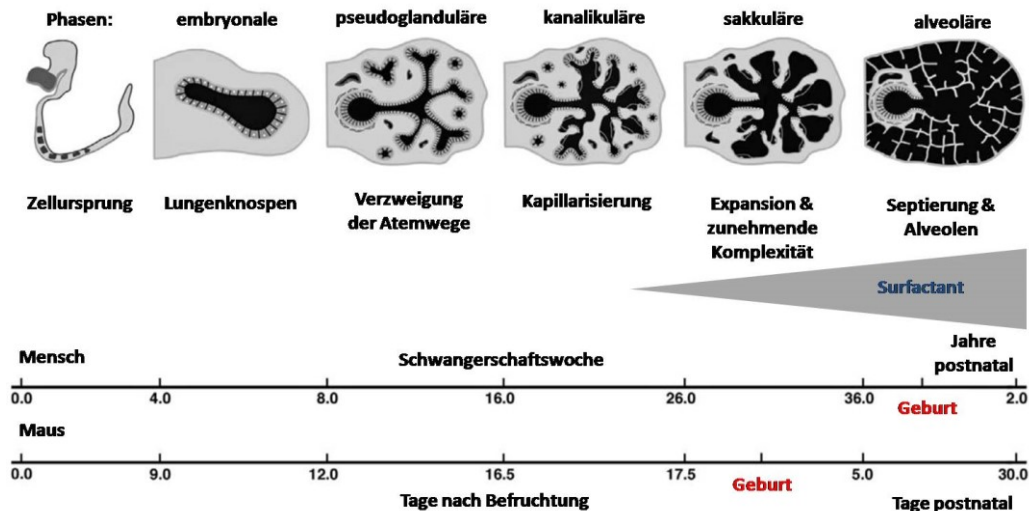


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der fünf Phasen der Lungenentwicklung und ihre zeitliche Abfolge bei Mensch und Maus.

Abfolge der humanen und murinen Lungenentwicklung und ihre Einteilung in fünf Phasen: Embryonale, pseudoglanduläre, kanalikuläre, sakkuläre und alveoläre Phase. Die Bildung und Sekretion von Surfactant setzt zum Ende der kanalikulären Phase ein. Bei Mäusen erfolgt die Geburt nach 20 embryonalen Entwicklungstagen (rot). Mäuse werden in der sakkulären Phase geboren. Beim Menschen erfolgt die Geburt in der 38. Woche (rot). Der Embryo befindet sich in der alveolären Phase. Modifiziert nach Kimura et al. [33]

2.2.1.1 Die embryonale Phase

Der embryonale Ursprung der Lunge ist der ventrale Teil des Vorderdarms aus dem sich ebenfalls die Leber, der Pankreas, die Bauchspeicheldrüse und der Gastrointestinaltrakt entwickeln. Aus diesem noch undifferenzierten Epithel endodermalen Ursprungs entsteht später die epitheliale Auskleidung der luftleitenden Atemwege (Kehlkopf, Luftröhre, Bronchien), des Drüsengewebes sowie der Alveolen. Bindegewebe, Muskulatur als auch die Blutgefäße gehen aus den umliegenden Zellen hervor, die aus dem Mesoderm stammen. Durch sukzessive epitheliale-mesenchymale Interaktion als auch einer Proliferation der Zellen endodermalen Ursprungs entwickeln sich die beiden Lungenknospen aus der primitiven Lungenanlage. Gleichzeitig zu diesem Prozess trennt sich die Trachea vom Ösophagus (Speiseröhre). Bereits in dieser frühen Phase der Entwicklung ist schon die links-rechts Asymmetrie der Lungenflügel erkennbar. Mit der Entwicklung der noch primitiven Pleurahöhle differenzieren sich die Lungenknospen weiter aus, bis die Hauptbronchien entstanden sind [33, 34]. Nach einer weiteren Teilung der Knospen entstehen zunächst Lappenbronchien, aus denen sich die einzelnen Lungenlappen differenzieren. Beim Menschen kommt es zu einer Ausbildung von drei rechten- und zwei linken Lappenknospen. Bei der Maus bilden sich hingegen rechts vier und links nur eine Knospe bzw. spätere Lungenlappen aus. Nach weiteren dichotomen Teilungen und der Elongation der jeweiligen Knospen endet die embryonale Phase der Lungenentwicklung, nachdem alle Lappen- und Segmentbronchien

sowie deren primitiven proximalen Blutgefäße angelegt sind [33, 35]. Die folgenden vier Phasen werden ebenfalls als fetale Lungenentwicklung bezeichnet.

2.2.1.2 Die pseudoglanduläre Phase

In dieser Phase ähnelt die Lunge histologisch einer tubulo-azinösen-Drüse, woher auch der Name dieser Phase entstammt (pseudoglandulär: drüsenähnlich). Die Bronchialsprossen sind dabei von einer dicken Mesenchymschicht umgeben, welche weitere dichotome Teilungen induziert bis der gesamte luftleitende Teil der Lunge inklusive der terminalen Bronchiolen ausgebildet sind [36]. Neben der Bildung von Knorpelgewebe und glatter Muskulatur durch mesenchymalen Zellen, beginnen die proximalen Epithelzellen sich in Flimmerzellen, sekretorische und neuroendokrine Zellen auszdifferenzieren [37]. Mit der Sprossung von undifferenzierten tubulären Epithelknospen aus den terminalen Bronchiolen wird die nächste Phase der Lungenentwicklung eingeleitet.

2.2.1.3 Die kanalikuläre Phase

Die kanalikuläre Phase der Lungenentwicklung beginnt mit Sprossung bzw. Ausbildung der *Canaliculi* aus den Enden der terminalen Bronchiolen (2.2.1.2). Aus diesen Strukturen wird das gasaustauschende Parenchym der Lunge entwickelt. Dabei kommt es zunächst zu dichotomen Längsteilungen der Aussprossungen, woraus zwei bis drei Generationen respiratorischer Bronchiolen hervorgehen. Diese respiratorischen Bronchiolen sind dann der Ursprung weiterer Generationen von Tubuli [38]. Parallel hierzu nimmt die Vaskularisierung stark zu. Kapillare lagern sich an die Tubuli an und Gefäße kanalisieren das Lungenparenchym. Aus einer Abflachung des kubischen Epithels bilden sich schließlich terminale Sacculi aus, welche durch Primärsepten voneinander getrennt sind und erste primitive Strukturen des Gasaustausches darstellen. Durch interzelluläre Kontakte und parakrine Mechanismen kommt es erstmals zur einer noch nicht genau verstandenen Differenzierung von alveolaren Typ II Epithelzellen und alveolaren Typ I Epithelzellen [14, 37].

2.2.1.4 Die sakkuläre Phase

Die sakkuläre Phase der Lungenentwicklung zeichnet sich durch ausgeprägte Wachstumsprozesse aller bisher entwickelten Strukturen aus. Nach weiteren dichotomen Teilungen kommt es zu einer massiven Vergrößerung des Lungenparenchyms, welches endständig aus dünnwandigen Sacculi besteht. Gleichzeitig zur Expansion der peripheren Lufträume wird das umliegende Mesenchym reduziert, wodurch sich das noch doppelschichtige Kapillarnetz immer mehr den Lufträumen nähert [35]. Weiterhin

differenzieren die Zellen der distalen und proximalen Lungen immer weiter zu den lokal spezifischen Zelltypen aus (2.1.1) und AT-II Zellen beginnen mit der Bildung des oberflächenaktiven Surfactants [33, 38]. Mit der Bildung der transitorischen Luftwege (Sacculi) ist der Prozess der zumeist dichotomen Aufzweigung (engl.: *branching*) abgeschlossen. Die weitere Unterteilung der Lunge in kleinere respiratorische Einheiten (Alveolen) bzw. die Vergrößerung der Gasaustauschfläche wird anschließend ausschließlich mittels Septierung erreicht [39, 40].

2.2.1.5 Die alveoläre Phase

In der alveolären Phase vergrößert sich die vom Parenchym bedeckte Oberfläche nochmals erheblich. Es kommt zur finalen Bildung der Alveolen, die mit ihren Wänden die Blut-Luft-Schranke bzw. die Gasaustauschfläche bilden. Dies geschieht durch das Auswachsen von sekundären Septen aus den zuvor gebildeten Primärsepten. Durch diese Septierung wird das doppelte Kapillarnetz einschichtig [39, 41]. Der Prozess der Alveolarisierung dauert bis nach der Geburt an [40]. Bezüglich der Zeitpunkte der einzelnen Phasen in der Entwicklung sowie der zeitlichen Unterschiede zwischen Mensch und Maus sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

2.2.2 Alveolarisierung und postnatale Lungenentwicklung

Die Alveolarisierung stellt eine sehr wichtige Phase in der Entwicklung dar, weil durch sie zwischen Geburt und Erwachsenenalter die Oberfläche für den Gasaustausch nochmals um ungefähr den Faktor 20 vergrößert wird. Der Entwicklungsstand der Lunge bei der Geburt unterscheidet sich sehr stark unter den Vertebratenspezies [41]. Bei Ratte und Maus existieren vermutlich keine echten Alveolen vor der Geburt und die Septierung bzw. die Alveolarisierung findet wahrscheinlich ausschließlich postnatal statt [42-45]. Die humane Alveolarisierung beginnt schon Wochen vor der Geburt. Die genaue Anzahl der voll ausgebildeten Alveolen am Tag der Geburt schwankt bei verschiedenen Publikationen zwischen null und 50 Millionen [46-49]. Da allerdings eine adulte humane Lunge mehr als 300 Millionen Alveolen aufweist, ist die eigentliche Alveolarisierung auch beim Menschen klar als postnataler Entwicklungsschritt anzusehen, so dass zum Zeitpunkt der Geburt die Lunge mehr dem „sakkulären Typ“ entspricht (2.2.1.4) [41].

Dies bedeutet, dass der überwiegende Teil der (primären) Septen noch verdickt und deren zentral liegende Bindegewebsschicht noch beidseitig von einem kapillaren Netzwerk umgeben ist. Diese Strukturen der Primärsepten repräsentieren den Ausgangspunkt der Alveolarisierung. Zu Beginn dieses Prozesses erheben sich an diesen Septen viele kleine Wölbungen, die durch die Faltung von einer der beiden kapillaren Schichten hervorgerufen

wurden. Dabei handelt es sich um die beginnende Bildung von sekundären Septen bzw. um zukünftige interalveoläre Wände. Für die Bildung oder Ausstülpung der sekundären Septen scheint das Vorhandensein intakter elastischer Fasern als auch spezifischer Fibroblasten enorm wichtig zu sein. Im Falle einer Fehlbildung der elastischen Fasern oder einer nicht korrekten Ausdifferenzierung der Fibroblasten, bleibt eine Alveolarisierung aus. Dies hat meist letale Folgen [50-53]. Die Bildung sekundärer Septen tritt zunächst als so genannte Massenalveolarisierung (engl.: *bulk alveolarization*) auf. Ab einem gewissen speziesspezifischen Zeitpunkt der Alveolarisierung kommt es hierbei zu einer sehr schnellen und massenhaften Bildung der Sekundärsepten. Allerdings sind diese zunächst noch unreif und bestehen wie die primären Septen noch aus einer kapillaren Doppelschicht [44, 46]. Die alveolaren Wände adulter Lungen bestehen allerdings nur aus einem einschichtigen Kapillarnetz, welches sich um eine dünne axiale Schicht aus Bindegewebe windet. Hierzu untergehen die Septen noch eine mikrovaskuläre Maturation. Bei dieser strukturellen Differenzierung verschmelzen die zwei Kapillarschichten zu einem einschichtigen Kapillarsystem. Weiterhin wachsen bzw. dehnen die interalveolaren Wände sich in die Länge und die Zahl der interstitiellen Fibroblasten nimmt ab. Dies führt zu einer weiteren Reduktion der Septendicke, was den Gasaustausch weiter optimiert [41] (Abbildung 2.4 A).

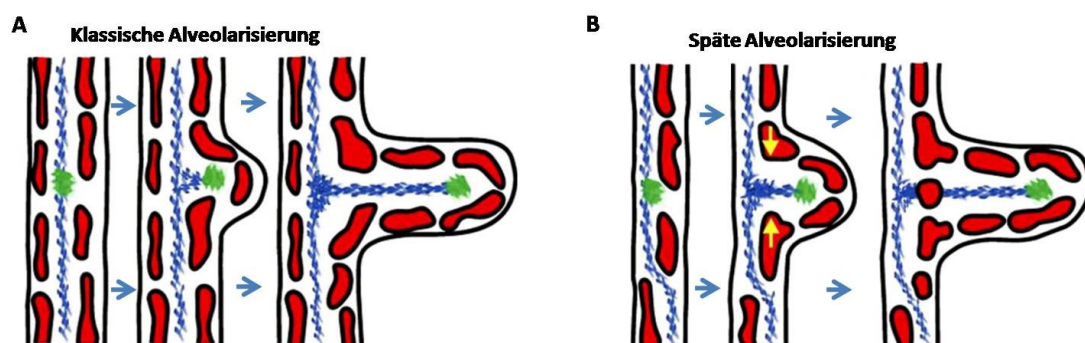


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der klassischen Alveolarisierung und der späten Alveolarisierung

Bei der klassischen Alveolarisierung (A) erheben sich neue Septen aus unreifen Septen mit einer kapillaren Doppelschicht. Neue Septen erheben sich bei der späten Alveolarisierung (B) aus reifen Septen mit einem einschichtigen Kapillarnetz. Die zweite kapillare Schicht entsteht durch Angiogenese an der Basis der neuen Septe. Bei beiden Modellen faltet sich die kapillare Schicht auf und bildet ein doppelschichtiges Kapillarnetz innerhalb der neuen Septe (grün: Fibroblasten, elastische Fasern und Kollagenfibrillen; blau: Bindegewebe; rot: kapillares Netz; modifiziert nach Schittny et al. [40]).

Neben dieser klassischen Alveolarisierung oder Entwicklungsalveolarisierung, die eine kapillare Doppelschicht zur Bildung neuer Alveolen voraussetzt, mehren sich die Hinweise, dass neue Alveolen auch aus einem einschichtigem adulten Kapillarnetz gebildet werden können (Abbildung 2.4 B) [40, 54, 55]. Diese späte Alveolarisierung (engl.: *late alveolarization*) deutet darauf hin, dass eine zuvor ausgeschlossene Neubildung von Alveolen doch bis in das

Erwachsenenalter möglich ist und Alveolen nicht nur während der Entwicklung gebildet werden können. Durch eine lokale Duplikation der einschichtigen Kapillaren vollausgebildeter sekundärer Septen, soll diese Neubildung von Alveolen möglich sein [40]. Auch bei dem kompensatorischen Lungenwachstum nach Pneumonektomie ist eine Neubildung von Alveolen in der verbliebenen Lunge zu beobachten [56-58]. Jedoch ist nicht klar, ob es sich hierbei um die gleichen Mechanismen, wie bei der späten Alveolarisierung, handelt.

2.3 Das kompensatorische Lungenwachstum

Bereits im Jahr 1881 wurde bei Hunden und Kaninchen dokumentiert, dass ein Verlust von Lungengewebe nach Pneumonektomie (PNX) durch die verbliebene Lunge kompensiert werden kann [59]. Bei Pneumonektomie handelt es sich um einen chirurgischen Eingriff, bei dem der gesamte Lungenflügel am Hauptbronchus ligiert und entfernt wird. Ein solcher Verlust an Lungengewebe bedeutet verständlicherweise auch eine Reduktion der Alveolenzahl sowie der für den Gasaustausch nötigen vaskulären Strukturen. Eine Folge davon ist eine Verminderung der Diffusionskapazität und somit der Fähigkeit zum Gasaustausch. Um dies zu kompensieren und weiterhin einen adäquaten Gasaustausch aufrecht erhalten zu können, stellen sich anatomische als auch physiologische Anpassungen ein [60]. Zunächst kommt es unmittelbar nach einer PNX zu einer Ausschöpfung der physiologischen Reserven der verbliebenen Lunge. Durch die Entfernung eines Teils der Lunge (Lobektomie) bzw. eines gesamten Lungenflügels wird die verbliebene Lunge stärker durchblutet. Der entstandene Freiraum innerhalb des Thorax führt zu einer Verlagerung des Mediastinums und erlaubt eine größere Expansion der verbliebenen Lunge. Zusammen mit einer stärkeren Inflation bei der Inspiration wird das Lungengewebe gedehnt, wodurch die parenchymale Perfusion erhöht und zuvor nur mangelhaft ventilierte Alveolen rekrutiert werden, was wieder zu einer Erhöhung der Diffusionskapazität führt [58].

Die durch eine PNX auftretenden Veränderungen initiieren ebenfalls einen weiteren adaptiven Mechanismus: das kompensatorische Lungenwachstum [60].

Dabei handelt es sich um eine rapide Neubildung von gasaustauschendem Gewebe in der verbliebenen Lunge. Dies führt letztendlich zu einer nahezu kompletten Wiederherstellung des Volumens, Masse, Struktur und der Funktion der verbliebenen Lunge auf ein Niveau vergleichbar mit der gesamten Lunge eines nicht-pneumonektomierten Tieres [56, 61, 62] (Abbildung 2.5). Kompensatorisches Lungenwachstum wurde vor allem in Hunden [61, 63-65], Kaninchen [66, 67], Ratten [62, 68-70] und Mäusen [56, 57, 71, 72] aber auch in Frettchen [73, 74] und Schweinen [75] beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unerheblich ist, welcher Teil der Lunge entfernt wird, um kompensatorisches Lungenwachstum auszulösen [62]. Vielmehr scheint die entnommene Menge an Lungengewebe zumindest bei einigen

Vertebratenspezies (z.B. Hunde) eine Rolle zu spielen [63, 64]. Generell scheint die während des kompensatorischen Lungenwachstums einhergehende Wiederherstellung der alveolaren und kapillaren Oberflächen verbunden mit einer Neubildung von Alveolen zu sein und führt nicht nur strukturell sondern auch funktionell zu einer Normalisierung der Lungenparameter verglichen mit nicht-pneumonektomierten Kontrollen [56, 57, 61]. Im Zuge der Neubildung von respiratorischem Gewebe steigt der DNA-, RNA- und Proteingehalt der verbliebenen Lunge während des kompensatorischen Lungenwachstums [76-78]. Proportional hierzu ist ebenfalls eine Proliferation der alveolaren Zellen (AT-I, AT-II, Fibroblasten) zu beobachten [79-81]. All dies sind auch Hinweise darauf, dass es sich bei kompensatorischen Lungenwachstum nicht um eine Hypertrophie handelt [68]. Das Wachstum wird als dysanaptisch (ungleich) bezeichnet, da nahezu ausschließlich respiratorisches Gewebe neu gebildet wird, wohingegen die konduktiven Atemwege und Blutgefäße in ihrer Fähigkeit zum (kompensatorischen) Wachstum nach Abschluss der Lungenentwicklung sehr limitiert sind [74, 82]. Das Alter scheint ebenfalls einen Einfluss auf das kompensatorische Lungenwachstum zu haben. Die allgemeinen Charakteristika des kompensatorischen Lungenwachstums sind dabei bei jungen- sowie alten Tieren einer Spezies zu beobachten. Das Ausmaß sowie die Dauer des Kompensationsprozesses scheinen sich jedoch zu ändern [83]. So konnte bei Mäusen eine Abnahme des kompensatorischen Lungenwachstums mit fortschreitendem Alter beobachtet werden [84]. Auch die Dauer des Kompensationsprozesses scheint sich zumindest bei Hunden mit dem Alter zu verlängern [85]. Zwischen den bisher untersuchten Spezies konnten ebenfalls wichtige Unterschiede bezüglich der Kompensationsprozesse nach Pneumonektomie identifiziert werden. Generell scheinen primitive Organismen (z.B. Nager) besser den Verlust von Lungengewebe durch kompensatorisches Wachstum ausgleichen zu können als komplexere Organismen höherer Ordnung (z.B. Hund) [86]. Unter den Vertebraten scheint das somatische Wachstum, der Feinbau der Lunge und deren physiologische Reserve für den Gasaustausch eine Rolle zu spielen [87].

Das Auftreten von kompensatorischem Lungenwachstum nach Pneumonektomie bzw. Lobektomie beim Menschen ist noch nicht ausreichend untersucht. Bisher konnte ein eingeschränktes kompensatorisches Lungenwachstum vor allem bei Kindern (Alter: < 5 Jahre) nachgewiesen werden [88, 89], jedoch konnte eine Fallstudie zeigen, dass ein solches Wachstum potentiell auch bei adulten Menschen möglich sein könnte [90]. Bisher wurde für adulte Menschen angenommen, dass bei nach PNX lediglich eine funktionelle Kompensation durch die Inanspruchnahme der physiologischen Reserven der Lunge auftritt [91].

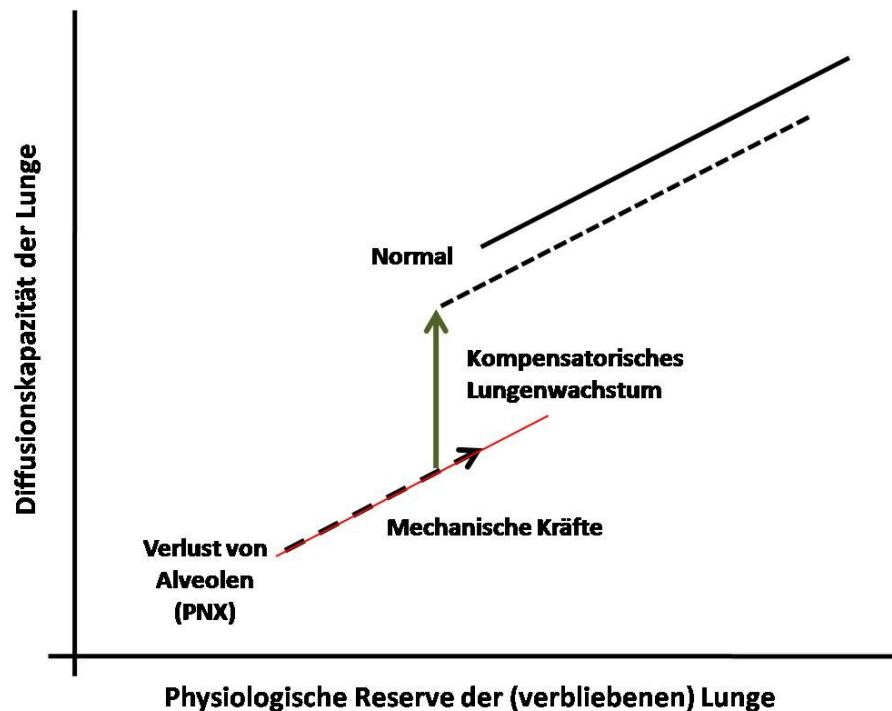


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Einflusses der physiologischen Reserve und des kompensatorischen Lungenwachstums auf die Diffusionskapazität der Lunge.

modifiziert nach [87]

2.3.1 Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums

Als ein sehr wichtiger Faktor für die Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums gilt mechanischer Stress bzw. mechanische Kräfte [60, 81, 92, 93]. Der Freiraum, welcher durch die Entfernung eines Lungenflügels entsteht, erlaubt es der verbliebenen Lunge zu expandieren. Diese Dehnung des Lungengewebes führt vermutlich zu einer Aktivierung des kompensatorischen Lungenwachstums. Unterstützt wird dies unter anderem durch Studien an Mäusen [79, 81], Ratten [76], Kaninchen [94] und Hunden [95, 96]. Hierbei wurde der entfernte Lungenflügel durch eine Prothese oder andere Platzhalter (Wachs, Schwämme) ersetzt, wodurch eine Expansion der verbliebenen Lunge verhindert wurde. Als Folge für das Ausbleiben des Dehnungssignals war das kompensatorische Lungenwachstum vermindert. Wurden die Platzhalter nach einiger Zeit entfernt, konnte die verbliebene Lunge wieder in den Freiraum expandieren und es war unmittelbar ein Einsetzen des kompensatorischen Lungenwachstums zu beobachten [95, 96]. Dies zeigt, dass mechanische Dehnungs- und Zugkräfte zwar sehr dominante aber nicht die einzigen Faktoren für das Auslösen des kompensatorischen Lungenwachstums zu sein scheinen. So konnten die bisher durchgeführten Platzhalterexperimente das kompensatorische Lungenwachstum lediglich vermindern und niemals komplett inhibieren. Desweiteren scheinen auch anderweitig auftretende mechanische Zug-, Dehnungs- und Scherkräfte, die auf die Lunge einwirken,

zumindest einen Einfluss zu haben. Da das gesamte Herzzeitvolumen durch die verbliebene Lunge strömt, wirken Scherkräfte auf die Gefäße und es kommt zu einer Dehnung der Kapillaren. Dennoch scheint der pulmonale Blutfluss nicht in der Lage zu sein als alleiniger Stimulus kompensatorisches Lungenwachstum zu initiieren [97]. Alle nach PNX auftretenden mechanischen Kräfte haben höchstwahrscheinlich auch einen Einfluss auf die Extrazellulärmatrize (EZM), welche unter anderem für Transduktion dieser mechanischen Signale wichtig sein könnte. Jedoch ist der heutige Wissensstand weitestgehend hypothetisch und kaum verstanden [87]. Bisher konnte gezeigt werden, dass wichtige Komponenten der EZM (z.B. Elastin, Kollagen) nach PNX vermehrt exprimiert werden und somit zumindest am kompensatorischen Lungenwachstum beteiligt sind [98-100]. Nicht-mechanische Faktoren und verschiedene molekulare Signaltransduktionswege dürften ebenfalls eine Rolle bei der Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums spielen [87]. Dies ist jedoch bisher ebenfalls kaum erforscht. Verschiedene Microarray-Analysen und andere *in vivo*-Versuche konnten zeigen, dass nach PNX die Expression von Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren, die auch bei der Entwicklung der Lunge und der Alveolarisierung wichtig sind, hochreguliert ist [100-102]. Dennoch scheinen solche Faktoren eher Mediatoren für die Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums zu sein oder sind wichtig für die Regulation und Progression dieses Kompensationsprozesses [58, 103]. Nach heutigem Kenntnisstand ist keines der bisher untersuchten potentiellen Initiationsereignisse bzw. -faktoren allein in der Lage kompensatorisches Lungenwachstum nach PNX auszulösen [58, 87].

2.3.2 Molekulare Mediatoren des kompensatorischen Lungenwachstums

Kompensatorisches Lungenwachstum umfasst Proliferation, Zelldifferenzierung, Synthese von Bestandteilen der Extrazellulärmatrize, (Re-)Organisation der Extrazellulärmatrize-Angiogenese sowie die Remodulierung von Geweben. Die dafür verantwortlichen molekularen Mediatoren und Signalwege sind bisher kaum untersucht und verstanden. Einige Hypothesen beruhen dabei auf der potentiellen Beteiligung von Faktoren, die auch wichtig für die Alveolarisierung während der Lungenentwicklung sind [87]. Für Hormone bzw. Glukokortikoide konnte bereits ein Einfluss auf das kompensatorische Lungenwachstum festgestellt werden, wobei eine vorherige Adrenalektomie (Entfernung der Nebenniere) positive Effekte auf die Kompensationsprozesse der Lunge nach Pneumonektomie hatte [104]. Verschiedenste Wachstumsfaktoren (siehe Tabelle 2.1) konnten ebenfalls schon mit dem kompensatorischen Lungenwachstum korreliert werden. Unterschiedliche Arbeiten konnten zeigen, dass eine Manipulation dieser Faktoren das kompensatorische Lungenwachstum modulieren kann

und/oder deren Expression nach Pneumonektomie erhöht ist. Dies gilt auch für die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren am kompensatorischen Lungenwachstum [87, 100, 101, 105] (Tabelle 2.1). Eine funktionelle Studie konnte zeigen, dass eine Repression des Transkriptionsfaktors TTF 1 (Thyroid Transkriptionsfaktor) zu einem verzögerten Einsetzen des kompensatorischen Lungenwachstums nach Pneumonektomie führt [103]. Weiterführende Experimente legen den Schluss nahe, dass der cAMP-Signalweg, der TTF 1 vorgeschaltet ist, ebenfalls Effekte auf das kompensatorische Lungenwachstum hat [106]. Tabelle 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der molekularen Faktoren, deren Beteiligung am kompensatorischen Lungenwachstum nachgewiesen wurde:

Tabelle 2.1: Faktoren und deren Korrelation mit dem kompensatorischen Lungenwachstums

Quellen: [80, 87, 100, 101, 105, 107]

Faktor	Nachweis	Spezies
EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Expression von EGF-Rezeptor nach PNX erhöht	Ratte, Schwein
	Exogenes EGF verstärkt kompensatorisches Lungenwachstum	Ratte
HGF (Hepatozyten Wachstumsfaktor)	Expression nach PNX erhöht	Maus
	Im Serum nach PNX erhöht	Maus
	Exogenes HGF verstärkt kompensatorisches Lungenwachstum	Ratte
	Neutralisierender Antikörper gegen HGF vermindert kompensatorisches Lungenwachstum	Maus
HIMF (Hypoxie-induzierter mitogener Faktor)	Expression nach PNX erhöht	Maus
HIF-1 α (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α)	Expression nach PNX erhöht	Hund
IGF 1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1)	Expression nach PNX erhöht	Lamm, Ratte
KGF (Keratonizyten Wachstumsfaktor)	Expression nach PNX erhöht	Ratte
	Exogenes KGF verstärkt kompensatorisches Lungenwachstum	Ratte
Retinoide	Exogenes Retinoide verstärken kompensatorisches Lungenwachstum	Ratte
VEGF (Vaskular-endothelialer Wachstumsfaktor)	Expression von VEGF 164 & 120 nach PNX erhöht	Maus
	Exogenes VEGF verstärkt kompensatorisches Lungenwachstum	Maus

Faktor	Nachweis	Spezies
PDGF α (Blutplättchen-stämmiger Wachstumsfaktor α)	Hemmung vermindert kompensatorisches Lungenwachstum	Maus
FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor)	erhöhte Konzentrationen vermindern kompensatorisches Lungenwachstum	Maus
Egr1 frühe Wachstumsantwort 1	Expression nach PNX erhöht	Maus
Tristetraprolin	Expression nach PNX erhöht	Maus
c-fos	Expression nach PNX erhöht	Maus
JunB	Expression nach PNX erhöht	Maus
Fos	Expression nach PNX erhöht	Maus
TTF-1	Expression nach PNX erhöht	Maus
	Hemmung vermindert kompensatorisches Lungenwachstum	Maus
cAMP	erhöhte Konzentrationen verstärken kompensatorisches Lungenwachstum	Maus
Telomerase	kompensatorisches Lungenwachstum in Telomerase-defizienten Tieren vermindert	Maus

2.4 Die Extrazellulärmatrix

Viele Gewebe, die einen Organismus formen, bestehen nicht ausschließlich aus Zellen. Meist sind die Zellen eines Gewebes in eine Extrazellulärmatrix eingebettet, welche unter anderem die Gewebearchitektur physikalisch stützt. Der Anteil der EZM bezogen auf das zelluläre Volumen variiert dabei von Gewebe zu Gewebe. Auch die Zusammensetzung der EZM variiert zum Teil sehr stark und ist abhängig von der Funktion eines jeweiligen Gewebes/Organs [108]. Stets handelt es sich um ein dynamisches Proteinnetzwerk, das aus faserförmigen Proteinen (Kollagen, Elastin) und aus strukturellen oder adhäsiven Proteinen (Fibronectin, Laminin) besteht [31]. Hauptbestandteil der EZM sind Kollagenfasern, die in faserförmige (Typ I-III) und amorphe/nicht-faserförmige (Typ IV-VI) Typen unterteilt werden (Abbildung 2.6). Diese Fasern verleihen einem Gewebe Zugbelastbarkeit. Als weitere Komponente der EZM vermitteln elastische Fasern einem Gewebe Elastizität, wobei der Grad der Elastizität abhängig von dem Elastingehalt einer Faser ist [109]. Mit ihren gummiähnlichen Eigenschaften sind diese Fasern zum Beispiel sehr wichtig beim Atemvorgang, da über deren Rückstellkräfte die Grundstruktur

des parenchymalen/respiratorischen Gewebes der Lunge wiederhergestellt wird [31]. Die fadenförmigen Glykoproteine, Fibronectin und Laminin sind nötig für die Adhäsion von Zellen an die EZM. Sie stellen eine Art Verankerung dar und sind die Verbindung zwischen Zelle und EZM. All diese „losen“ Komponenten der EZM sind eingebettet in eine gelatinöse Substanz bestehend aus Glykosaminoglykanen (z.B. Hyaluronsäure, Heparansulfat) bzw. Proteoglykanen (z.B. Versican) [110]. Neben ihrer Eigenschaft viel Wasser zu binden, wirkt dieses Polysaccharid-Gel stabilisierend auf die anderen Komponenten des EZM und kann Proteine verschiedener Funktionalität (z.B. Tenascine, TGF β , Proteasen und deren Inhibitoren) binden [111]. Ein Teil dieser gebundenen Proteine werden auch als extrazellulärmatrixassoziierte Proteine (z.B. Tenascine, Osteopontin, Thrombospondin) bezeichnet. Sie besitzen keine strukturellen Eigenschaften, können aber direkt oder indirekt die EZM modulieren. Somit spielen sie gerade in der Entwicklung sowie bei Reparatur- und Remodulierungsprozessen eine wichtige Rolle [108].

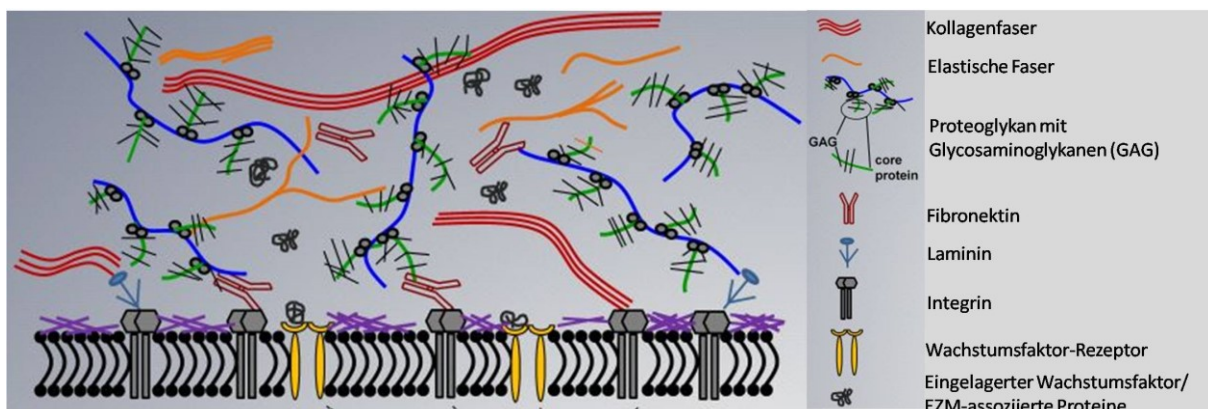


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Extrazellulärmatrix und deren Verbindung mit der Zellmembran
Modifiziert nach [112]

Die EZM ist nicht nur mit den umliegenden Zellen verbunden, sondern kann auch über EZM-Rezeptoren (Integrine, Tenascine, Toll-like Rezeptoren) mit ihnen interagieren [113]. Die EZM dient dabei nicht nur als Transmitter von Signalen, sondern kann auch beispielsweise die Migration und Differenzierung der mit ihr verbundenen Zellen beeinflussen. Zu diesen aktiven bzw. direktiven Eigenschaften der EZM werden ebenfalls die in ihr eingelagerten Wachstumsfaktoren gezählt, welche nach einer Degradation oder Remodulierung der EZM freigesetzt werden [114, 115]. Da durch verschiedene Stimuli die EZM-abbauenden Proteasen und deren Inhibitoren von Zellen sezerniert werden, beeinflussen sie sich wechselseitig. Eine Störung dieser Homöostase ist meist Ursache für Krankheiten (z.B. Emphysem, Fibrose) [116, 117].

2.4.1 Die Extrazellulärmatrix der Lunge

Die EZM der Lunge besteht aus einem Kontinuum von Fasern, das die gesamte Lunge durchzieht und keine losen Enden aufweist. Es besteht aus axialen, peripheren und septalen Fasersystemen, die ineinander übergehen. Besonders das stützende EZM-Netzwerk der Alveolen bzw. des respiratorischen Gewebes der Lunge ist in seiner stützenden Funktion für einen effizienten Gasaustausch konzipiert. Um den Dicke einer alveolaren Wand/Septe und den Diffusionswiderstand auf ein Minimum zu reduzieren, sind elastische Fasern und Kollagenfasern eng mit dem kapillaren Netz verwoben. Dabei winden sich die einzelnen Stränge der Fasern so um eine Kapillare, dass stets nur eine Seite von ihr bedeckt wird. Somit besteht die Diffusionsbarriere bei der Hälfte der kapillaren Oberfläche lediglich aus den Basalmembranen der epithelialen- und endothelialen Zelleneiner Alveole [10]. Auch in der Lunge besitzt die EZM nicht nur physikalische Eigenschaften. Neben der Bereitstellung eines zugfesten und elastischen dreidimensionalen Grundgerüstesspielt die EZM mit ihren funktionellen Komponenten als auch mit ihrem Reservoir an eingelagerten Wachstumsfaktoren und anderen bioaktiven Proteinen eine wichtige Rolle. Besonders in der Entwicklung der Lunge, wo die EZM vornehmlich durch mesenchymale Zellen etabliert wird, scheint eine spezifische örtliche und zeitliche Expression von bestimmten Komponenten der EZM (z.B. Fibronectin, Proteoglykan, Laminin, Integrine) sowie deren Assemblierung teilweise enorm wichtig für die Ausbildung der bronchialen Verzweigungen zu sein [38, 118]. Dabei wird spekuliert, dass die EZM unter anderem als Substrat für die Migration von Zellen und als eine Art morphogenetischer „Checkpoint“ für die Gewebedifferenzierung dienen könnte [114]. Eine besondere Bedeutung haben die elastischen Fasern des EZM der Lunge, die eminent wichtig für die Entwicklung der Lunge als auch deren mechanische Integrität sind [55, 87] (siehe 2.4.1.1).

2.4.1.1 Elastische Fasern in der Lunge und deren Assemblierung

Elastische Fasern sind die Hauptkomponenten des Interstitiums der alveolaren Wände [119]. Dabei formen sie um jede alveolare Öffnung einen Ring an der Spitze der sekundären Septen. In den alveolaren Wänden liegen sie als Bündel vor [50]. Sie verleihen dem parenchymalen Gewebe Elastizität. Durch dieses Vermögen zur Speicherung und Wiederfreisetzung von mechanischer Energie (z.B. beim Atmen) bestimmen sie maßgeblich die mechanischen Eigenschaften des respiratorischen Gewebes und vermitteln ebenfalls die dehnungsinduzierte Signaltransduktion. Wie wichtig elastische Fasern für die Lunge sind, zeigt sich schon bei der Entwicklung der Lunge. Elastin bzw. elastische Fasern beeinflussen hierbei die Ausbildung der distalen Verzweigungen der Atemwege und der primären Septen [51]. Für eine korrekte Alveologenese ist das Vorhandensein von intakten elastischen Fasern allerdings

unumgänglich. Elastische Fasern werden als treibende Kraft der Alveolarisierung gesehen [38]. Zusammen mit alveolaren Myofibroblasten, welche die Hauptbestandteile elastischer Fasern exprimieren, sind sie unter Einwirkung mechanischer Kräfte für die Ausbildung der sekundären Septen aus den primitiven primären Septen verantwortlich [87, 120, 121]. Dies führt wie bereits erwähnt zu einer massiven und finalen Vergrößerung der Oberfläche für den Gasaustausch (2.2.2). Ist die Bildung intakter funktionsfähiger elastischer Fasern aus irgendeinem Grund gestört, bleibt die Alveolarisierung aus, was entweder letale Folgen hat oder zu einer schwerwiegenden Fehl- bzw. Unterentwicklung des gasaustauschenden Gewebes führt [51, 122-124].

Über Bildung bzw. Assemblierung elastischer Fasern ist bis heute nur wenig bekannt und der zugrunde liegende Mechanismus ist weitestgehend hypothetisch [125]. Bisher konnten mehr als 15 Gene/Proteine identifiziert werden, die entweder Bestandteil elastischer Fasern sind oder für deren Assemblierung benötigt werden [126]. Die Expression der Komponenten elastischer Fasern und der Assemblierungs-Proteine beginnt in der Lunge und anderen elastischen Organen ab der zweiten Hälfte der embryonalen Entwicklung (Maus: embryonaler Tag 14). Anschließend nimmt deren Expression stetig zu und hat ihren Höhepunkt in der postnatalen Entwicklung (Maus: postnatal Tag 7-14) [127, 128]. Auffallend ist dabei die koordinierte Expression dieser Gene, die offenbar örtlich und zeitlich strikt reguliert ist. Genauso komplex scheint die Assemblierung funktionsfähiger elastischer Fasern zu sein. Der Hypothese nach soll Tropoelastin, der Vorläufer bzw. das Monomer von Elastin, von Zellen (in der Lunge höchstwahrscheinlich zu einem Großteil von Myofibroblasten) zunächst sekretiert werden. Durch Interaktion mit Glykosaminoglykanen an der Zelloberfläche und der enzymatischen Aktivität von einem oder mehreren Mitgliedern der Familie der Lysyloxidasen (LOX) werden die Tropoelastin-Monomere zu (Elastin-) Aggregaten vernetzt [129, 130]. Die Helferproteine Fibulin 4 und/oder Fibulin 5 wirken dabei unterstützend auf die Vernetzung der Monomere oder limitieren die Größe der Elastinaggregate [123]. Die Aggregate verweilen an der Zelloberfläche und schließen sich unter aktiver Beteiligung der sekretierenden Zelle zu größeren Aggregaten zusammen. Zuvor gebildete Mikrofibrillen, die aus Fibrillin 1 und/oder Fibrillin 2 sowie wahrscheinlich MAGPs (mikrofibrillenassoziierte Glykoproteine 1 und 2) befinden sich schon im Extrazellularraum und sind über Integrine weiter mit der Zelloberfläche verbunden. Nach dem Erreichen einer bestimmten Größe werden die Elastin-Aggregate zu den Mikrofibrillen transferiert. Die Fibuline 4-5, die ebenfalls an Mikrofibrillen binden, könnten wiederum unterstützend bei diesem Transfer wirken [131]. Nach dem Transfer koaleszieren (verschmelzen) die Elastinaggregate auf den Mikrofibrillen zu größeren Strukturen und werden dabei weiter durch LOX vernetzt [125]. Vollständig ausgebildete elastische Fasern bestehen hauptsächlich aus Elastin mit Mikrofibrillen an ihrer Peripherie, die mit zahlreichen anderen Proteinen assoziiert sind (Abbildung 2.6) [132]. Sie sind die größten Strukturen der EZM. Bis

heute ist unklar, wie genau jede bisher identifizierte Komponente zu der Assemblierung dieser komplexen Struktur beiträgt [125, 126].

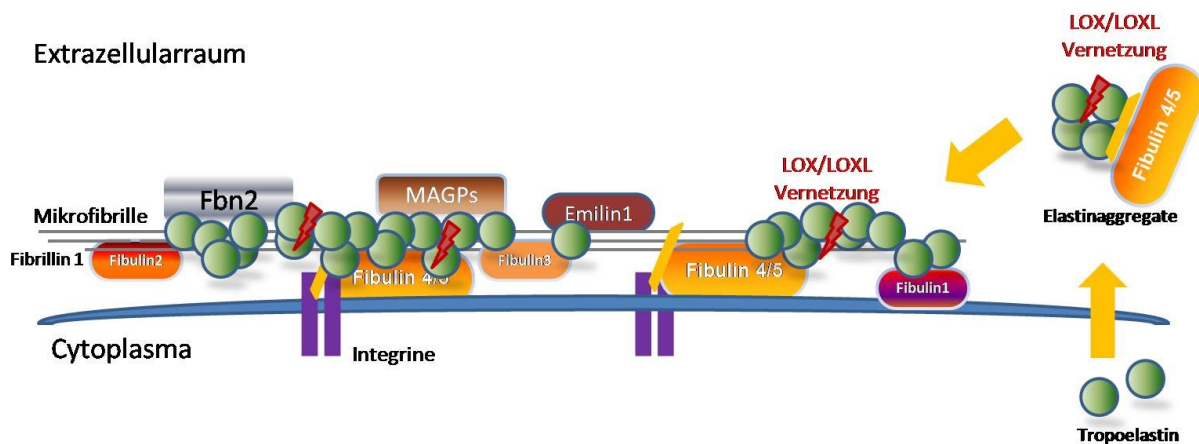


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Komponenten elastischer Fasern und Helferproteine für deren Assemblierung

Abgebildet sind die einzelnen bisher bekannten Komponenten elastischer Fasern und mit ihnen assoziierte Proteine, die für die Assemblierung intakter Fasern benötigt werden. Nach Hypothese der Assemblierung elastischer Fasern von Wagenseil et al. [125]

Als wasserunlösliche Polymere sind elastische Fasern sehr langlebig und können die Lebensspanne eines Organismus überdauern [133]. Nach dem Aufbau der Fasern während der Entwicklung geht die zuvor starke Expression zurück und bleibt auf einem niedrigen Niveau im Erwachsenenalter. Zwar können elastische Fasern im Rahmen einer Remodulierung des Gewebes durch Proteasen, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), verdaut werden, doch es ist unklar, ob neue elastische Fasern auch in adulten Organismen gebildet werden können.

2.4.2 Matrixmetalloproteinasen und deren endogene Inhibitoren

Matrixmetalloproteinasen sind Kalzium-abhängige, Zink-bindende Endopeptidasen. Zusammen mit den Astazinen und ADAMs („A Disintegrin And Metalloproteinase“) wird die Familie der MMPs zu der Metzinkin-Superfamilie gezählt [134]. Bisher konnten 25 MMPs in Mäusen und 24 MMPs in Menschen identifiziert werden. Ursprünglich trugen MMPs deskriptive Namen, die auf ihrer vermeintlichen Substratspezifität zum Zeitpunkt ihrer jeweiligen Entdeckung basierten (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen) [135]. Nachdem klar wurde, dass sehr viele MMPs existieren und deren Substratspezifitäten sich überschneiden, wurde eine sequentielle Nummerierung in der ungefähren Reihenfolge ihrer Entdeckung eingeführt (Tabelle 2.2) [136]. Jede MMP weist eine spezifische Domänensequenz mit verschiedenen Motiven auf. Diese besteht aus einem Signalpeptid, einer Propetiddomäne, der katalytischen Domäne und der C-terminalen Hämopexin-ähnlichen Domäne, die bei fast allen MMPs zu

finden ist [137]. Einige MMPs haben zusätzliche Domänen, wie beispielsweise eine Transmembran- oder zytoplasmatische Domäne [138]. Die Regulation der Aktivität der MMPs erfolgt auf mehreren Ebenen. Sie können von verschiedenen Zelltypen nach unterschiedlichen Stimuli exprimiert werden. So wird beispielsweise MMP 2 in der Lunge von residenten Zellen (Fibroblasten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen) exprimiert, wohingegen MMP 9 von diesen und anderen Zellen (inflammatorische Zellen) nur nach bestimmten Stimuli gebildet werden [31]. Zu den einzelnen Stimuli zählen unter anderem Zigarettenrauch, Pathogene, endogene inflammatorische Intermediate (reaktive Sauerstoffspezies; ROS) und auch mechanischer Stress. Über Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Chemokine kommt es daraufhin direkt oder indirekt zu einer Regulation der MMP-Expression [139]. MMPs werden als inaktive Pro-Enzyme (Zymogen, Pro-MMP) sekretiert. Um diese latenten Formen zu aktivieren, muss die Bindung zwischen dem Zink-Atom (Zn^{2+}) und einem Cystein-Rest (Cys⁷³) gelöst (engl.: „cysteine switch“) oder die Propeptidomäne entweder autolytisch oder durch andere Proteasen entfernt werden [140, 141]. Die bisher bekannten Substrate der MMPs umfassen neben den Proteinen der EZM auch Wachstumsfaktoren, Chemokine, Proteinase und Adhäsionsmoleküle. Interessanterweise sind die meisten Faktoren, welche die Expression von MMPs regulieren, auch Substrat der MMPs (z.B. Tenascin C) [139].

In der Lunge werden nicht alle Mitglieder der MMP-Familie exprimiert. Die meisten MMPs der Lunge werden ausschließlich unter bestimmten Konditionen, wie Inflammation, Verletzung bzw. Reparatur der Lunge, Remodulierung und im Zuge einer Immunantwort, exprimiert [142, 143]. Auch während der Entwicklung der Lunge scheinen MMPs eine Rolle zu spielen, da hierzu eine koordinierte Remodulierung der EZM nötig ist. Bisher ist allerdings nur wenig über die Rolle der MMPs während der Lungenentwicklung erforscht [144]. Jedoch konnten Versuche zeigen, dass eine Breitbandinhibition von MMPs die Morphogenese der Lunge während der pseudoglandulären Phase unterbricht oder die postnatale Alveolarisierung stört [145, 146]. Weiterhin konnten MMPs schon mit der Entwicklung und Progression vieler akuter oder chronischer Lungenkrankheiten (z.B. Fibrose, COPD, Asthma, BPD) in Verbindung gebracht werden [139].

Tabelle 2.2: Mitglieder der MMP Familie

MMP 4-6 wurden von der Nomenklatur nachträglich entfernt, da Studien zeigen konnten, dass entweder kein Genprodukt entsteht oder sie identisch mit bereits entdeckten MMPs waren. Quelle: [147]

Subgruppe	MMP	Name	Substrate
Kollagenasen	MMP 1	Kollagenase I (kommt nicht bei Maus vor)	Col I, II, III, VII, VIII, X, Gelatin
	MMP 8	Kollagenase II	Col I, II, III, VII, VIII, X, Gelatin, Aggrecan
	MMP 13	Kollagenase III	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, Gelatin
Gelatinasen	MMP 2	Gelatinase A	Gelatin, Col I, II, III, IV, VII, X, Elastin
	MMP 9	Gelatinase B	Gelatin, Col IV, V, Elastin
Stromelysine	MMP 3	Stromelysin 1	Col II, IV, IX, X, XI, Gelatin
	MMP 10	Stromelysin 2	Col IV, Laminin, Fibronectin, Elastin
	MMP 11	Stromelysin 3	Col IV, Fibronectin, Laminin, Aggrecan

Subgruppe	MMP	Name	Substrate
Matrilysine	MMP 7	Matrilysin 1	Fibronectin, Laminin, Col IV, Gelatin
	MMP 26	Matrilysin 2	Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin
membranständige- MMP (MT-MMP)	MMP 14	MT1-MMP	Gelatin, Fibronectin, Laminin
	MMP 15	MT2-MMP	Gelatin, Fibronectin, Laminin
	MMP 16	MT3-MMP	Gelatin, Fibronectin, Laminin
	MMP 17	MT4-MMP	Fibrinogen, Fibrin
	MMP 24	MT5-MMP	Gelatin, Fibronectin, Laminin
	MMP 25	MT6-MMP	Gelatin
Andere	MMP 12	Makrophagen Metalloelastase	Elastin, Fibronectin, Col IV
	MMP 19	RASI 1	Aggrecan, Elastin, Fibrillin, Col IV, Gelatin
	MMP 20	Enamelysin	Aggrecan
	MMP 21	XMMP	Aggrecan
	MMP 23	Femalysin	Gelatin, Casein, Fibronectin
	MMP 27	CMMP	unbekannt
	MMP 28	Epilysin	unbekannt

Die natürlichen Inhibitoren der MMPs werden Timp (engl.: „*Tissue Inhibitor of Metalloproteases*“) genannt. Bei Säugetieren konnten bisher vier Timp-Isoformen (Timp1-4) identifiziert werden, deren Aminosäuresequenz sich zu 40 % gleicht [148]. Auf transkriptioneller Ebene können alle Timp-Isoformen durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert werden [149]. Sie werden von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Wie MMPs werden auch Timps von den Zellen sekretiert. Alle Isoformen sind in der Lage nahezu die gesamte Familie der MMPs zu inhibieren, wobei lediglich Unterschiede in der spezifischen Affinität bestehen [150]. Die reversible Inhibition erfolgt dabei über die stark konservierte N-terminale Domäne der Timps, die nach der Anlagerung das aktive Zentrum der MMPs blockiert. Die jeweilige MMP-Inhibition durch ein Timp erfolgt immer in einer 1:1 Stöchiometrie [151]. Das Verhältnis zwischen Timps und MMPs reguliert dabei sehr stark das Ausmaß der EZM-Degradation durch MMPs und stellt einen wichtigen Kontrollmechanismus der MMP-Aktivität dar. Eine Deregulation dieses Gleichgewichts ist ein Charakteristikum von vielen chronisch inflammatorischen Krankheiten (z.B. COPD, Arteriosklerose, Rheuma, Fibrose) und Krebs [147]. Neben der Inhibition von Metalloproteinasen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Timps auch eine biologische Aktivität besitzen. So können sie wie MMPs indirekt oder auch direkt das Zellwachstum, die Migration und Apoptose von Zellen regulieren. Die Wachstumsfaktor-ähnliche Aktivität wird dabei über die C-terminale Domäne der Timps vermittelt [115]. Die hohe Heterogenität dieser Domäne unter den Timp-Isoformen unterstützt bisherige Studien, die zeigen konnten, dass die jeweiligen Timps eine spezifische Aktivität aufweisen. Die Koexistenz der MMP-bedingten und MMP-unabhängigen Timp-Aktivitäten erschwert die Forschung auf diesem Gebiet. Es wird vermutet, dass die Timp-Signalaktivität auch durch das Verhältnis zwischen MMP-gebundenem und freiem Timp moduliert werden kann [152]. Neben den Protein-Protein-Interaktionen oder durch die Bindung an Pro-MMPs bedingte biologische Aktivität der Timps konnten weiterhin Timp-Rezeptoren identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um spezifische Integrine, die eine Bindungsaffinität für Timps aufweisen [153]. Über die Rolle von Timps und deren MMP-unabhängigen Aktivitäten in der Lunge (Entwicklung, Regeneration) ist nur wenig bekannt [87]. Es konnte gezeigt werden, dass Timp 3-defiziente Mäuse zwei Wochen nach der Geburt spontan einen emphysemähnlichen Phänotyp entwickeln [154].

2.4.3 Das Extrazellulärmatrix-assoziierte Protein Tenascin C

In Vertebraten existieren insgesamt vier Tenascine (Tenascin C, -X, -R und -W). Die Glykoproteine sind sich strukturell zwar ähnlich, aber jedes Tenascin zeigt distinkte Funktionen und Expressionsmuster [155, 156]. Alle Tenascine weisen eine typische Tenascin-Struktur auf, die sich aus einer N-terminalen Oligomerisationsdomäne mit Heptad-Repeats

(Wiederholungen) gefolgt von einer Domäne mit multiplen EGF-ähnlichen Repeats, einer Domäne mit Fibronectin Typ III-Repeats und einer C-terminalen Fibrinogen-ähnlichen globulären Domäne zusammensetzt. Die unterschiedlichen Tenascine unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer primären Sequenz, sondern ebenfalls in der Anzahl der EGF-ähnlichen- und Fibronectin-Typ III-Repeats. Weiterhin sind Tenascin C (TnC) und Tenascin W über ihre Oligomerisationsdomäne in der Lage ein Hexamer zu bilden [157]. TnC ist bisher das am Besten untersuchte Tenascin und scheint in der Lunge im Vergleich zu den anderen Tenascinen am stärksten exprimiert zu werden [158, 159]. Als erstes Mitglied der Tenascin-Familie wurde TnC (Tenascin Cytotaktin) von mehreren Laboren unabhängig voneinander entdeckt. Aus diesem Grund existieren neben dem offiziellen Namen [160] noch mehrere andere Namen: Glial/mesenchymales Extrazellulärprotein (GMEM) [161], Myotendinöses Antigen [162, 163], Hexabrachion [164], Cytotaktin [165], J1 220/200 [166], Neuronektin [167]. TnC zeigt hauptsächlich morphoregulatorische Eigenschaften und spielt eine Rolle während der Entwicklung, bei der Remodulierung von Geweben und bei Krankheiten bzw. Verletzungen, indem es die Zelladhäsion und die signalleitenden Eigenschaften von Zellen reguliert [157]. Es wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen exprimiert, wobei seine Expression während der Entwicklung am intensivsten ist. In adulten Geweben ist die Expression sehr eingeschränkt. Nur unter pathologischen Bedingungen (Infektion, Inflammation, Remodulierung, Krebs) kommt es zu einer erneuten starken Expression von TnC [168]. Während der pränatalen Lungenentwicklung akkumuliert TnC in der Basalmembran und im Mesenchym. Dabei umgibt es die entstehenden Verzweigungen und die Spitzen des sich ausbildenden Bronchialsystems [169]. Hierbei scheinen mechanische Stimuli einen Einfluss auf die Konzentration des akkumulierten TnC auszuüben [170]. Postnatal zeigt TnC die stärkste Expression während der Lungenentwicklung. Dort wird es vornehmlich in den Spitzen der sich formenden sekundären Septen exprimiert. Dabei wird vermutet, dass TnC eventuell synergistisch mit Elastin die Bildung neuer Septen bewirkt [38]. Ein Verlust des TnC Gens führt zu einer gestörten Verzweigung der distalen Bronchiolen und vergrößerten Atemwegen [55, 170]. Weiterhin führt eine TnC Gendeletion zu einer eingeschränkten Regeneration bei einigen Regenerationsmodellen [171, 172]. Die meisten funktionellen Eigenschaften von TnC werden über die EGF-ähnlichen und Fibronectin-Typ III-Repeats vermittelt. Über diese kann TnC entweder über eine direkte Interaktion mit Zellrezeptoren (z.B. EGF-, Fibronectin-, Integrine-, Annexin II-Rezeptoren) oder indirekt über die Modulation von EZM-Proteinen und Adhäsionsmolekülen das Adhäsionsvermögen spezifischer Zelltypen verändern oder die Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen regulieren [108, 157, 173]. Da TnC nicht nur Induktor von MMPs sondern auch deren Substrat ist und weiterhin multiple Splice-Varianten bekannt sind, ist die Funktionalität von TnC sehr komplex [174, 175]. Beispielsweise konnten im Gehirn der Maus schon mehr als 25

differentielle TnC-Transkripte identifiziert werden [176], wobei die Expression der Isoformen anscheinend abhängig von den Stimuli, Gewebe und Zelltyp zu sein scheint [177]. Ein Teil der „Abbauprodukte“ von TnC durch MMPs scheinen auch weiterhin eine biologische Aktivität aufzuweisen [157, 175]. Die Isoformen und Degradationsprodukte von TnC führen zu einer weiteren Modulation der Funktionen und Interaktionen mit Bindungspartnern von TnC. Darüber hinaus können eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF, FGF, PDGF, pro- und anti-inflammatorische Zytokine) sowie mechanische Kräfte die Expression von TnC induzieren. Die biomechanische Regulation von TnC scheint bei regenerativen Prozessen und in der Entwicklung von besonderer Bedeutung zu sein [156]. Aufgrund seiner Eigenschaften und Expression wird TnC auch intensiv in der Krebsforschung untersucht, wo es bei der Tumorgenese und Metastasierung eine Rolle spielt [178, 179].

2.4.4 Mechanotransduktion

In den letzten zwei Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass Biomechanik nicht nur auf den Bewegungsapparat biologischer Systeme beschränkt ist, sondern auch auf molekularer Ebene eine große Rolle spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die biomechanischen Eigenschaften bzw. die mechanische Interaktion zwischen Zellen und ihrer Extrazellulärmatrix teilweise erhebliche regulatorische Effekte auf die Zellphysiologie und das Zellverhalten haben [117]. So befähigt die Wahrnehmung und Verarbeitung von mechanischen Kräften Gewebe und Zellen nicht nur zu einer schnellen Reaktion auf Änderungen der mechanischen Belastung (z.B. Gleichgewicht, Gehen, körperliche Belastung), sondern ebenfalls zu einer strukturellen Adaption bei chronischen Änderungen der mechanischen Belastung (z.B. Training). In der Biologie wird Mechanotransduktion als die Umwandlung mechanischer Signale in elektrische oder chemische Signale innerhalb einer Zelle beschrieben [180]. Dabei scheint die Transduktion der mechanischen Kräfte für eine strukturelle Adaption höchstwahrscheinlich nur zu einem sehr geringen Anteil über den schnellen Fluss von Ionen durch dehnungssensible Ionenkanäle (z.B. bei Neuronen, Skelett- und Herzmuskeln; mechano-elektrische Transduktion) statt zu finden, sondern eher durch eine Transmission der mechanischen Kräfte über die Extrazellulärmatrix in das Zytoskelett einer Zelle [180]. Wichtig für die Transmission mechanischer Kräfte in Zellen oder aus ihnen heraus sind hierbei die physikalischen Verknüpfungen zwischen dem Zytoskelett der Zellen und der Extrazellulärmatrix. Diese Verknüpfung wird über verschiedene transmembran-verlaufende Integrine hergestellt, die als Rezeptoren fungieren. Spezifische Integrine können mit ihrer extrazellulären Domäne spezifische EZM-Komponenten binden. Der zytoplasmatische Teil der Integrine ist dabei stabil über ein Adapterprotein mit dem Zytoskelett verbunden [181, 182]. Nach dem ersten Ausbilden von Kontakten zwischen EZM und Zellen kann eine Neubildung von weiteren Verknüpfungen

nur über das Einwirken mechanischer Kräfte auf die bestehenden Strukturen erfolgen. Die Bildung neuer so genannten fokalen Adhäsionen erfolgt nach einer intrazellulären Aktivierung der betreffenden Zellen und ist dabei proportional zu dem lokalen mechanischen Stress, der seinerseits abhängig von der Beschaffenheit (z.B. Elastizität, Festigkeit) der umliegenden bestehenden Strukturen ist. Durch ein aktives Ziehen mit ihren intrazellulären kontraktile Mechanismen an den Zell-EZM-Verknüpfungen sind Fibroblasten und andere Zellen in der Lage, Informationen bezüglich der Beschaffenheit der umliegenden Extrazellulärmatrix (z.B. weich, fest, elastisch) zu sammeln [183]. Stößt zum Beispiel dieses zelluläre Ziehen auf Widerstand, so ist das ein Hinweis auf eine steife EZM, was auf einen stabilen mechanischen Zustand schließen lässt. Dies ist ein Signal für die Zellen zu wachsen und sich mittels der Ausbildung neuer Integrinverknüpfungen stärker mit der EZM zu verbinden [184, 185]. Unstabile mechanische Konditionen (zu viele, zu wenige oder variierende mechanische Kräfte) hingegen führen zu einer Rückbildung der fokalen Adhäsionen. So ist es einer Zelle möglich, über ihre Kontakte zum EZM die Sensibilität gegenüber mechanischen Reizen zu regulieren und gegebenenfalls die EZM zu remodulieren. Die eigentliche Übersetzung der mechanischen Signale in chemische Signale erfolgt intrazellulär. Vermutlich führt eine Spannung oder Dehnung der fokalen Adhäsionen (Integrine) zu einer veränderten Bindungskinetik zwischen strukturellen- und signaltransduzierenden Komponenten einer Zelle, was schließlich zu einer Aktivierung chemischer Signaltransduktionswege führt [186]. In einer weiteren Hypothese wird spekuliert, dass mechanische Kräfte zu einer Konformationsänderung der Adapterproteine der Integrine führen, wobei vorher verdeckte Phosphorylierungsstellen frei werden, die dann von Signalproteinen (z.B. NfKB, GTPasen der Src, Ras, Rho Familie und MAPK) erkannt werden und eine Signalkaskade auslösen [187, 188]. Als Konsequenz der Mechanotransduktion, die abhängig von der Art des mechanischen Stimulus ist, kann eine Vielzahl von weiteren zellinternen Signalwegen aktiviert werden [180]. Dies erlaubt es Zellen, ihre Gestalt, Motilität, Differenzierungsstatus und Funktion an eine Veränderung der lokalen Umgebung anzupassen. Eine Störung dieses dynamischen Gleichgewichts zwischen Zellen, EZM und der darauf wirkenden mechanischen Kräfte spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Progression chronischer Erkrankungen wie beispielsweise COPD, Emphysem und Fibrose [117]. So fördert mechanischer Stress, der durch die fötalen Atembewegungen erzeugt wird, die fötale Lungenentwicklung [189, 190]. Auch der Surfactant-Metabolismus scheint durch statische Dehnung zumindest *in vitro* induzierbar zu sein [191]. Wie bereits erwähnt, spielen mechanische Kräfte bei der Expression von EZM-Komponenten (2.4.1.1) und auch beim kompensatorischen Lungenwachstum (2.3.1) eine Rolle. Es gilt als erwiesen, dass mechanische Kräfte die Lunge in der Entwicklung, Regeneration und Krankheit beeinflussen, dennoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen bisher kaum verstanden [87, 192].

2.5 Der Transkriptionsfaktor Early Growth Response 1 (Egr1)

Der Transkriptionsfaktor Egr1 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen, die sich mit Zellwachstum und Proliferation beschäftigen, unabhängig voneinander entdeckt. Aus diesem Grund existieren ebenfalls die alternativen Bezeichnungen NGFI-A („Nerve-Growth-Factor Inducible A“) [193], Krox 24 (Krüppel Box 24) [194], Zif 268 (Zinkfinger 268) [195] und Tis-8 [196]. Seine offizielle Bezeichnung stammt aus den Arbeiten von Sukhatme *et al.*, die sich mit der Stimulation von humanen- und Mausfibroblasten durch NGF beschäftigten [197]. Egr1 ist das erste Mitglied von insgesamt vier weiteren Egr-Proteinen (Egr2, Egr3 und Egr4). Alle haben in ihrer Struktur eine DNA-Bindungsdomäne bestehend aus drei Zinkfingern des Typs Cys₂His₂, die als Triplet angeordnet sind [198]. Unter den einzelnen Egr-Isoformen ist diese Domäne und deren benachbarte basische Region sehr stark konserviert. Nur eine signifikante Abweichung in ihren terminalen Sequenzbereichen erlaubt eine Unterscheidung der Egr-Proteine 1, 2 und 3. Bis auf Egr4 besitzen die anderen Isoformen weiterhin Bindestellen für NAB 1 und 2 (NGFI-A bindendes Protein 1 & 2) [199, 200]. Bei dem konstitutiv exprimierten NAB 1 und dem induzierbaren NAB 2 handelt es sich um Korepressoren, welche eine übermäßige Aktivierung von Egr-Ziel promotoren verhindern [201]. Die Egr-Proteine wirken als transkriptionelle Aktivatoren und binden an sehr ähnliche GC-reiche Sequenzen ihrer Zielgene. Das DNA-Konsensusmotiv (GCG(G/T)GGGCG) wird als Egr-Bindesequenz (EBS) bezeichnet [202, 203]. Als ein „immediate-early response“-Protein (unmittelbare frühe Antwort) kann die Expression von Egr1 sehr schnell durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Noxen und mechanische Stimuli induziert werden [204]. Nach der Bindung an die Promotoren seiner Zielgene verändert es deren Transkription, wobei die bereits erwähnten Corepressoren (NAB) aber auch Coaktivatoren (z.B. CREB-bindendes Protein, p300) die Aktivität von Egr1 modulieren [201, 205, 206]. Die Zellantworten, die Egr1 nach einem entsprechenden Stimulus durch die Aktivierung der Zielgene (z.B. FGF, PDGF, LH, Fibronectin, p53, TNF α , VEGF) auslöst, sind mannigfaltig. Hauptsächlich scheint Egr1 die Proliferation zu fördern und dient bei Gewebeschädigungen oder bei Hypoxie dem Wachstum und Überleben der Zellen [207-210]. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass Egr1 auch proapoptisch, als Tumorsuppressor und auf die Differenzierung von Zellen wirken kann [211-213]. In der Angiogenese und bei der Immunabwehr scheint Egr1 ebenfalls eine Rolle zu spielen, da VEGF und TNF α über Egr1 induziert werden können [214-216]. Mäuse, deren Gen für Egr1 deletiert wurde, zeigen einen sehr milden Phänotyp, weil wahrscheinlich die sehr ähnlichen Isoformen der Egr-Familie (Egr2 und Egr3) den Verlust von Egr1 kompensieren können [217]. Sie sind kleiner als Wildtyptiere und steril, was auf einem Hormondefekt beruht [218, 219]. Weiterhin scheinen sie ein schlechtes Langzeitgedächtnis zu haben [220]. Nach einer partiellen Hepatektomie ist bei diesen Knockout-Tieren die Regeneration der Leber verzögert [221]. Bezüglich der Lunge konnte Egr1 bisher zumeist mit Lungenkrankheiten in

Verbindung gebracht werden. Verschiedene Microarray-Studien fanden heraus, dass Egr1 in COPD Lungen hochreguliert ist [222], wobei es möglicherweise als Zielprotein für Behandlungen dieser Krankheit in Betracht kommen könnte [223]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von Egr1 durch Zigarettenrauch *in vivo* und *in vitro* induziert werden kann. Rauchen ist eine der Hauptursachen für COPD und Egr1 könnte dabei ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von COPD sein [224]. Da Egr1 durch Hypoxie induziert werden kann, fördert es über die Aktivierung entsprechender Gene für Inflammation, Koagulation und vaskuläre Hyperpermeabilität die Ausbildung der Symptome einer akuten Lungenverletzung (ALI; engl.: *acute lung injury*) [225, 226]. Bei einer anderen Arbeit konnte in fötalen Lungenepithelzellen die Expression von Egr1 mittels zyklischer Dehnungsbewegungen über den MAPK Signalweg (mitogenaktivierte Proteinkinase) ausgelöst werden [227]. Eine vergleichende Microarray Studie, welche sich mit der Expression von Genen in frühen postnatalen Stadien und während des kompensatorischen Lungenwachstums beschäftigte, wies eine erhöhte Expression von Egr1 ein Tag nach PNX nach [100].

2.6 Die Knockout-Maus

Unter einer Knockout- (außer Gefecht setzen) Maus versteht man eine genetisch veränderte Maus, die eine bekannte Mutation trägt. Mittels genetischer Manipulation (engl.: *gene targeting*) wurden bei solchen Mäusen gezielt ein oder mehrere Gene deaktiviert [228]. Diese Inaktivierung führt zu einem kompletten Verlust der Funktionalität (engl.: *loss-of-function mutation*) eines (oder mehrerer) spezifischen Gens, d.h. es ist einem Organismus nicht mehr möglich dieses Gen zu exprimieren, bzw. das auf ihm kodierte Protein zu synthetisieren. Hierdurch wird eine sehr gute Beschreibung der biologischen Rolle eines Proteins bzw. des genetischen Allels möglich. Für die Entwicklung von Knockout-Mäusen waren zwei Entdeckungen maßgeblich – die Isolation von Stammzellen und die Entdeckung der homologen Rekombination [229]. Evans *et al.* war es Anfang der 1980er Jahre erstmals möglich embryonische Stammzellen (ES-Zellen) aus der inneren Zellmasse von postkoitalen Mausblastozysten zu isolieren, zu kultivieren und dabei ihre Pluripotenz zu erhalten [230]. Pluripotenz beschreibt dabei das uneingeschränkte Vermögen dieser Zellen sich in jeden Zelltyp eines Organismus zu differenzieren. Weitere Experimente konnten zeigen, dass diese Zellen nach deren Injektion in eine Blastozyste weiterhin zu der Entwicklung einer Maus beitragen und auch in die Keimbahn eingebracht werden können, wodurch die genetischen Merkmale (z.B. Fellfarbe) dieser Zellen auch weitervererbt werden [231]. Die Entdeckung der natürlich auftretenden homologen Rekombination durch Lederberg war die zweite wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Knockout-Mäusen [232]. Im Gegensatz zur Transgentechnologie, worüber DNA zufällig in ein Genom eingeschleust bzw. manipuliert

werden kann, ist es mit Hilfe der homologen Rekombination möglich, DNA gezielt an einen spezifischen Locus des Genoms zu platzieren [233]. Homologe Rekombination ist ein Reparaturmechanismus und tritt bei allen Organismen auf. Für das Auftreten dieser Art von Rekombination sind homologe doppelsträngige DNA-Abschnitte erforderlich. Verschiedene DNA-Stränge, die eine große Ähnlichkeit in ihrer Nukleotidsequenz aufweisen, werden als homolog bezeichnet. Dies ist in der Natur im Zuge einer Zellteilung (Mitose) oder auch Reifeteilung (Meiose) der Fall, da es dabei zu einer Verdoppelung der DNA einer Zelle kommt. Nach einer parallelen Anordnung von zwei homologen DNA-Molekülen kann es durch homologe Rekombination zu einem Austausch (engl.: *crossing over*) der gepaarten DNA-Abschnitte kommen. Bei der Erstellung einer Knockout-Maus wird dieser zelleigene Reparaturmechanismus zunächst für das gezielte Ausschalten eines spezifischen Gens genutzt. Dafür werden ES-Zellen aus einer Mausblastozyste isoliert und kultiviert. Ein so genannter Zielvektor (DNA-Plasmid), der homologe Sequenzen des auszuschaltenden Gens enthält, wird anschließend in die ES-Zellen transfiziert. Aufgrund seiner homologen Sequenzen kann er sich so parallel zum Zielgen anordnen und mit ihm die DNA-Stränge austauschen. Zwischen und an einer Flanke der homologen Sequenzen trägt der Zielvektor ein Selektionsmarker (positiv und negativ), worüber ES-Zellen, die erfolgreich eine homologe Rekombination durchgeführt haben, identifiziert werden können. Nach der Rekombination ist die Sequenz des betreffenden Gens so verändert, dass es nicht mehr möglich ist, ein biologisch aktives Protein von ihm zu kodieren. Die ES-Zellen, die das nun genetisch veränderte bzw. deletierte Gen tragen, werden anschließend vermehrt und wiederum in eine Blastozyste injiziert. Sie vermischen sich daraufhin mit den Zellen der inneren Zellmasse. Der heranwachsende Embryo wächst dann als genetisches Mosaik auf, da er sich aus „normalen“ ES-Zellen der Blastozyste und den genetisch veränderten ES-Zellen entwickelt. Konnte das ausgeschaltete Gen auch in die Keimbahn eingeschleust werden, ist die künstlich herbeigeführte Gendeletion im Genom dieser Mäuse verankert und durch gezielte Verpaarung können dann homozygote Knockout-Tiere gezüchtet werden [229, 233]. Aufgrund der Deletion eines Gens entwickeln diese Mäuse einen spezifischen Phänotyp, wodurch es möglich ist deren Rolle beispielsweise in der Entwicklung, der normalen physiologischen Homöostase, aber auch bei bestimmten Krankheiten zu ermitteln. Da mehr als 99 % der Gene von Maus und Mensch analog sind, kann eine Knockout-Maus auch Erkenntnisse über die physiologische Rolle eines Gens bei Menschen liefern [234] und ist somit ein für die Forschung essentielles Modell.

2.7 Ziele der Arbeit

Die Zerstörung von Lungengewebe im Zuge von Lungenerkrankungen kann derzeit nur palliativ behandelt werden und stellt sich als ein wachsendes Problem in der Pneumologie dar. Seit mehr als 130 Jahren ist bekannt, dass ein Verlust von Lungengewebe nach Pneumonektomie durch die verbliebene Lunge kompensiert werden kann. Ein besseres Verständnis der Regulation dieses Kompensationsprozesses eröffnet neue Perspektiven für die Entwicklung effizienter regenerativer Therapieansätze, die zu einer kurativen Behandlung verschiedener Lungkrankheiten führen könnten.

Nach dem Verlust von gasaustauschendem Gewebe und der damit einhergehenden mechanischen Belastung der verbliebenen Lunge führt kompensatorisches Lungenwachstum zu einer rapiden Neubildung von gasaustauschendem Gewebe. Dies führt letztendlich zu einer nahezu kompletten Wiederherstellung des Volumens, Masse, Struktur und der Funktion der verbliebenden Lunge auf ein Niveau vergleichbar mit der gesamten Lunge eines nicht-pneumonektomierten Tieres. Ein wichtiger Bestandteil dieser strukturellen und funktionellen Veränderungen des kompensatorischen Lungenwachstums ist die Neubildung von Alveolen.

Elastische Fasern mit ihrem Hauptbestandteil Elastin sind ein wichtiger Bestandteil des strukturellen Gerüsts (Extrazellulärmatrix) der Alveolen. Für die Bildung von Alveolen während der Entwicklung der Lunge sind elastische Fasern enorm wichtig. Bis heute ist kaum verstanden, welche molekularen Mechanismen dem kompensatorischen Lungenwachstum zu Grunde liegen und ob damit eine Reaktivierung von Prozessen der Lungenentwicklung (z.B. der Alveolarisierung) verbunden ist.

Da die Extrazellulärmatrix bzw. elastische Fasern nicht nur während der Alveolarisierung sondern auch bei der durch mechanische Kräfte bedingten Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums eine wichtige Rolle spielen, sollte im Rahmen dieser Dissertation die Bestandteile und Assemblierungsfaktoren von elastischen Fasern sowie ausgewählte extrazellulärmatrixmodulierende Faktoren (TnC, Timp1) bezüglich ihrer Rolle während des kompensatorischen Lungenwachstums näher untersucht werden.

Weiterhin sollte der Transkriptionsfaktor Egr1 und auch dessen potentieller Einfluss auf die zuvor untersuchten Kandidatengene (TnC, Timp1, Elastin) im Zuge des kompensatorischen Lungenwachstums analysiert werden.

Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

- Tritt das postnatale – für die Assemblierung funktioneller elastischer Fasern wichtige – Genexpressionsmuster der Komponenten elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren auch während des kompensatorischen Lungenwachstums auf?
- Kommt es im Zuge der Neubildung von Alveolen auch zu einer Neubildung elastischer Fasern?
- Wie ist das detaillierte Expressionprofil der Gene TnC, Timp1 und Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums?
- Welcher Einfluss hat eine Deletion von TnC, Timp1 oder Egr1 auf das kompensatorische Lungenwachstum
- Hat Egr1 regulatorische Effekte auf die Expression von TnC, Timp1 oder Elastin während des kompensatorischen Lungenwachstums?

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 3.1: verwendete Laborgeräte

Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese	Gleichstromquellen	EV261	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
		PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zentrifugen	Tischzentrifuge	Multifuge 1S	Heraeus/ Thermo- Scientific Waltham, USA
		Multifuge 35R	Heraeus/ Thermo- Scientific Waltham, USA
	Kühlzentrifuge	Fresco 17	Heraeus/ Thermo- Scientific Waltham, USA
		Centrifuge 5430 R	Eppendorf Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf, Deutschland
	Minizentrifuge	C130 1T	Labnet international, Edison, USA
Messgeräte	Photometer	ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	PCR-Gerät	Real-time System CFX 96	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Messgeräte (Fortsetzung)		ViiA 7 Real-time PCR System	ABI/ Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
		Mastercycler gradient 5333 Thermocycler	Eppendorf Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf, Deutschland
		Mastercycler ep gradient 5341 Thermocycler	Eppendorf Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf, Deutschland
	pH-Meter	PH 211	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
	Photospektrometer	Smart Spec™ Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
		NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	Beatmungssystem zur Messung der Lungenfunktion	FlexiVent	Scireq Inc., Montreal, Kanada
	Bildgebende Systeme	Nanozoomer OHT 2.0	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee
		Image Quant LAS 4000	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
		Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kühl- und Gefrierschränke	+ 4°C	STA++ 305L CP 3501	Liebherr, Heidesheim, Deutschland
	- 20°C	STA 358 CP 3501	Liebherr, Heidesheim, Deutschland
	- 80°C	HEF	New Brunswick Scientific/ Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Geräte für histologische Untersuchungen	Heizthermomixer	MHR 23	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
	Paraffinausgießstation	EG 1160	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Heizplatte	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Microtom	RM 2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Paraffin- Gewebeinfiltrationsautomat	ASP 200S	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Kryotom	HM 500 0	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland
Geräte für Zellkultur	Sterile Werkbank	Labguard Class II, Typ B1	NUAIRE, Plymouth, USA

	Brutschrank	DHD Autoflow CO ₂ Air-Jacketed incubator	NUAIRE, Plymouth, USA
	Zählkammer für Zellen	Neubauer- Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
	Mikroskop	PrimoVert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD
Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sonstige	Elektrophoresekammer	Model 40-1214	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
		MiniProtean Tetra	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	Feinwaage	Pinnacle	Denver Instruments/ Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
		EK 300i	A & D Instruments Ltd., Abingdon, GB
	Fluoreszenzmikroskop	Z1 Axio	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
		DM 6000 B	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
	Homogenisierer	Precellys 24	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	Mikrowelle	R93ST-AA	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
	Pipetten	1-20 µl, 20-200 µl und 100-1000 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland

	Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Vortex-Schüttler	Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA

Art	Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sonstige (Fortsetzung)	Mechanischer Stimulator für Zellkulturexperimente	Eigenbau	institutseigene Werkstatt
	Gewebeschneideblock	Eigenbau	institutseigene Werkstatt

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 3.2: verwendete Chemikalien

Chemikalie/Lösung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis (Roti-Phorese Gel 30)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO ultra	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau G-250	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Deoxycholinsäure Na-Salz	Fluka Analytical, Schweiz
Di-natriumphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium Xylo-löslich (Entellan ®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethanol unvergällt (Emsure®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka Analytical, Schweiz
Formaldehyd 4%	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland

Gelatine (procine skin)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Glycerin 99,5% p.a.	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kernechtrot Aluminium-Sulfat	Waldeck GmbH Münster, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie/Lösung	Hersteller
MOWIOL	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH; Pellets)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Paraplast Plus ® (Paraffin Einbettmedium)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Waldeck GmbH Münster, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (N ₂), flüssig	Linde AG Pullach, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol/ 2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

3.1.3 Laborbedarfsartikel

Tabelle 3.3: verwendete Laborbedarfsartikel

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Beschichtete Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm ²): 14,5/145; 9,4/58 und 6,0/21	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Deckgläser	24 x 36 mm	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten	Rotilabo®	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe	Roti-protect Nitril	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Auslaufpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Einwegspritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Haushaltsbindfaden	Nr. 12	

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Homogenisiergefäße	Precellys Keramik-Kit 1.4 mm	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Kanülen	20G, 24G, 26G, 27G, 30G	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Mikrotomklingen	MB Dynasharp	Thermo-Scientific Waltham, USA
Objekträger	SuperFrostPlus (26 x 76 mm) SuperFrost Ultra Plus® (26 x 76 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Multiplate™ Low-Profile 96-Well Unskirted PCR Plates MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate PCR 8er Streifen und Deckel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pinsel		Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Plastikpipettenspitzen	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Plastikpipettenspitzen mit Filter	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
PP-Falconröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 1,5 ml und 2,2 ml Safe-Lock	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland

	Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Selbstklebende Folien für 96-Loch PCR-Platten	Microseal® 'B' Adhesive Seals, Optical MicroAmp® Optical Adhesive Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland
Sterilfilter	0,45 µm, 0,2 µm	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen Filter Top	Kulturflasche/Volumen: 75/250 und 25/50	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Zellkulturplatten 6-Loch mit flexiblem Boden	BioFlex® plate	Flexcell International Corporation, Hillsborough, USA
Zellkulturplatten, 12-Loch	Kulturfläche je Loch: 3,8 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 6-Loch	Kulturfläche je Loch: 9,6 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	25 cm steril	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

3.1.4 Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka

Tabelle 3.4: verwendete Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka

Artikel	Beschreibung	Hersteller
sterile Glukoselösung	Glucosteril 5%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
50 %-ige 2-Propanol/1 %- ige Providonjod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Anästhetika/ Analgetika	Carprofen (Rimadyl®) Buprenorphin (Temgesic®)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin Boehringer Mannheim, Deutschland

	Metamizol	Medistar GmbH Deutschland, Ascheberg
	Xylazin (Rompun 2%)	Bayer HealthCare AG Leverkusen, Deutschland
Augensalbe	Bepanthen®	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Beatmungspumpe	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Enfluranverdampfer	(umgebaut für Isofluran), Typ Enflurane Vapor 19.1	Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Kanülen	FineJect®	Henke-Sass Volt GmbH Tuttlingen, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Leukosilk®	BSN Medical Hamburg, Deutschland
Nahtmaterial	6/0 Seide, DSM 11	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Narkosegas	Isofluran CP	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Operationsbesteck	Mikro-Pinzetten Moria MC31 & 32	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
	Mikroschere ToughCut® Spring Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
	Nadelhalter Castroviejo	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
PET-Schläuche	mit unterschiedlichen Durchmessern	

Pulmonalkanülen-Spitze		Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Reiniger für Instrumente	Helizyme®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Schleimhautantiseptikum	Betaisodona®	Mundipharma GmbH, Limburg/ Lahn, Deutschland
Skalpell	Einwegskalpelle Cutfix Ref 5518059	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Stereo-Labor-Mikroskop	Typ SLM1, Kaltlicht	Karl Kaps GmbH, Aßlar, Deutschland
Venenverweilkanüle	Vasocan®, 20G	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Wärmeplatte	Thermoplate S	Desaga
Artikel	Beschreibung	Hersteller
Zellstofftupfer	Pur-Zellin® (4 x 5 cm)	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ketavet®	
Xylazinhydrochlorid	Rompun® 2 %	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Lidocainhydrochlorid	Xylocain®	Astra Zeneca Wedel, Deutschland

3.1.5 Kulturmedien, Medienzusätze und Zelllinien

Tabelle 3.5: verwendete Medien, Lösungen, Zelllinien und Medienzusätze für Zellkulturuntersuchungen

Komponente	Bemerkung	Hersteller
2,5% Trypsin	Artikelnr.: 15090	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase B	Artikelnr.: 11088815001	Roche Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12	Artikelnr.: 21331	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, GlutaMax mit Pyruvat	Artikelnr.: 31966	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ohne Glukose	Artikelnr.: 11966	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg	Artikelnr.: H15-002	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Fötales Bovines Serum	FBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Fötales Kälberserum	FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Artikelnr.: 14065	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)		PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Transformierender Wachstumsfaktor β 1(Tgf β 1)	Artikelnr.: 7666-MB-005	R&D Systems Minneapolis, USA
Gewebeinhibitor von Metalloproteasen (Timp1)		Columbia University, New York, USA
Small Airway Epithelial Cells	hSAEC	Columbia University, New York, USA
SABM™ Medium	Basismedium von hSAEC	Lonza Köln GmbH, Deutschland
SAGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors	Zusätze zum Basismedium von hSAEC	Lonza Köln GmbH, Deutschland

3.1.6 Kits und Standards

Tabelle 3.6: verwendete Kits und Standards für molekularbiologische Untersuchungen

Name	Hersteller
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems/Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland
ImmoMix™ Red	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad München, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	Bio-Rad München, Deutschland
Protease- und Phosphataseinhibitionscocktail	Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
RIPA	Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR® Select Master Mix	Applied Biosystems/Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland
DC Protein Assay	Bio-Rad München, Deutschland

3.1.7 Oligonukleotide

Alle Primer für Polymerase Kettenreaktionen („polymerase chain reactions“; PCR) und quantitative Real-Time -PCR (qRT-PCR)- Analysen wurden von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. Alle spezifischen Sequenzen der jeweiligen Primer wurden über das Tool „Primer-BLAST“ auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt.

Tabelle 3.7: Sequenzen der verwendeten Primer für Analysen muriner mRNA

Gen	Bezeichnung Primer	Sequenz (5´-3´)	Gen Bank Nummer/ Beschreibung	Länge PCR Produkt (bp)
BMP 1	mBMP1_for	GGCTACAGGCAACCGCATGTTC	NM_009755.3	168
	mBMP1_rev	CCTCCAGGGTAGTTGTTATCGCCG		
Egr1	mEGR1_for	GAGCGAACAACCCTATGAGCA	NM_007913.5	109
	mEGR1_rev	CAACCGAGTCGTTTGGCTG		
	mEln_for	AAGCCTGGGAAAGTTCCTGGTGTTG		

Gen	Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Gen Bank Nummer/ Beschreibung	Länge PCR Produkt (bp)
Elastin	mEln_rev	CTTTGACTCCTGTGCCAGTGGGAAC	NM_007925.3	127
Fibrillin 1	mFbn1_for mFbn1_rev	CGTGCACCATCTGTCAACTTGATCC ACACTCGCACTTGAATGAACCCCTG	NM_007993.2	155
Fibrillin 2	mFbn2_for mFbn2_rev	GTCAGTGCCAGAAGGGATACATCGG CGGGCCTGTCCTGTAATCTCTTTTCG	NM_010181.2	155
Fibulin 1	mFbln1_for mFbln1_rev	ATTGCCGACGAGGTTACCAGCTC CAGCGGTAGGAGCAGATGTGACC	NM_010180.2	103
Fibulin 2	mFbln2_for mFbln2_rev	TGCAGAGGGCTATATCCTCAACGC AGCATTGGAAGGAACCTGGCGTG	NM_007992.2	122
Fibulin 3	mFbln3_for mFbln3_rev	CTCCCCTACGCACTCCTTCGC CGGTGCATTGCGTGTATGTGATGG	NM_146015.2	156
Fibulin 4	mFbln4_for mFbln4_rev	GTCCAGTGAGCTGCGCGGT TAGCTGTCCGGCTCCTCGGG	NM_021474.3	178
Fibulin 5	mFbln5_for mFbln5_rev	TGGATGATAACCGAAGCTGCCAGG ACAGCGGTTTTACCAATCAGCAG	NM_011812.3	158
LOX	mLOX_for mLOX_rev	CCCTACTACATCCAGGCTTCCACG GTCTCTGACATCCGCCCTATATGCTG	NM_010728.2	114
LOXL 1	mLOXL1_for mLOXL1_rev	GTGCAGCCTGGGAACACTACCTC ACTCAGATCAGGACTGGACGATTTTGC	NM_010729.3	157
LOXL 2	mLOXL2_for mLOXL2_rev	TGCCCCCTGGAGACTACCTGTTC CACTGAAGGCTCCACCTACGTGAC	NM_033325.2	153
MAGP 1	mMAGP1_for mMAGP1_rev	CTCTTGACTGCCGCGAAGAACAG GGAGGCTGTAGAAGCAGACCTCG	NM_008546.3	99
MAGP 2	mMAGP2_for mMAGP2_rev	GGACACACTCAGCAGCCAGAGG CACATCATCTCCGCGTTGACCAC	NM_015776.2	158

	mPBGD_for	ATGTCCGGTAACGGCGGC		
PBGD	mPBGD_rev	GGTACAAGGCTTTCAGCATCGC	NM_013551.2	138
	mTimp1_for	CACACCAGAGCAGATACCATGA		
Timp1	mTimp1_rev	TGGTCTCGTTGATTTCTGGGG	NM_001044384.1	187
	mTnC_for	CAGTGGACCTGCCTGGGCTC		
TnC	mTnC_rev	GTGAGGCCGTCCCAGCTGAC	NM_011607.2	163

Tabelle 3.8: Sequenzen der Primer für Genotypisierungen

Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Gen Bank Nummer/ Beschreibung	Länge PCR Produkt (bp)
Egr-1_KO VP	GAGTGTGCGCTCAGTAGCTT	Common	
Egr-1_KO RP WT	GGTGCTCATAGGGTTGTTTCGCT	Wildtype Reverse	360
Egr-1_KO RP KO	AACGACTGTCCTGGCCGTAACC	Mutant Reverse	520
Timo1 KO: Geno_mut	CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA	Mutant Reverse	393
Timp1 KO Geno_common	GCCATCAGGAAAGAGAGTGG	Common	
Timp1 KO Geno_wt	CGGCCTGTAAGAGAAGCAAG	Wildtype Reverse	200
TNC_Geno1	GGTACCTGATTCCGAAGTGCATTGTCACG		
TNC_Geno3	AAGCTAGAAAGATGCCTGGC	Wildtyp	904
TnC_neo_KO_for	TGAATGAACTGCAGGACGAG		
TnC_neo_KO_rev	AATATCACGGGTAGCCAACG	KO	515

3.1.8 Versuchstiere

Tabelle 3.9: verwendete Versuchstiere

Inzuchtmausstamm	Beschreibung	Herkunft
C57BL/6J	Wildtyp	Charles River Deutschland GmbH
129/Sv	Wildtyp	Charles River Deutschland GmbH
B6N;129-Egr1tm1Jmi/J	Egr1 knockout	JAX® Mice and Services bezogen über Charles River Deutschland GmbH
B6.129S4-Timp1tm1Pds/J	Timp1 knockout	JAX® Mice and Services bezogen über Charles River Deutschland GmbH
TnC-Null-Stamm von Forsberg [235]	TnC knockout	Ruhr Universität Bochum, R. Fässler Fakultät für Biologie, Bochum

Die Tiere wurden im Tierstall des Max-Planck Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim für den Zeitraum der Versuche gehalten und gezüchtet. Die Tiere wurden in individuell ventilierten Käfigen des Systems „Blueline“ und/oder „Greenline“ („Individually Ventilated Cages“; IVC) der Firma Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpeißenberg) mit Einstreu, Nistmaterial und Versteckmöglichkeiten gehalten, wobei die Tierzahl in den einzelnen Käfigen den Standard-Haltungsbedingungen entsprach. Die Fütterung (Altromin 1324, Haltungsdiät für Mäuse) und die Wasserzufuhr (autoklaviertes Leitungswasser) der Mäuse erfolgte *ad libitum*. Der Tag-/Nachtrhythmus im Tierstall betrug 13/11 Stunden, die mittlere Umgebungstemperatur lag bei 20 - 23 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug 40 - 70 %. Nach dem Erhalt eines Zuchtpaares der jeweiligen transgenen Inzuchtstämme (siehe Tabelle 3.9) wurden diese Linien in der institutseigenen Tierhaltung für die Versuchsvorhaben entsprechend gezüchtet. Wildtypiere wurden von der Firma Charles River Deutschland GmbH (Alter 6-8 Wochen) oder aus der Zucht der transgenen Stämme bezogen. Alle Experimente wurden entsprechend der EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt und zuvor durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Die dazu gehörenden Tierversuchsanträge können unter den Aktenzeichen B2/324, B2/195 und B2/269 eingesehen werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums

Kompensatorisches Lungenwachstum lässt sich durch die operative Entfernung eines oder mehrerer Lungenlappen induzieren [56]. In dieser Arbeit wurde eine Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums durch eine unilaterale Pneumonektomie (PNX) hervorgerufen, indem die gesamte linke Lunge von 10 Wochen alten Mäusen operativ entfernt wurde. Für die Versuche wurden speziell für Tierversuche gezüchtete 10 Wochen alte Mäuse (*Mus musculus*) verwendet, die von Wildtyplinien (C57BL/6J) oder von Linien mit einer spezifischen Gendeletion (Egr1 ko, Timp1 ko) abstammen (siehe Tabelle 3.9.).

3.2.1.1 Zucht der Wildtyp- und Knockout-Tiere

3.2.1.1.1 Wildtyptiere

Für die molekularbiologischen Expressionsanalysen des kompensatorischen Lungenwachstums (Abbildung 3.2) wurden Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6J von der Firma Charles River Deutschland GmbH bezogen. Um eine Eingewöhnungszeit der Tiere an die neue Umgebung zu gewährleisten, wurden die Mäuse in einem Alter von 6-8 Wochen geliefert. C57BL/6J bzw. 129/Sv (als Kontrolle für TnCko Experimente) Wildtyptiere für die stereologischen Analysen, wurden nach dem Erhalt eines Egr1 ko, Timp1 ko bzw. TnC ko-Zuchtpaares aus der Verpaarung dieser Tiere gewonnen (3.2.1.1.2, 3.2.1.1.3).

3.2.1.1.2 Egr1 Knockout-Tiere

Um Wildtyp- und Egr1 ko-Tiere für die stereologischen Analysen nach Pneumonektomie zu erhalten, wurden heterozygote Egr1 ko Weibchen mit heterozygoten Egr1 ko-Männchen verpaart, da homozygote Tiere mit dieser Gendeletion infertil sind. Bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 8 Jungen, waren gemäß den Mendelschen Regeln statistisch zwei homozygote-, zwei heterozygote- und vier Wildtyp- Nachkommen pro Wurf zu erwarten (Tabelle 3.10). Der Genotyp der einzelnen Tiere wurde mit Hilfe einer spezifischen Genotypisierungs-PCR bestimmt (3.2.5.5.1.1).

Tabelle 3.10: mögliche Genotypen nach der Verpaarung eines heterozygoten Egr1 ko-Weibchens ($Egr1^{+/-}$) mit einem heterozygoten Egr1 ko-Männchen ($Egr1^{+/-}$)

Genotyp Elterntiere $Egr1^{+/-}$	+	-
	Genotyp F-Generation	
+	$Egr1^{+/+}$	$Egr1^{+/-}$
-	$Egr1^{+/+}$	$Egr1^{-/-}$

Die homozygoten Egr1 ko-Tiere und die Wildtypen wurden für die entsprechenden Versuchsgruppen (Egr1 ko bzw. C57BL/6J Wildtyp) verwendet. Heterozygote Männchen und Weibchen wurden weiter verpaart.

3.2.1.1.3 Timp1 Knockout-Tiere

Um Wildtyp- und Timp1 ko-Tiere für die stereologischen Analysen nach Pneumonektomie zu erhalten, wurden heterozygote Timp1 ko-Weibchen mit hemizygoten Timp1 ko Männchen verpaart. Bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 8 Jungen waren gemäß den Mendelschen Regeln und unter Berücksichtigung der Lokalisation des Timp1-Gens auf dem X-Chromosom statistisch je zwei heterozygote und homozygote Weibchen, sowie je zwei Wildtyp-Männchen und hemizygoten Männchen zu erwarten. Der Genotyp der einzelnen Tiere wurde mit Hilfe einer spezifischen Genotypisierungs-PCR bestimmt (3.2.5.5.1.2).

Tabelle 3.11: mögliche Genotypen nach der Verpaarung eines heterozygoten Timp1 ko-Weibchen (XX^{Timp1-}) mit einem hemizygoten Timp1 ko-Männchen ($X^{Timp1-}Y$)

Genotyp Elterntiere	X^{Timp1-}	Y
	Genotyp F1 Generation	
X	XX^{Timp1-}	XY
X^{Timp1-}	$X^{Timp1-}X^{Timp1-}$	$X^{Timp1-}Y$

Die homozygoten- bzw. hemizygoten Timp1 ko-Tiere und die Wildtypen wurden für die entsprechenden Versuchsgruppen (Timp1 ko bzw. C57BL/6J Wildtyp) verwendet. Heterozygote Weibchen und ein Teil der hemizygoten Männchen wurden weiter verpaart.

3.2.1.1.4 TnC knockout-Tiere

Um TnC ko-Tiere für die stereologischen Analysen nach Pneumonektomie zu erhalten, wurden homozygote TnC ko-Weibchen mit homozygoten TnC ko-Männchen verpaart. Bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 8 Jungen, sind alle Nachkommen homozygot ko für das Gen TnC. Zur Bestätigung des Genotyps der erhaltenen Tiere wurde eine spezifische Genotypisierungs-PCR durchgeführt (3.2.5.5.1.3). Da das erhaltene TnC ko-Zuchtpaar einen anderen Zuchthintergrund (129/Sv) als die anderen verwendeten transgenen Inzuchtstämme hatte, war eine weitere Wildtyp-Pneumonektomiegruppe und Wildtyp-Sham-Gruppe nötig, da der Zuchthintergrund der Tiere zum Teil einen sehr großen Einfluss auf die Lungenmorphologie (z.B. Lungenvolumen, Alveolenzahl) hat [236]. Die Wildtypkontrollen für die stereologischen TnC ko-Untersuchungen wurden von Charles River Deutschland GmbH bezogen.

3.2.1.2 Durchführung der Pneumonektomie

Alle chirurgischen Eingriffe erfolgten mit sterilen bzw. zuvor autoklavierten Operationsbesteck und Materialien. Als präventive Schmerztherapie wurde Metamizol im Trinkwasser bereits 24h vor der Operation verabreicht. Eine halbe Stunde vor der Narkoseeinleitung wurde das Tier durch eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,1 mg/kg) analgesiert. Für die Anästhesie wurde eine Isofluran-Inhalationsnarkose eingesetzt. Zur Einleitung der Narkose wurde das Tier für 3-5 Minuten in eine gasdichte Kammer gesetzt. Mit Hilfe eines Isofluranverdampfers wurde ein Gemisch aus Sauerstoff (100%; 1,5 l/min) und Isofluran (5 Vol.-%) in die Kammer eingeleitet. Nach eingeleiteter Narkose wurden die Mäuse tracheal intubiert. Dazu wurde die narkotisierte Maus aus der Kammer entnommen und mit den oberen Schneidezähnen an einen horizontalen Draht gehängt, der in einer Vorrichtung unter einem binokularem Operationsmikroskop, mit integrierter Kaltlichtquelle verbaut war. Hierdurch konnte mittels Sichtkontrolle über das Mikroskop bei geöffneter Epiglottis die Glottis identifiziert werden, nachdem mit einer oral eingeführten Pinzette der Zungengrund vorsichtig zur Seite geschoben und fixiert wurde. Als Tubus diente ein Venenverweilkatheter (20G), der mit einer speziell abgestumpften Vasocan®-Braunüle atraumatisch und unter Sichtkontrolle in die Trachea eingeführt wurde. Anschließend wurde das Tier an ein Beatmungsgerät (Hugo Sachs, Deutschland) angeschlossen und auf einer mit einem Tuch bedeckten Wärmeplatte (38°C) in leichter Rechtsseitenlage fixiert. Die mechanische Beatmung über den Trachealtubus diente zu einer adäquaten Oxygenierung als auch zum Erhalten der Narkosetiefe während der Operation. Desweiteren wurde so ein perioperatives Kollabieren der Lunge durch die thorakotomiebedingte Entstehung eines Pneumothorax verhindert. Die Beatmung erfolgte bei

einer Atemfrequenz von 150-200 min^{-1} bei einem Tidalvolumen von 170 μl mit einem Gemisch aus 100 % Sauerstoff und 2 % Isofluran.

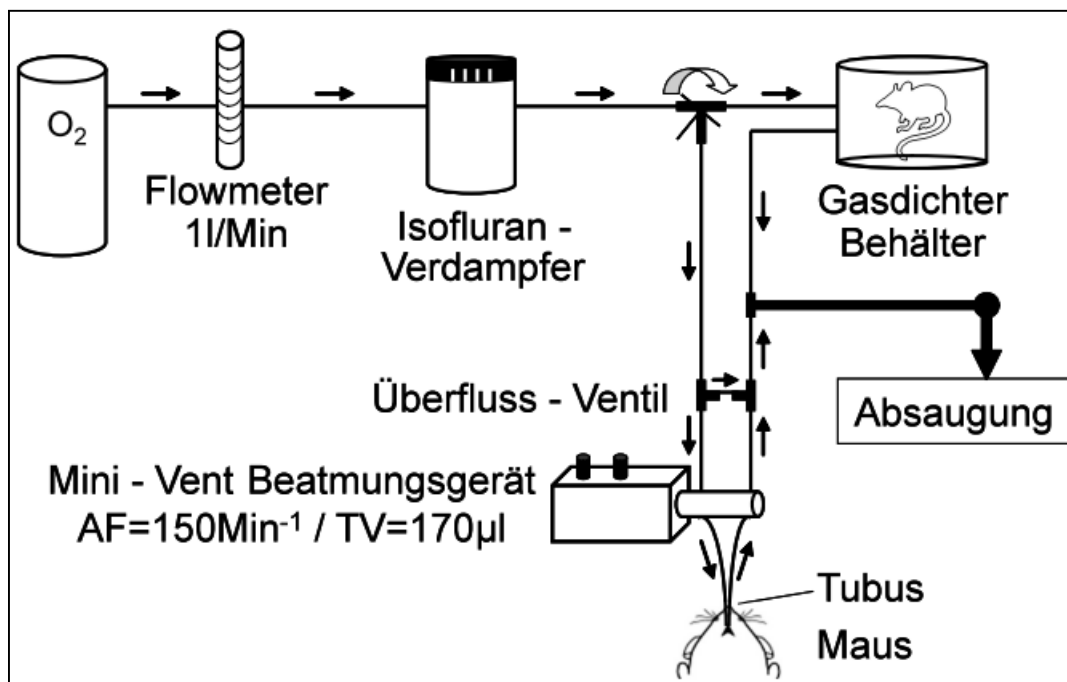


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des Narkosesystems

AF = Atemfrequenz, TV = Tidalvolumen, \rightarrow = Gasfluss (Quelle: Timm Schäfer [237])

Während der Operation wurde auf die Augen eine Bepanthen®-Augensalbe aufgetragen, um eine Austrocknen der Augen zu verhindern. Weiterhin erfolgte eine sorgfältige Rasur der linken Thoraxwand der Maus sowie eine Hautdesinfektion mit Braunoderm®. Anschließend wurde mit einem Einwegskalpell (Klingenform 11) eine maximal 1 cm lange Hautinzision auf Höhe des 5. Interkostalraumes entlang einer gedachten Linie zwischen *Processus xiphoideus sterni* (Schwertfortsatz des Sternums) und der *Axilla* (Achselhöhle) gesetzt. Anschließend wurde mit einer Mikroschere die thorakalen und interkostalen Muskelschichten durchtrennt und die *Pleura parietalis* (Rippenfell) ohne Traumatisierung des darunterliegenden Lungengewebes eröffnet. Über die so entstandene Öffnung des Thorax wurde eine vorbereitete Schlinge aus 6/0-Seide gelegt. Mit Hilfe von zwei gebogenen Pinzetten wurde die linke Lungenhälfte fixiert und vorsichtig aus dem Thorax durch die Schlinge gezogen. Durch das Festziehen der Schlinge am *Hilus* (Ort der zu- und abführenden Gefäße/Bronchie) der linken Lunge, wurde diese vollständig abgebunden. Die Resektion der abgebundenen Lunge wurde nahe der Ligatur durchgeführt. Anschließend wurde der verbleibende Hilusstumpf reponiert und der Thorax unter Einbeziehung der angrenzenden Rippen mit chirurgischem Nahtmaterial (6/0 Seidenfaden) vernäht. Die Hautnaht erfolgte mit Einzelknopfnähten nach Bedarf. Nach dem Verschluss der Wunde wurde die Fixierung gelöst, die Maus gedreht und 1ml körperwarme sterile Glukoselösung

(5 %) subkutan in den Rückenbereich der Maus injiziert. Dies diente als Ausgleich eines eventuell aufgetretenen Volumenmangels. Zur Beendigung der Narkose wurde die Isofluranzufuhr abgestellt und es folgte eine Nachbeatmung mit 100 % Sauerstoff. Nach dem Einsetzen einer ausreichenden Spontanatmung wurde der Maus der Beatmungstubus entfernt. Postoperativ wurden alle Tiere gegen Auskühlung geschützt (Wärmematte) und intensiv nachbeobachtet. Die postoperative Schmerztherapie wurde mit Metamizol im Trinkwasser bis zum Ende des Versuches oder bis Tag 5 fortgeführt. Buprenorphin wurde bis zum Ende des Versuches oder die ersten drei Tage zweimal täglich nachdosiert (0,1 mg/kg). Nach drei Tagen war die Operationswunde nahezu komplett verheilt.

3.2.1.3 Sham-Operation

Als Kontrolle zu den pneumonektomierten Tiergruppen dienten Mäuse, die einer sogenannten Sham (Imitations)-Operation unterzogen wurden. Hierbei erfolgte der Operationsablauf analog einer Pneumonektomie (3.2.1.2), jedoch wurde hierbei nur eine Thorakotomie ohne Auslösung eines Pneumothorax präpariert und keine Resektion der linken Lunge durchgeführt. Die Wunde wurde anschließend wieder verschlossen und die Mäuse postoperativ wie unter 3.2.1.2 beschrieben versorgt.

3.2.2 Versuchsgruppen

Für Expressionsanalysen wurde bei adulten Wildtypmäusen (Alter: 10 Wochen) mittels PNX kompensatorisches Lungenwachstum induziert. Sham-operierte Tiere gleichen Alters dienten als Kontrolle und Vergleichsbasis. Untersucht wurden frühe initiale Stadien (1h, 3h, 6h, 12h). Weiterhin wurde jeweils an den Tagen 1-8 sowie 10 und 12 Tage nach PNX/Sham-Operationen die Lungen für Expressionsanalysen isoliert. Zusätzlich wurden an Tag 1 nach Einsetzen des kompensatorischen Lungenwachstum Egr1 ko-Mäuse untersucht (Abbildung 3.2). Zum Vergleich der Expression der untersuchten Gene mit der postnatalen Alveolarisierung wurden weiterhin die Lungen von Wildtypmäusen mit einem Alter von postnatal (p) 1, 3, 5, 8, 10 und 12 Tagen untersucht. In allen Versuchen wurde bei jeder Gruppe ausschließlich die rechte Lunge analysiert.

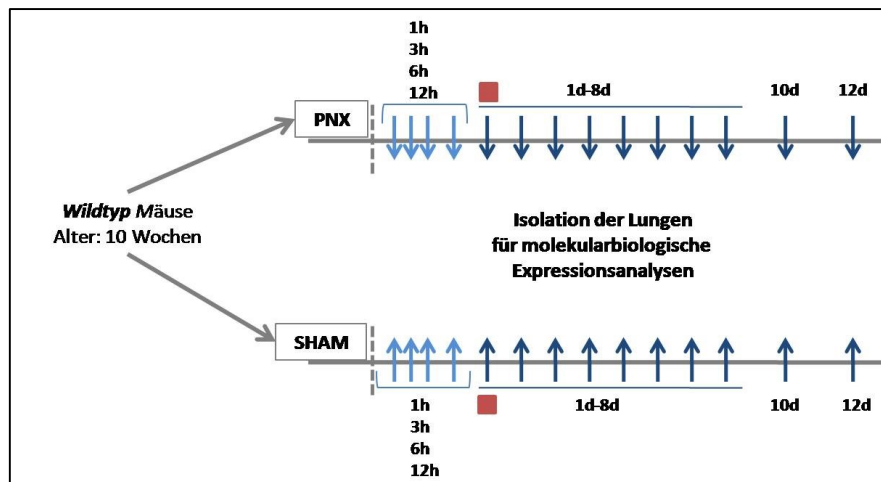


Abbildung 3.2 Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für molekularebiologische Expressionsanalysen an Wildtypmäusen

h = Stunden Post-PNX (hellblaue Pfeile); d= Tage Post-PNX (dunkelblaue Pfeile)

■ = Zeitpunkt (1d) der Lungenisolation bei *Egr1ko* Mäusen

Zur Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums wurden in einer weiteren Studie adulte Wildtyp- sowie *Timp1*-, *TnC*- und *Egr1* ko-Mäuse (Alter: 10 Wochen) pneumonektomiert. Hierbei sollte der Einfluss der genannten Gendelektionen auf die Fähigkeit zur Kompensation nach Verlust von Lungengewebe evaluiert werden. Die Analyse der Wildtypmäuse diente hierbei als Vergleichsbasis für die Knockout-Untersuchungen. Unablässig im Aufbau des Versuches waren weiterhin Sham-operierte Wildtyp- sowie Knockout-Tiere, die als Kontrolle der Pneumonektomiegruppen verwendet wurden. An den Tagen 1 und 3 nach den jeweiligen Operationen (PNX/Sham) wurden die Lungen der *Egr1* bzw. *TnC* Knockout- und Wildtypiere für stereologische Analysen mittels Stereologie isoliert (Abbildung 3.3). Bei dem Experiment mit *Timp1* ko-Mäusen wurde zusätzlich Tag 7 nach der Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums analysiert (Abbildung 3.4).

Bei Erreichen des Zeitpunktes zur Lungenisolation wurden die Versuchstiere durch Inhalation von Isofluran getötet. Hierzu wurden die Tiere in ein abgedichtetes Gefäß gesetzt, in das Isofluran zunächst langsam eingeleitet wurde. Erst nach vollständiger Narkotisierung der Tiere wurde eine letale Konzentration zugeführt. Die Entnahme der Lungen erfolgte nach Eintritt des Todes und wurde für die jeweiligen Analysen entsprechend durchgeführt (3.2.5.1, 3.2.4.1).

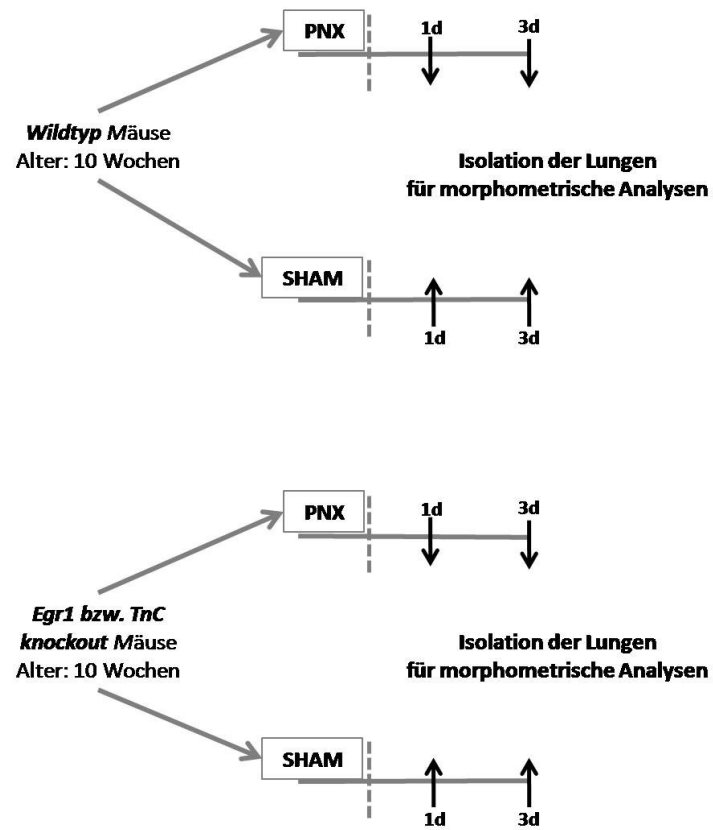


Abbildung 3.3: Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für stereologische Analysen an Wildtyp- und Egr1 bzw. TnC Knockout-Mäusen
d= Tage Post-PNX

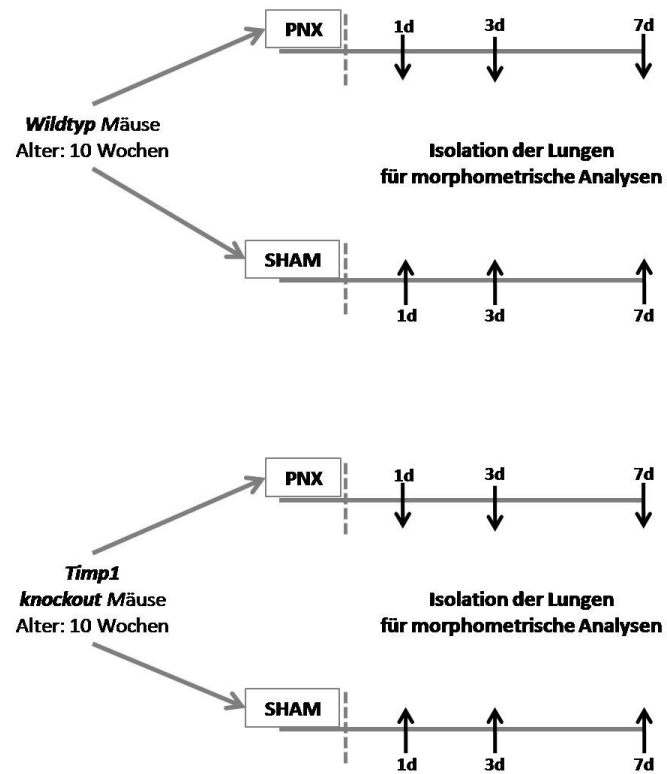


Abbildung 3.4: Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für stereologische Analysen an Wildtyp- und Timp1 Knockout-Mäusen
d= Tage Post-PNX

3.2.3 Messungen der Lungenfunktion

Über die Analyse von atemmechanischen Daten können Veränderungen des Lungengewebes und der Lungenstrombahn, einschließlich der damit verbundenen Druckveränderungen erfasst werden. Hierzu wurde die FlexiVent™-Plattform, mit der dazugehörigen Software FlexiWare 7, eingesetzt. Dieses Beatmungssystem ermöglicht eine kontrollierte mechanische Beatmung der Versuchstiere, wobei respiratorische Manöver (siehe Tabelle 3.12) zur Messung der Atemmechanik durchgeführt werden.

Zur Verbindung der Versuchstiere mit der FlexiVent™-Plattform und Messung der Lungenfunktion war eine Tracheotomie unter Injektionsnarkose erforderlich. Die Anästhesie wurde nach dem Wiegen der Maus mittels einer intraperitonealen (i.p.) Injektion mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, 50 mg/kg) und Xylazin (Rompun® 2 %, 10 mg/kg) eingeleitet. Der Ausfall des Zwischenzehenreflexes (Flexorreflex) zeigte eine zur Tracheotomie nötige Narkosetiefe an. Dies wurde durch mehrmaliges festes Kneifen mit einer Pinzette an mindestens zwei Gliedmaßen getestet, um Schmerzempfinden während des finalen Eingriffs auszuschließen. Zur Erhaltung der physiologischen Körpertemperatur wurde das Tier nach Einleitung der Narkose sowie allen anderen Präparationen und Messungen auf eine Wärmeplatte (38 °C) gelegt. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, wurde die Maus in Rückenlage gebracht und das Fell im Halsbereich mit Braunoderm®-Lösung befeuchtet. Bevor dort eine Hautinzision vorgenommen werden konnte, wurden ca. 50 µl Lidocain (Lokalanästhetikum) subkutan in den ventralen Bereich des Halses injiziert. Nach dem Eröffnen der Haut wurden anschließend die Speicheldrüsen (*Glandulae mandibulares*) mit Hilfe von zwei feingebogenen stumpfen Pinzetten vorsichtig nach links und rechts gelagert, um die Trachea freizulegen. Weiterhin wurde die umliegende Muskulatur zur Seite präpariert, wodurch ein chirurgischer Faden unter die Trachea geführt und lose verknotet werden konnte. Um den Tubus (20G) in die Trachea einführen zu können, wurde sie zwischen zwei Knorpelspannen direkt unterhalb des Larynx eingeschnitten. Mit Hilfe des um die Trachea vorgeknöteten Fadens wurde der Tubus fixiert. Die nun tracheotomierte Maus konnte für die Lungenfunktionsmessungen an die FlexiVent™-Plattform angeschlossen werden. Dabei diente der Tubus als Verbindung zwischen der Trachea und dem FlexiVent™-Beatmungssystem. Von dem Tubus aus führte ein Inspirations- und Expirationsschlauch Y-förmig in das Gerät. Diese separaten Schläuche mündeten in eine Volumendosiereinheit (Zylinder, Kolben, Gasdosierventile), mit der die respiratorischen Manöver ausgeführt wurden. Durch Drucksensoren wurde dabei kontinuierlich der Atemwegsdruck und der Druck im Zylinder der Volumendosiereinheit gemessen. Nach deren Umwandlung in Spannungssignale wurden die zeitlichen Veränderungen aller respiratorischen Messwerte auf einem Computer/Bildschirm dargestellt und gespeichert. Vor Beginn eines Versuches musste eine

Kalibrations des Systems durchgeführt werden. Hierzu wurden mit einem Handmanometer 0cmH₂O und 40 cmH₂O eingestellt, wodurch das FlexiVent™-System eine automatische Kalibrierung der Manöver zum Messen der Lungenparameter durchführen konnte. Dies wurde bei offenem- und geschlossenem Schlauchsystem durchgeführt, womit die dynamischen Strömungseigenschaften des gesamten Systems (z.B. Tubus, Schläuche, Ventile) erfasst wurden, die bei der Analyse der dynamischen respiratorischen Parameter sonst die Ergebnisse verfälschen würden. Durch die Kalibration konnten die Messdaten der Versuchstiere bezüglich der dynamischen Strömungseigenschaften des FlexiVent™-Systems korrigiert werden. Zur Analyse der respiratorischen Parameter wurden folgende Manöver durchgeführt (Tabelle 3.12):

Tabelle 3.12: Abfolge der respiratorischen Manöver zur Lungenfunktionsmessung

Anzahl Ausführungen	Name	Manöver	Berechnung von
3	Deep Inflation v7.0	Blähung der Lunge bis zu einem Druck von 30 cmH ₂ O gefolgt von einem kurzen Anhalten des Atmens	- respiratorische Kapazität (ml/kg)
6	SnapShot 150 v7.0	1,2 s forcierte Oszillation bei 2,5 Hz	- dynamische Compliance (ml/cmH ₂ O)
6	Quick Prime-3 v7.0	3 s niederfrequente forcierte Oszillation (13 festgelegte Frequenzen zwischen 1 und 20,5 Hz)	- statische Compliance (ml/cmH ₂ O/kg)
3	Prime-8 v7.0	multifrequente forcierte Oszillation	- Resistance (cmH ₂ O.s/ml)
1	PVs-P v7.0	langsame kontinuierliche Blähung bis 30 cmH ₂ O und Deflation	- Elastance (cmH ₂ O/ml)
			- Tissue damping (cmH ₂ O/ml)

Die Bestimmung und Berechnung aller respiratorischen Parameter wurde mit Hilfe der Software FlexiWare 7 durchgeführt und in ein Tabellenkalkulationsprogramm (MS Excel) exportiert.

Folgende respiratorische Parameter wurden bestimmt:

- **respiratorische Kapazität (Inspiratory Capacity)** ist die Volumendifferenz zwischen der funktionellen Residualkapazität und der totalen Lungenkapazität. Sie setzt sich aus inspiratorischem Reservevolumen und Atemzugsvolumen zusammen und beschreibt die Luftmenge, die nach einer normalen Expiration eingeatmet werden kann.

- **dynamische/statische Compliance (Nachgiebigkeit):** wird definiert als Maß für die Dehnbarkeit einer Lunge.

$$- C = \frac{\Delta V}{\Delta P} = \text{ml/cmH}_2\text{O}$$

Sie wird aus dem Quotient von Volumenänderung und Füllungsdruck ermittelt. Daraus folgt, dass eine erhöhte Dehnbarkeit einer Lunge durch erhöhte Werte in der Compliance angezeigt wird.

Die statische Compliance wird zur Standardisierung der Messbedingungen bei statischen Atemmanövern (Beatmung wird bei einem bestimmten Druck ausgesetzt) unter flusslosen Bedingungen bestimmt. Hierdurch kommt es zu einem Druckausgleich über den Atemwegen und der oral gemessene Atemwegsdruck entspricht dann dem Druck in den Alveolen. Eine Bestimmung der Compliance während der ununterbrochenen Beatmung wird dynamische Compliance genannt. Hierbei spielen der Atemfluss und somit auch der resistive Druckabfall eine wichtige Rolle. Da nur am äußeren Tubusende bzw. innerhalb der FlexiVent™-Plattform die respiratorischen Messgrößen (Fluss, Volumen, Atemwegsdruck) gemessen werden können, beeinflusst der Tubuswiderstand die Analyse dynamisch gemessener Lungenfunktionen. Dies wird mit Hilfe von Koeffizienten, die mit dem Tubusdurchmesser und -länge korrelieren, korrigiert. Mittels dynamischer Druck-Volumenmessungen ist eine simultane Bestimmung der Compliance und Resistance möglich.

- **Resistance (Atemwegswiderstand)** ist der Widerstand, der beim Atmen überwunden werden muss. Er ist unter anderem abhängig von der Geometrie der Luftwege und ergibt sich aus dem Verhältnis von Druckdifferenz und dem pro Zeit ein- bzw. ausströmenden Volumen.

$$- R = \frac{p}{\Delta V/\Delta t} = \text{cmH}_2\text{O.s/ml}$$

Eine hohe Resistance zeigt eine Obstruktion/Konstriktion der Atemwege an.

- **Elastance (Steifigkeit)** ist der Kehrwert der Compliance und reflektiert das Maß der Energiekonservierung von Lungengewebe beim Atmen.
- **Tissue damping (Dämpfungsverhalten)** steht in naher Beziehung zur Resistance und reflektiert den Verlust von Energie im Lungengewebe beim Atmen.

3.2.4 Stereologische Analysen

3.2.4.1 Isolation der Lunge für stereologische Analysen

Zunächst wurden die Tiere mittels einer langsam angefluteten Überdosis Isofluran getötet (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Anschließend wurden sie in Rückenlage fixiert und die Bauchfläche mit 70%-igem Ethanol besprüht. Die Haut wurde medial von Abdomen bis Thorax sowie lateral unterhalb des untersten Rippenbogens mit einer Schere aufgeschnitten. Mit einer Federschere konnte daraufhin das Diaphragma vorsichtig entfernt und das Sternum medial bis zur Klavikula durchtrennt werden. Die so eröffneten Rippenbögen wurden mit einer gebogenen Kanüle (24G) seitlich fixiert, so dass die Lunge nach der Entfernung des Thymus und Pericardium gut zu sehen war. Zur späteren Fixierung des Katheters wurde die Trachea freipräpariert und ein Faden, der zunächst nur lose verknotet wurde, unter ihr hindurchgeführt. Daraufhin wurde der rechte Ventrikel mit einer Kanüle (20G) punktiert, wodurch die Lunge mit Hilfe einer Spritze mit 2 ml PBS (1x) vorsichtig blutfrei gespült wurde. Zum Abfluss der Spüllösung wurde zuvor der rechte Ventrikel eingeschnitten. Bevor die Trachea zwischen zwei Knorpelspangen mit einer Mikroschere quer eingeschnitten werden konnte, wurde die beim Spülen ausgetretene Spüllösung mit einem Tupfer aufgesogen. Der Tubus (abgestumpfte 20G Kanüle) konnte nun über den vorgenommenen Trachealschnitt eingeführt und mit dem vorgeknoteten Faden fixiert werden. Die tracheale Instillation erfolgte mit Paraformaldehydlösung (4 % PFA in 1x PBS) bei einem hydrostatischen Druck von 20 cmH₂O für 20 Minuten. Durch das Fixans Paraformaldehyd kommt es zu einer Denaturierung der Proteine in der Lunge, wodurch deren Strukturen stabilisiert und die enzymatische Aktivität eliminiert wird. Nach Beendigung der Fixierung wurde gleichzeitig mit der Entfernung des Tubus aus der Trachea, die Trachea mithilfe des verknoteten Fadens, der zuvor als Sicherung des Tubus diente, abgebunden, um einen Austritt der Fixierlösung nach der Fixation zu verhindern. Anschließend wurde die Lunge inklusive Herz und abgebundener Trachea vorsichtig aus dem Thorax geschnitten und in ein 50 ml-Röhrchen überführt, wo sie in 4 %-igem PFA in PBS über Nacht bei 4 °C nachfixiert wurde. Am nächsten Tag wurden die fixierten Organe mit PBS (1x) gewaschen und konnten in dieser Waschlösung maximal 3 Tage bei 4 °C gelagert werden. Für die weitere Aufarbeitung wurden das Herz und ein Großteil der Trachea von der Lunge abgetrennt.

3.2.4.2 Bestimmung des Lungenvolumens

Das Lungenvolumen (V_{Lung}) wurde mittels der Immersionsmethode nach Scherle bestimmt [238]. Hierzu wurden die Lungen vollständig und immer gleichermaßen tief in ein mit PBS gefülltes Gefäß eingetaucht. Die Lunge wurde für die Messung in ein verschließbares Sieb, das an einem vertikal beweglichen Stativsystem befestigt war, transferiert. Zuvor wurde eventuell noch anhaftende Flüssigkeit, welche die Messung verzerren würde, mit einem saugfähigen Tuch entfernt. Gemäß dem Archimedischen Prinzip entspricht das Volumen des verdrängten Wassers (PBS) dem des eingetauchten Körpers. Da die Dichte von Wasser 1g/ml beträgt kann die Masse dem Volumen gleichgesetzt werden, woraus folgt, dass die Masse des verdrängten Wassers seinem Volumen entspricht bzw. dem Volumen des eingetauchten Körpers. Die Dichte von PBS ist dabei der von Wasser nahezu identisch (1,05 g/ml).

Die Messung des Volumens einer Lunge erfolgte auf einer Waage und wurde für jede Lunge dreimal wiederholt. Vor jeder Messung wurde die Waage tariert, wobei das Stativ mit dem verschließbaren Sieb gleichermaßen tief in das Gefäß mit PBS eingetaucht wurde, wie bei den eigentlichen Messungen des Lungenvolumens.

3.2.4.3 Stereologie

Stereologie (von griechisch „stereos“ = fest, körperlich und „logos“ = Lehre; „Lehre des Körperlichen“) ist in der modernen Wissenschaft die räumliche Interpretation von planaren Schnitten, wobei vorwiegend Methoden der Geometrie und Statistik, insbesondere der stochastischen Geometrie zur Anwendung kommen [239]. So ist es mit stereologischen Methoden möglich, Aussagen über dreidimensionale Quantitäten aus der Analyse von zweidimensionalen Schnitten (z.B. Gewebeschnitten) zu treffen. Dazu werden für stereologische Auswertungen zufällige, systematische Stichproben verwendet, die ein gesamtes Gewebe repräsentieren, wobei Effizienz und Zeitaufwand in einem realistischen Verhältnis stehen sollen [240], [241]. Weiterhin gilt es die Variabilität eines Wertes so gering wie möglich zu halten, was eine Analyse frei von systematischen Fehlern („unbiased“; unbefangen) erfordert [242]. Somit ermöglicht die Stereologie mit einem akzeptablen (Zeit-) Aufwand einen präzisen Schätzwert zu erhalten.

3.2.4.3.1 Systematische, einheitliche, zufällige Probenauswahl („sampling“)

In den meisten Fällen ist es wegen des enormen Zeitaufwands nur schwer möglich, ein gesamtes Organ oder Gewebe im Hinblick auf bestimmte Merkmale quantitativ auszuwerten. Deshalb werden solche Organe meist stichprobenartig analysiert, wobei in der Stereologie die Proben so gewählt werden, dass sie nach der Auswertung das gesamte Organ repräsentieren. Dies ist gerade bei sehr heterogenen Geweben (z.B. Lunge) entscheidend, damit es zu keiner

Über- bzw. Unterrepräsentation von bestimmten Bereichen eines Gewebes kommt. Dies kann zu einem rein qualitativen- oder allenfalls semi-quantitativen Ergebnis führen. Damit jeder Bereich die gleiche Wahrscheinlichkeit hat, analysiert zu werden, müssen die Proben einheitlich zufällig (engl.: „*uniform random*“) gewählt werden [239-241, 243]. Außerdem sollte es sich um eine systematisch einheitlich zufällige Probenziehung (engl.: *systematic uniform random sampling*; SURS) handeln [244]. Bei diesem Verfahren wird lediglich die Wahl der ersten Position zufällig getroffen und die folgenden Positionen werden systematisch in einem stets einheitlich festgelegten Abstand/Muster von dieser Position ermittelt. Im Gegensatz zu einer einfachen zufälligen Probennahme ist hierdurch jeder Bereich eines heterogenen Gewebes zufällig aber gleichmäßig abgedeckt, was die Anzahl der Stichproben zur repräsentativen Darstellung eines Gewebes zum Teil enorm reduziert und dennoch hat jede Stelle des zu analysierenden Gewebes die gleiche Chance gezählt zu werden. Dieses Prinzip ist auf allen Stufen der stereologischen Analyse zu beachten.

Nach der Bestimmung des Lungenvolumens (3.2.4.2) wurden die Lungen für die weitere Prozessierung in 3 %igen Agar eingebettet. Dazu wurde die Agarose-Lösung (in 1x PBS) in der Mikrowelle aufgeköcht und danach auf ca. 60-65 °C abgekühlt, um das Lungengewebe durch die Hitze nicht zu zerstören. Anschließend wurde ein quadratisches Plastikgefäß (siehe Abbildung 3.5 A) mit der Agarose zur Hälfte befüllt, kurz angehärtet und eine Lunge daraufgelegt. Danach wurde die Lunge mit weiterer Agarose überdeckt. Dabei war darauf zu achten, dass die Lunge nach dem Erstarren des Agars frei schwebend innerhalb des Blocks eingeschlossen war, um das anschließende Schneiden zu erleichtern und Quetschungen auszuschließen. Zum systematisch einheitlich zufälligen Schneiden wurde die in Agar eingebettete Lunge in einen speziell gefertigten Gewebeschneideblock gegeben (siehe Abb. 1.5 B), worin sie transversal gleichmäßig in einem Abstand von 3 mm geschnitten werden konnte (siehe Abb. 1.5 C).

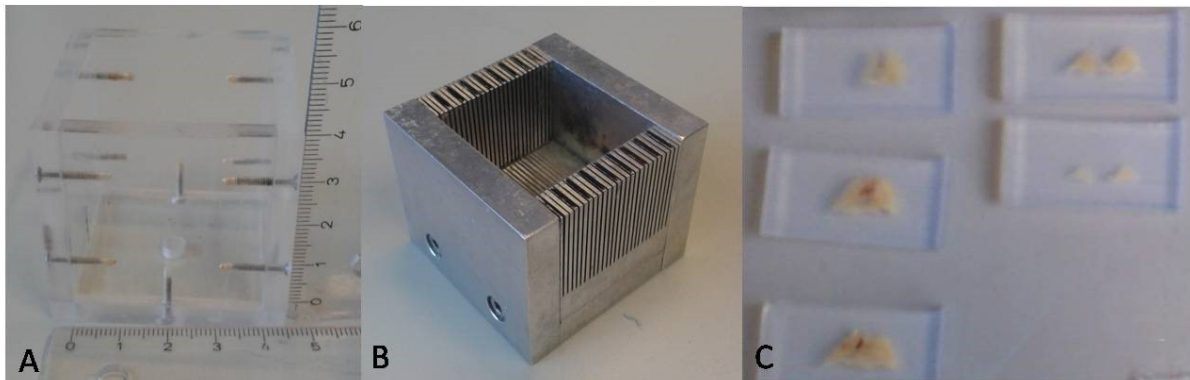


Abbildung 3.5: Prozessierung der Lungen für stereologische Analysen

A) Gefäß für die Agarose-Einbettung

B) Gewebeschneideblock

C) geschnittene in Agar eingebettete Lunge

Gemäß dem SUR-Sampling erfolgte der erste zufällige Schnitt außerhalb der Lunge. Nach der Entnahme der Scheiben wurden die Lungenstücke vorsichtig aus der Agarose gelöst und in gleicher Orientierung in eine mit Zellstoff ausgelegte Einbettkassette gelegt. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte maschinell durch einen Einbettautomat (Leica ASP200S). Das entwässerte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke konnten anschließend mit Hilfe eines Mikrotoms gemäß SURS in 3 μm dünne serielle Schnitte mit bekanntem Abstand zueinander geschnitten werden.

3.2.4.3.2 Elastika-Färbung

Für eine leichtere stereologische Analyse wurden die 3 µm dünnen histologischen Schnitte der Lungen (3.2.4.3.1) zur farblich isolierten Darstellung von elastischen Fasern einer Resorcin-Fuchsin-Färbung nach Weigert unterzogen.

Tabelle 3.13: Färbeprotokoll der Elastika-Färbung an Mauslungengewebe

Schritt	Inkubationsdauer	Reagenz	Anmerkung
1	10 min	Rotihistol 1	Deparaffinisierung
2	10 min	Rotihistol 2	
3	5 min	Rotihistol 3	
4	2 min	Ethanol 99,6 %	Rehydration
5	2 min	Ethanol 99,6 %	
6	2 min	Ethanol 96 %	
7	2 min	Ethanol 70 %	
8	12-16 h	Resorcin-Fuchsin	färbt elastische Fasern (blau-violett)
9	2 min	Aqua dest.	Waschen
10	10 min	Kernechtrot	färbt Kerne (rot), Kollagen (rosa), Muskulatur (rötlich)
11	1 min	Aqua dest	Waschen
12	1 min	Aqua dest	
13	1 min	Ethanol 70 %	Dehydration
14	2 min	Ethanol 96 %	
15	2 min	Ethanol 96 %	
16	5 min	Isopropanol	
17	5 min	Isopropanol	
18	5 min	Rotihistol 1	Klären
19	5 min	Rotihistol 2	
20	5 min	Xylol	
21		Eindecken mit Pertex®	

Tabelle 3.14: Ansetzen der Resorcin-Fuchsin-Färbelösung

Puffer / Lösung	Konzentration / Menge der Komponente
1 % HCl-Alkohol	7,2 ml 25 % HCl 193 ml 70 % Ethanol
Resorcin-Fuchsin	200 ml 1 % HCl-Alkohol 10 ml Weigerts Resorcin-Fuchsin

3.2.4.3.3 Design-basierte Stereologie

Die Methoden der Design-basierten Stereologie beruhen heutzutage mit den speziellen Probeziehungsverfahren auf statistisch und mathematisch robusten Daten und nicht mehr auf Modell-basierenden Annahmen in Bezug auf Größe, Form, Orientierung oder räumlicher Verteilung einer Struktur innerhalb eines Objektes [242]. Qualitative Informationen einer dreidimensionalen Struktur gehen bei zweidimensionalen Bildern/Schnitten verloren. Dennoch bleibt auch in veränderter Form die quantitative Information erhalten. Beispielhaft soll dies an einem histologischen Schnitt von einer Lunge, der ein Blutgefäß beinhaltet, das sich durch die gesamte Lunge zieht, erläutert werden. Auf dem Schnitt ist die dreidimensionale Form des Blutgefäßes nicht mehr erkennbar. Da das Gefäß den Schnitt mehrmals durchkreuzt, d.h. es an mehreren Stellen zerschnitten wurde, ist es nur noch in vielen nicht miteinander verbundenen Profilen (abhängig von Schnittwinkel und -punkt) darauf zu erkennen. Daher kommt es zu einem qualitativen Informationsverlust. Die quantitativen Informationen bleiben jedoch in Form des angeschnittenen Gefäßes erhalten und erscheinen als zweidimensionale Profile des Gefäßes auf dem Schnitt.

Stereologische Methoden nutzen diese quantitativen Informationen eines zweidimensionalen Schnittes. In Kombination mit geometrischen Testfeldern (z.B. Volumen, Linien, Punkte) ist es möglich dreidimensionale Eigenschaften/Parameter (z.B. Oberfläche, Länge, Volumen, Anzahl von Strukturen) zu analysieren und zu berechnen. Das Grundprinzip ist hierbei, dass die Dimensionalität eines Parameters, der auf einem zweidimensionalen (2D) Schnitt abgebildet ist, gleich seiner Dimensionalität in 3D minus 1 ist [245].










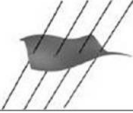
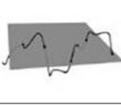
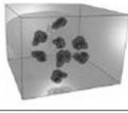
Geometrische strukturelle Eigenschaft und Dimension	 Volumen (3D)	 Oberfläche (2D)	 Länge (1D)	 Anzahl (0D)
Testfeld und Dimension	 Punkte (0D)	 Linien (1D)	 Fläche (2D)	 Volumen (3D)
Interaktion von Struktur und Testfeld und Summe der Dimensionen	 (3D)	 (3D)	 (3D)	 (3D)

Abbildung 3.6: geometrische Testfelder zur Analyse struktureller Parameter
modifiziert nach West [246]

Jede strukturelle bzw. geometrische Eigenschaft (Volumen, Oberfläche, Länge, Anzahl) eines Objektes hat eine bestimmte Dimensionalität (z. B. Volumen = dreidimensional, Oberfläche =

zweidimensional; siehe Abbildung 3.6). Bei einer stereologischen Analyse steht die Dimensionalität des zu untersuchenden Parameters stets in Beziehung zu der Dimensionalität des Testfeldes, wobei deren Addition drei (3D) ergeben muss (Abbildung 3.6) [245]. Unerlässlich ist ebenfalls die Berücksichtigung des Referenzvolumens (3.2.4.2), da dieses Grundlage aller weiteren Berechnungen ist. Eine Vernachlässigung dieser Referenzvariable kann zu Fehlinterpretationen der gewonnenen Ergebnisse führen (engl.: *reference trap*; Referenzfalle).

Für die Bestimmung der Parameter alveolare Oberfläche, Alveolenzahl und Dicke der alveolaren Septen wurde die spezielle stereologische Software „NewCAST“ der Firma Visiopharm (Dänemark) verwendet. Hierfür wurden die zuvor gefärbten und eingedeckten histologischen Schnitte (3.2.4.3.2) der zu untersuchenden Lungen (3.2.2) mit Hilfe eines Objektträger-Scanners (Nanozoomer OHT 2.0 digital slide scanner) digitalisiert. Die „NewCAST“ Software ermöglichte eine zufällige Wahl mikroskopischer Ausschnitte eines Schnittes gemäß SURS (3.2.4.3.1) sowie dessen Überlagerung mit einem zufällig angeordneten parameterabhängigen Testfeldes, womit die stereologischen Quantifizierungen durchgeführt wurden. Alle Untersuchungen wurden geblendet durchgeführt, um Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zu vermeiden.

3.2.4.3.3.1 Bestimmung der alveolaren Oberfläche und der alveolaren Septendicke

Zunächst wurde mit Hilfe des stereologischen Programms semi-automatisch eine Kontur um das Lungengewebe eines Schnittes gezogen. Hiermit wurde die zu analysierende Region definiert. Nach der Aktivierung des Zählwerkzeugs sowie des Linientestfeldes (7 unterbrochene Linien mit einer Gesamtlänge von 44 % einer durchgezogenen Linie; siehe Abbildung 3.7) bei 10facher Primärvergrößerung, startete die Software eine systematisch zufällige, meanderförmige Abfolge von zu analysierenden Gesichtsfeldern, wobei insgesamt eine Gesamtfraktion von 3 % des gesamten Lungenschnittes dargestellt wurde. Hierdurch konnte eine Differenzierung zwischen Parenchym und Nicht-Parenchym zur Berechnung der Volumenfraktion (V_V) des Parenchyms einer Lunge vorgenommen werden.

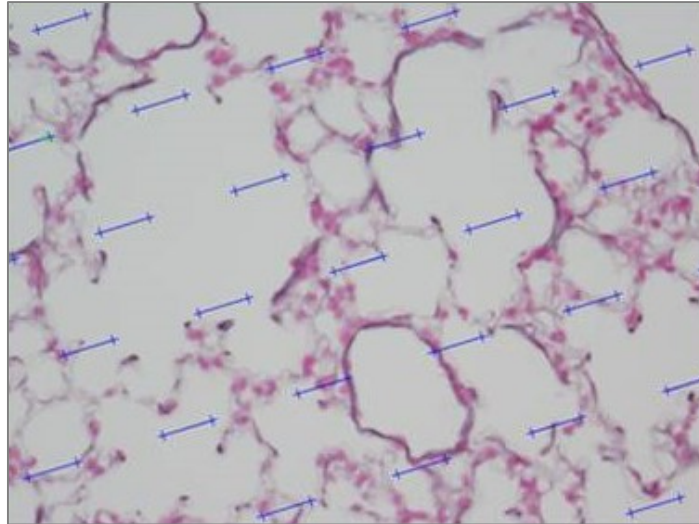


Abbildung 3.7: projizierte Testlinien zur Bestimmung der alveolaren Oberfläche

Sämtliche Anteile einer Lunge, die am Gasaustausch beteiligt sind (alveolare, ductale Lufträume, alveolare Septen), gehören dem Parenchym an, während dem Nicht-Parenchym Lungenstrukturen wie Bronchien, Gefäße und Bindegewebe zuzuordnen sind. Alle Linienenden, die über ein Parenchym (P_{par}) projiziert waren, wurden gezählt und durch die Gesamtzahl der Linienenden (P_{lung}) geteilt.

$$V_{\text{Vpar,lung}} = P_{\text{par}} \div P_{\text{lung}}$$

Mit dem zuvor bestimmten Lungenvolumen (V_{lung} ; siehe 3.2.4.2) erfolgte eine Umwandlung in Absolutwerte.

$$V_{\text{par,lung}} = V_{\text{Vpar,lung}} \times V_{\text{lung}}$$

In der 20fachen Primärvergrößerung wurde ebenfalls mit einem Linientestfeld (7 unterbrochene Linien mit einer jeweiligen Teillänge von 19,63 μm , Abbildung 3.7) die septale Volumendichte ($V_{\text{Vwall,par}}$) und die Dichte der alveolaren Oberfläche ($S_{\text{valvepi,par}}$) bestimmt. Zur Bestimmung des septalen Volumens wurde eine Differenzierung des Gewebes (septale Wand P_{wall} oder parenchymaler Luftraum P_{par}) welches von Linienenden überlagert war vorgenommen.

$$V_{\text{Vwall,par}} = P_{\text{wall}} \div P_{\text{par}}$$

Ebenfalls wurden Schnittpunkte („intersection counting“) zwischen Lufträumen und Gewebe gezählt, sobald eine Testlinie über ein solches Ereignis fiel. Über diese Zählung konnte mit einer mathematischen Formel die Dichte der alveolaren Oberfläche ($S_{\text{Valvepi,par}}$) errechnet werden.

$$S_{\text{Valvepi,par}} = 2 \times I_{\text{alvepi}} \div L_T \times P_{\text{par}}$$

I_{alvepi} ist die Zahl der gezählten Schnittpunkte, wobei L_T die Länge einer Testlinie und P_{par} die Anzahl der auf das Parenchym fallenden Linienenden ist.

Der absolute Wert der alveolaren Oberfläche wurde anschließend durch Multiplikation der Dichte der alveolaren Oberfläche ($S_{\text{Valvepi,par}}$) mit der Volumenfraktion des Parenchyms ($V_{\text{Vpar,lung}}$) und dem Gesamtvolumen der Lunge (V_{lung}) errechnet.

$$S_{\text{alvepi}} = S_{\text{Valvepi,par}} \times V_{\text{Vpar,lung}} \times V_{\text{lung}}$$

Die alveolare Septendicke wurde durch Division der septalen Volumendichte mit der Septendichte, multipliziert um den Faktor 2, errechnet:

$$t_{\text{sept}} = V_{\text{Vwall,par}} \div S_{\text{alvepi}} \times 2$$

3.2.4.3.3.2 Bestimmung der Alveolenzahl

Die Alveolenzahl wurde mittels eines physikalischen Disectors (engl.: „physical disector“) bestimmt [247], einer Methode, mit der es möglich ist, die wahre Anzahl von Objekten in einem begrenzten Volumen (N_V) mit Hilfe eines virtuellen 3D Testfeldes zu quantifizieren. Dies ist weiterhin ohne Kenntnis der Größe, Form und Orientierung des zu zählenden Objektes möglich als auch ohne Gefahr Objekte mehrfach zu zählen. Diese Methode wurde entwickelt, da gezeigt werden konnte, dass die Anzahl eines Objektes pro Flächeneinheit, die auf zweidimensionalen Schnitten sichtbar sind, nicht zwingend mit der tatsächlichen Anzahl dieser Objekte pro Volumeneinheit übereinstimmt [248]. Um eine Quantifizierung mit Hilfe des physikalischen Disectors durchzuführen, sind zwei Gewebeschnitte mit bekanntem Abstand zueinander sowie ein Zählrahmen mit einer definierten Größe nötig [249]. Einer der beiden Schnitte dient hierbei als Referenzschnitt, welcher als Ausgangspunkt dient, um Veränderungen von bestimmten Strukturen/Komponenten auf dem anderen Schnitt (Vergleichschnitt) erfassen und quantifizieren zu können. Wichtig ist, dass es sich bei beiden zu untersuchenden Feldern um exakt die gleiche Stelle handelt. In dieser Arbeit wurde jeweils der erste und dritte Schnitt eines Paraffinblockes mit einer jeweiligen Dicke von 3 μm als „Disector-Paar“ verwendet. Somit betrug die Disectorhöhe 6 μm . Mit Hilfe der NewCAST-

Software war es möglich die zwei Schnitte übereinander auszurichten, so dass bei der systematisch einheitlich zufälligen Auswahl der Testfelder jeweils exakt die gleichen Stellen auf den Lungenschnitten bei 20facher Primärvergrößerung ausgewählt wurden. Als Zählereignis diente das Auftreten von alveolaren Öffnungen, d.h. wenn auf dem Referenzschnitt (engl.: *sampling section*) eine verschlossener alveolarer Ring (2D, Brücke) und an der gleichen Stelle des Vergleichschnitt (engl.: *Look-up section*) ein geöffneter alveolarer Ring (Brücke verschwunden) zu sehen war, entstand ein Zählereignis (Abbildung 3.8, grüne Pfeile). Die Projektion eines Zählrahmens (200 x 200 µm) über die jeweiligen Ansichten stellte sicher, dass jeweils nur innerhalb eines bestimmten Bereiches gezählt wurde. Rote Linien des Rahmens zeigten an, dass kein potentielles Zählereignis registriert wird, sobald die betreffende Alveole diese berührt (Abbildung 3.8, rote Pfeile). Überschritt ein potentielles Zählereignis eine der grünen Linien des Zählrahmens, durfte dies in die Analyse mit aufgenommen werden. Eine Erfassung der Anzahl der Zählrahmen ist ebenfalls für die Bestimmung der Anzahl der Alveolen einer Lunge notwendig. Berührte das Lungenparenchym den Rahmen, auch wenn kein Zählereignis identifiziert werden konnte (alveolare Öffnung), wurde dieses in die Analyse mit einbezogen.

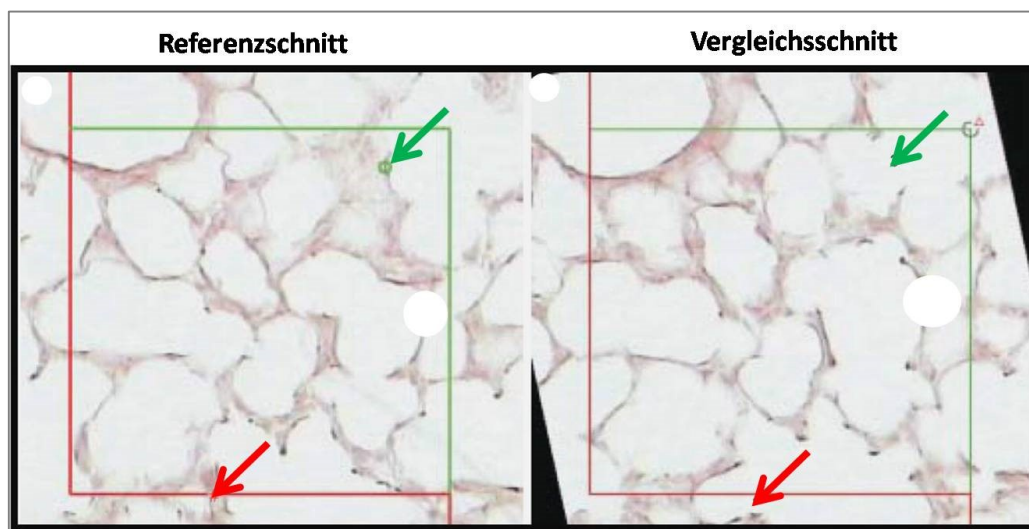


Abbildung 3.8: Zählrahmen, physikalischer Disector und Beispiel eines Zählereignis zur Bestimmung der Alveolenzahl

Die Dichte der Alveolen pro Einheit Referenzvolumen ($N_{\text{Valv/par}}$) wurde wie folgt berechnet:

$$N_{\text{Valv/par}} = 1 \div a \times h \times (B \div F)$$

Die Anzahl der gezählten Brücken (B) geteilt durch das Testvolumen (Rahmengröße = a; Disectorhöhe = h; Anzahl der Zählrahmen = F). Durch Multiplikation der Dichte der Alveolen mit dem Lungenvolumen erhielt man die absolute Alveolenzahl.

$$N_{\text{alv,lung}} = N_{\text{Valv/lung}} \times V_{\text{lung}}$$

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Isolation der Lunge für molekularbiologische Analysen

Nach der Tötung der Tiere durch eine Überdosis Isofluran (3.2.1.2) wurde der Thorax und das Abdomen mit 70 %-igem Ethanol besprüht. Nachdem die Haut zunächst medial vom Abdomen bis zum Thorax und anschließend lateral entlang des unteren Rippenbogens mit einer Schere aufgetrennt wurde, konnte das Diaphragma vorsichtig mit einer Federschere entfernt werden. Danach erfolgte das Durchtrennen des Sternums medial bis zur Klavikula. Die Rippenbögen wurden seitlich mit einer gebogenen Kanüle (24G) fixiert und aus dem eröffneten Thorax wurden Thymus und Pericardium entfernt. Der rechte Ventrikel wurde mit einer Kanüle (24G) punktiert. Hierüber wurde mit einer Spritze die Lunge mit ca. 2 ml 1x PBS langsam blutfrei gespült. Zuvor wurde zum Abfluss der Spüllösung der linke Ventrikel eingeschnitten. Die blutfreie Lunge konnte nun mit einer Schere aus dem Thorax isoliert werden. Alles nicht-parenchymale Gewebe (Hauptbronchien, Trachea) wurde entfernt und die Lungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Bedarf bei -80 °C gelagert. Für alle folgenden Aufarbeitungen und Analysen wurde ausschließlich die rechte Lunge verwendet, da nach PNX die linke Lunge entfernt wurde.

Tabelle 3.15 Puffer und Lösungen für die Isolation von Mauslungen

Puffer/Lösung	Konzentration/Menge der Komponente
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l ddH ₂ O pH 7,4
1x PBS	100 ml 10x PBS 900 ml ddH ₂ O

3.2.5.2 Aufreinigung von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Lungengewebe

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus den wie in 3.2.5.1 isolierten Mauslungen wurde ein RNeasy Mini-Kit mit einer zusätzlichen DNase-Behandlung nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwendet. Zum Homogenisieren des Lungengewebes mit dem Homogenisator „Precellys 24“ (30 s, 6500 3D Bewegungen pro Zyklus) mussten zunächst die

tiefgefrorenen Lungenstücke in spezielle mit Keramikkügelchen (\varnothing 1,4 mm) gefüllte Schraubverschluss-Gefäße (2 ml) von Precellys (PeqLab) überführt werden, in denen jeweils 600 μ l RLT Lysepuffer (1ml RLT + 10 μ l β -Mercaptoethanol) des RNeasy Mini-Kits vorgelegt wurde. Durch extremes Schütteln der Keramikkügelchen entstand ein Lungenhomogenat, welches anschließend in den Schraubverschluss-Gefäßen für 10 Minuten bei 4 °C mit 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde. Hierdurch setzten sich größere, für die Isolation der RNA störende Gewebsreste am Boden der Gefäße ab. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA mit 70%-igem Ethanol gefällt. Zur weiteren Aufreinigung wurde nach den Vorgaben des RNeasy-Kit-Protokolls verfahren. Die finalen RNA-Konzentrationen und deren Reinheit wurde spektrometrisch mittels eines NanoDrops (ND-1000) bestimmt. Das Absorptionsmaximum von reinen Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während kontaminierte Nukleinsäuren, z.B. durch Phenolreste und Proteine, ein Absorptionmaximum bei 280 nm aufweisen. Setzt man die Absorption dieser beiden Wellenlängen ins Verhältnis, so kann das Ausmaß einer Kontamination über den Quotient erörtert werden. Bei einem Quotient von 2,0 liegt reine RNA vor (DNA: 1,8). Die isolierte RNA wurde direkt im Anschluss in cDNA transkribiert oder bei -80 °C gelagert (3.2.5.4).

3.2.5.3 Aufreinigung von RNA aus Zellen

Vor der Isolation von RNA wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in RLT-Puffer (1 ml RLT + 10 μ l β -Mercaptoethanol) des RNeasy Mini-Kits lysiert. Alle weiteren Aufreinigungsschritte wurden gemäß dem Protokoll des RNeasy Kits von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Nach Elution der RNA in ddH₂O wurde deren Konzentration und Reinheit mit dem NanoDrop Spektrophotometer gemessen (3.2.5.2). Im Anschluss wurde die RNA in cDNA transkribiert oder bei -80 °C gelagert (3.2.5.4).

3.2.5.4 Reverse Transkription

Mit Hilfe von viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen) ist es möglich aus RNA komplementäre DNA (engl: *complementary DNA*, cDNA) zu synthetisieren. Diese können schließlich als Matrize (engl.: *template*) für anschließende Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) genutzt werden, um so z.B. die Transkription eines Gens nachzuweisen oder die Expression eines Gens zu quantifizieren [250]. Durch den Einsatz von zufälligen Primern (engl.: *random primer*) soll erreicht werden, dass möglichst die gesamte Menge einer isolierten RNA in cDNA transkribiert wird.

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von „Applied Biosystems“ (Darmstadt) verwendet, welches eine modifizierte *Moloney murine*

leukemia virus Reverse Transkriptase (MultiScribe™-RT) beinhaltet. Eine Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.16: Reaktionsansatz für eine reverse Transkription

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x RT Buffer	2 µl	1x
10x Random Primers	2 µl	1x
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl	1x
MultiScribe™-RT (50 U/µl)	1 µl	50 U
Steriles H ₂ O	4,2 µl	N/A
RNA	10 µl	10 ng/µl

Bei mehreren Ansätzen wurde ein Master-Mix erstellt, dem nur noch die jeweiligen RNA-Proben zugegeben wurden. Die Reaktionsansätze wurden mit folgendem Zyklen-Protokoll im Mastercycler Gradient 5333 oder 5341 von Eppendorf inkubiert.

Tabelle 3.17: Zyklen-Protokoll einer Reverse Transkription

Dauer	Temperatur	Vorgang
10 min	25°C	Primer binden an RNA
2 h	37°C	Reverse Transkription
5 min	85°C	Inaktivierung der MultiScribe™ -RT
> 5 min	4°C	Kühlung

Für eine spätere Verwendung konnte die cDNA bei -20 °C bzw. für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden.

3.2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl.: *polymerase chain reaction*; Polymerase-Kettenreaktion) wird dazu genutzt, um einen kurzen, genau definierten Teil einer DNA zu vervielfältigen [250]. Bei einer Standard-PCR ist es möglich, Fragmente bis zu etwa 3 kb Länge zu amplifizieren. Durch zwei spezifische Oligonukleotide (Primer) wird der zu vervielfältigende Bereich einer DNA, welche für eine PCR als Matrize dient, eingegrenzt. Durch Erhitzen auf 94 °C werden die Doppelstränge der DNA voneinander getrennt (Denaturierungsschritt). Um eine effiziente Hybridisierung der Primer, deren Sequenz mit einem Teil der Matrizen-DNA komplementär ist, an die nun einzelsträngige „*template*-DNA“ zu ermöglichen, wird für kurze Zeit die Temperatur gesenkt. Die genaue Temperatur des so genannten Annealingschrittes einer PCR wird hierbei durch die Länge und Sequenz der Primer bestimmt (2-3 °C unterhalb deren Schmelzpunktes

T_m). Im anschließenden Elongationsschritt werden durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase bei 68-72°C die angelagerten Primer von ihrem 3'-Ende aus durch den Einbau von Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) verlängert. Die Reihenfolge des Einbaus ist der Matrizen-DNA komplementär. Da diese Komplementierung an beiden Strängen der *template*-DNA erfolgt, wird so die Menge an DNA verdoppelt. Die Dauer eines Elongationsschrittes ergibt sich aus der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Kinetik (ca. 1000 bp/min) der verwendeten Polymerase. Bei einer zyklischen Wiederholung dieser Schritte kann unter optimalen Bedingungen die eingesetzte DNA bis zu einem gewissen Grad exponentiell vermehrt werden.

3.2.5.5.1 Genotypisierung von Versuchstieren

Durch die vorgenommenen genetischen Manipulationen an dem Genom von transgenen Mäusen ist meist bei deren Herstellung bzw. Vermehrung der genaue genetische Status dieser Tiere unbekannt. Folglich muss bei den Nachkommen solcher Tiere der Genotyp bestimmt werden, um sicherzustellen, ob die entsprechende genetische Manipulation weitervererbt wurde. Eine Genotypisierung der Nachkommen ist bei Elterntieren mit unterschiedlichem Genotyp (z.B. beide Tiere heterozygot) im Bezug auf eine oder mehrere genetische Manipulationen zwingend notwendig. Zur Feststellung des Genotyps auf molekularer Ebene wurde in dieser Arbeit eine Schwanzbiopsie (DNA-Quelle) mit anschließender DNA-Untersuchung mittels spezifischer Genotypisierungs-PCR durchgeführt.

Um Gewebeprobe und Maus eindeutig zuordnen zu können, wurden die Tiere individuell mit Ohrlöchern markiert und es wurde eine institutsspezifische Nummer (Tier-ID) zugeteilt. Die Schwanzbiopsie wurde in einem Alter von 3-4 Wochen mit einem Skalpell unter lokaler Betäubung durchgeführt. Die Größe des Biopates betrug ca. 2-3 mm. Zur Gewinnung der genomischen DNA wurde das Schwanzstück in Lyse-Puffer mit Proteinase K (1:100) unter schütteln bei 55 °C über Nacht lysiert. Mittels Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min (4 °C) wurde nichtlysiertes Gewebe aus der Lösung entfernt. Nach der Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min (4 °C) pelletiert. Das DNA enthaltende Pellet wurde nach dem Verwerfen des Überstandes nochmals mit Ethanol (70%) und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min (4 °C) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde erneut der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in T 1/10 E-Lösung resuspendiert.

Tabelle 3.18: Puffer und Lösungen für die Isolation von DNA

Puffer/Lösung	Konzentration/Menge der Komponente
Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS ad ddH ₂ O
Proteinase K T 1/10 E	20 mg/ml in Lyse-Puffer gelöst 10 mM Tris-HCl pH 8 0,1 mM EDTA ad ddH ₂ O

Im Anschluss wurde die DNA für Genotypisierungs-PCRs verwendet oder bei -20 °C gelagert. In Abhängigkeit von der Abstammung eines Tieres wurde eine Genotypisierung auf eine potentielle Deletion des *Egr1*-, *TnC*- oder *Timp1*-Gens durchgeführt. Für alle Genotypisierungs-PCRs wurde der Fertigmix ImmoMix™ Red verwendet, dessen Polymerase auf der IMMOLASE™-DNA-Polymerase basiert und bereits eine Pufferlösung enthält, die eine für diese Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellte. Weiterhin enthielt der Mix einen inerten roten Farbstoff, wodurch ein Reaktionsansatz nach einer PCR ohne zusätzliche Zugabe eines Ladepuffers auf ein Agarosegel aufgetragen werden konnte.

3.2.5.5.1.1 Genotypisierungs-PCR von Egr1 Knockout-Mäusen

Da homozygote Tiere dieses knockout Stammes infertil sind, konnten nur heterozygote Tiere verpaart werden, was eine Genotypisierung aller Würfe erforderte. Durch die spezifische Sequenz der Egr1 Knockout-Primer (Tabelle 3.8) konnte mittels PCR der genaue Genotyp der untersuchten Tiere bezüglich der Deletion des Gens *Egr1* überprüft werden. Eine Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.19: Reaktionsansatz für eine Egr1 Knockout-Genotypisierungs-PCR

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
ImmoMix™ Red (2x)	5 µl	1x
Primer Egr1KO VP (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
Primer Egr1KO RP (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
Primer Egr1KO RP KO (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
ddH ₂ O	3,75 µl	N/A
DNA Template	0,5 µl	>15 ng

Bei mehreren Ansätzen wurde ein Master-Mix erstellt, dem nur noch die jeweiligen DNA-Proben zugegeben wurden. Die Reaktionsansätze wurden mit folgendem Zyklen-Protokoll im Mastercycler Gradient 5341 von Eppendorf inkubiert.

Tabelle 3.20: Zyklen-Protokoll einer Egr1 Knockout-Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	15 min
40x	Denaturierung	95°C
	Primeranlagerung (Annealing)	61°C
	Elongation	72°C
finale Elongation	72°C	5 min
	4°C	∞

Nach der Reaktion wurde der gesamte Ansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel (siehe Absatz 3.2.5.7) aufgetragen, um die amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Folgende spezifische Banden wurden für eine genaue Genotypisierung erwartet:

Tabelle 3.21: Anzahl/Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp

Anzahl/Größe der Banden eines Ansatzes	Genotyp
1x 360 bp	Wildtyp
1x 520 bp	Knockout homozygot bzgl. Egr1
2x 360 bp & 520 bp	Knockout heterozygot bzgl. Egr1

3.2.5.5.1.2 Genotypisierungs-PCR von Timp1 Knockout-Mäusen

Um auch Wildtypen gleicher Abstammung für die stereologischen Analysen zu erhalten, wurden heterozygote- bzw. hemizygoten Tiere miteinander verpaart, was eine Genotypisierung aller Würfe erforderte. Durch die spezifische Sequenz der Timp1 Knockout-Primer (Tabelle 3.8) konnte mittels PCR der genaue Genotyp der untersuchten Tiere bezüglich der Deletion des Gens *Timp1* überprüft werden. Eine Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.22: Reaktionsansatz für eine Timp1 Knockout-Genotypisierungs-PCR

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
ImmoMix™ Red (2x)	5 µl	1x
Timo1 KO: Geno_mut (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
Timp1 KO Geno_common (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
Timp1 KO Geno_wt (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 pmol
ddH ₂ O	3,75 µl	N/A
DNA Template	0,5 µl	>15 ng

Bei mehreren Ansätzen wurde ein Master-Mix erstellt, dem nur noch die jeweiligen DNA-Proben zugegeben wurden. Die Reaktionsansätze wurden mit folgendem Zyklen-Protokoll im Mastercycler Gradient 5341 von Eppendorf inkubiert.

Tabelle 3.23: Zyklen-Protokoll einer Timp1 Knockout-Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	2 min
40x	Denaturierung	94°C
	Primeranlagerung (Annealing)	65°C
	Elongation	72°C
finale Elongation	72°C	5 min
	4°C	∞

Nach der Reaktion wurde der gesamte Ansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel (siehe Absatz 3.2.5.7) aufgetragen, um die amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Folgende spezifische Banden wurden für eine genaue Genotypisierung erwartet:

Tabelle 3.24: Anzahl/Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp

Anzahl/Größe der Banden eines Ansatzes	Genotyp
1x 393 bp	Wildtyp
1x 200 bp	Knockout homozygot/ hemizygot bzgl. Timp1
2x 393 bp & 200 bp	Knockout heterozygot bzgl. Timp1

3.2.5.5.1.3 Genotypisierungs-PCRs von TnC Knockout-Mäusen

Für die Vermehrung des TnC ko-Stammes wurden bezüglich der Deletion von TnC homozygote Tiere miteinander verpaart. Als Kontrolle auf Erhalt des Genotyps wurden stichprobenartig Jungtiere eines Wurfes genotypisiert. Ein Reaktionsansatz einer PCR mit spezifischen Primern zur Identifizierung von Wildtyp oder TnC ko-Mäusen wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.25: Reaktionsansatz für eine TnC Genotypisierungs-PCR Wildtyp-Ansatz
Wildtyp-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
ImmoMix™ Red (2x)	5 µl	1x
TnC_Geno1 (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 pmol
TnC_Geno3 (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 pmol
ddH ₂ O	3 µl	N/A
DNA Template	1 µl	>15 ng

TnC Knockout-Reaktionsansatz		
Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
ImmoMix™ Red (2x)	5 µl	1x
TnC_neo_KO_for (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 pmol
TnC_neo_KO_rev (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,5 pmol
ddH ₂ O	3 µl	N/A
DNA Template	1 µl	>15 ng

Folglich mussten zur Genotypisierung einer Maus aus dem TnC-null Stamm zwei separate PCRs mit unterschiedlichen Primern (Tabelle 3.8) durchgeführt werden. Bei mehreren Ansätzen wurde jeweils ein Master-Mix erstellt, dem nur noch die jeweiligen DNA-Proben zugegeben wurden. Die Reaktionsansätze wurden mit folgendem Zyklen-Protokoll im Mastercycler Gradient 5341 von Eppendorf inkubiert:

Tabelle 3.26: Zyklen-Protokoll einer TnC Knockout/Wildtyp Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	5 min
40x	Denaturierung	94°C
	Primeranlagerung (Annealing)	60°C
	Elongation	72°C
finale Elongation	72°C	5 min
	4°C	∞

Nach der Reaktion wurden die unterschiedlichen Ansätze auf ein 1 %-iges Agarosegel (siehe Absatz 3.2.5.7) aufgetragen, um die amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Folgende spezifische Bandenkombinationen der beiden Ansätze je Tier wurden für eine genaue Genotypisierung erwartet:

Tabelle 3.27: Anzahl/Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp

Anzahl/Größe der Banden beider Ansatzes	Genotyp
1x 904 bp	Wildtyp
1x 515 bp	knockout homozygot bzgl. TnC
2x 904 bp & 515 bp	knockout heterozygot bzgl. TnC

3.2.5.6 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Da es sich bei der Amplifikation einer DNA mittels PCR um eine exponentielle Vermehrung handelt, ist es möglich diese Methode für Quantifizierungen einzusetzen. Um die relative Expression von ausgesuchten Genen in Zellen und Geweben über deren mRNA zu quantifizieren, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green 1 als molekulare Sonde verwendet. Dieser asymmetrische Zyanin-Farbstoff ($C_{32}H_{37}N_4S^+$) interkaliert doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende DNA-SYBR®-Green-1-Komplex emittiert grünes Licht ($\lambda_{max} = 521 \text{ nm}$), wenn er durch blaues Licht mit einer Wellenlänge $\lambda_{max} = 494 \text{ nm}$ angeregt wird. Somit ist die DNA-Synthese, ausgehend von einer aus mRNA hergestellten cDNA, direkt proportional zur Signalstärke dieses Reporter-Moleküls [250]. Da das Fluoreszenzsignal von SYBR® Green 1 eine sehr geringe Spezifität besitzt, musste am Ende eines qRT-PCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von $55 \text{ °C} + 0,5 \text{ °C/s}$ bis 95 °C wurde die Spezifität der verwendeten Primer und eine eventuelle Gegenwart von Kontaminationen oder Primer-Dimeren überprüft [250]. Da spezifische PCR-Produkte eine größere Fragmentlänge aufweisen als unspezifische Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte, können diese anhand der Schmelztemperatur voneinander unterschieden werden.

Durch den Bezug der Menge an spezifischem Produkt auf einen externen Standard kann eine relative Quantifizierung vorgenommen werden. Da es als Haushaltsgen (Referenzgen) konstitutiv exprimiert wird, wurde Porphobilinogen deaminase (PBGD) als Standard verwendet. Die Expressionsanalysen der Bestandteile elastischer Fasern von pneumektomierten/sham-operierten Wildtyptieren (4.1) wurden mit der BioRad-Plattform „Real-time System CFX 96“ durchgeführt. Alle anderen qRT-PCRs erfolgten mit dem „ViiA 7

Real-time PCR System" von Applied Biosystems/Life Technologies. Ein Reaktionsansatz für das jeweilige System wurde wie folgt angesetzt:

**Tabelle 3.28: Reaktionsansatz einer qRT-PCR
Real-time System CFX 96**

Komponente	Volumen pro Reaktion
iQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µl
Primer forward 10 pmol/µl	0,5 µl
Primer reverse 10 pmol/µl	0,5 µl
ddH ₂ O	9,5 µl
cDNA Template	2 µl

ViiA 7 Real-time PCR System	
Komponente	Volumen pro Reaktion
SYBR® Select Master Mix	10 µl
Primer forward 10 pmol/µl	0,5 µl
Primer reverse 10 pmol/µl	0,5 µl
ddH ₂ O	7 µl
cDNA Template	2 µl

Die verwendeten Primerpaare, sowie deren Sequenzen sind in Tabelle 3.7 aufgeführt und wiesen Effizienzen von 100 % (+/-10 %) auf. Alle mRNA-spezifischen Sequenzen der jeweiligen Primer wurden über das Tool „Primer-BLAST“ auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt. Bei mehreren Ansätzen wurde ein Master-Mix erstellt, dem nur noch die jeweiligen cDNA-Proben zugegeben wurden.

Im Folgenden ist das Temperaturprofil einer qRT-PCR aufgeführt:

Tabelle 3.29: Zyklenprotokoll einer qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Enzymaktivierung/Initiale Denaturierung	95°C	10 min
45x	Denaturierung	95°C
	Primeranlagerung (Annealing)	59°C
	Elongation	72°C
Schmelzkurvenanalyse	55°C-95°C	0,5°C/s
	4°C	∞

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in jedem Elongationsschritt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jedem Lauf eine *non-template*-Kontrolle (ohne cDNA; Negativ-Kontrolle) für jeden Mastermix durchgeführt.

Die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom Hintergrund abhob, wurde als Schwellenwert (C^T -Wert, engl.: *cycle threshold*) definiert. Zu diesem

Zeitpunkt war die Amplifikation noch im exponentiellen Bereich. Zur Auswertung der relativen Expressionen (RQ; relative Quantität) wurde die $2^{(-\Delta\Delta C^T)}$ -Methode verwendet [251]. Dabei wurden die C^T -Werte jeder Probe auf den jeweiligen C^T -Wert des Referenzgens (PBGD) bezogen und mit dem Programm MS Excel oder der Software des ViiA 7-Systems ausgewertet.

3.2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität der Primer zu überprüfen wurde die Methode der Agarosegel-Elektrophorese angewendet. Dabei wurden DNA-Fragmente ihrer Länge nach voneinander getrennt und identifiziert [250]. Bei Agarose handelt es sich um ein lineares Polymer, welches sich aus alternierenden D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose Molekülen zusammensetzt. Im festen Zustand bilden diese Polymere über Wasserstoffbrücken eine Siebstruktur aus, deren Porengröße abhängig von der Agarosekonzentration ist. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose zunächst in Elektrophorese-Puffer (TAE-Puffer) gekocht. Nachdem die verflüssigte 1 % – 2 %-ige Agarose-Lösung mit dem nukleinsäureinterkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) versetzt wurde, konnte mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen werden. Das ausgekühlte und erstarrte Agarosegel wurde anschließend in eine horizontale Elektrophoresekammer gegeben und mit TAE-Puffer bedeckt. Der dichteerhöhende rote Farbstoff des Fertigmixes für PCR-Anwendungen „ImmoMix™ Red“ verhinderte eine Diffusion der amplifizierten DNA eines zu analysierenden PCR-Ansatzes aus den Geltaschen. Bedingt durch die saure Eigenschaft der DNA, wanderten die Fragmente nach dem Anlegen einer Spannung (100-120 Volt) durch das Agarosegel in Richtung Anode, wobei deren Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge ist. Mittels des roten Farbstoffes des „ImmoMix™ Red“-Fertigmixes, der mit DNA durch ein elektrisches Feld komigriert, konnte der ungefähre Lauf einer DNA-Probe durch ein Agarosegel beobachtet werden. Nach 60-90 Minuten wurde die DNA durch UV-Licht auf einem Transilluminator (Intas, Göttingen) sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation fotografiert. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde ein geeigneter Standard (100bp DNA Ladder) mit Fragmenten bekannter Größe mit den DNA-Proben auf das Gel mit aufgetragen. Anhand der Agarose-Gelelektrophorese wurde die Spezifität der qRT-PCR Primerpaare (Tabelle 3.7) sowie Genotypisierungs-PCRs ausgewertet (3.2.5.5.1).

Tabelle 3.30: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Zusammensetzung des Puffers	Menge/Konzentration
1 xTAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	
Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert	7,6

3.2.6 Zellbiologische Methoden

3.2.6.1 Isolation primärer Fibroblasten aus Mauslungen

Zur Isolation primärer Fibroblasten für Zellkulturversuche wurde zunächst wie in 3.2.5.1 beschrieben, die Lunge einer Maus (Alter: 10 Wochen) mit sterilem Präparierbesteck entnommen. Anschliessend wurde das parenchymale Lungengewebe freipräpariert und in eine Petrischale auf Eis mit kaltem Isolationsmedium (15 ml; DMEM Glutamax mit Pyruvat, 20 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden an einer Werkbank mit turbulenzarmer Verdrängungsströmung („laminar flow“) durchgeführt, um die Konzentration luftgetragener Teilchen so gering wie möglich zu halten. Im nächsten Schritt wurde das Lungengewebe in einem sterilen 50 ml-Röhrchen mittels einer Präparierschere stark zerkleinert. Für den weiteren Abbau des Gewebes und zur Vereinzelung der Zellen wurde das Lungenhomogenat mit einer vorgewärmten Kollagenase B-Lösung (25 ml, 2mg/ml) versetzt und für 45 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit einer 30 ml-Spritze (30G Kanüle) unter Vermeidung von Schaumbildung mehrmals aufgesogen und wieder in das Röhrchen entlassen, wodurch größere Gewebstücke weiter separiert wurden. Die verbliebenen Lungengewebsstücke wurden auf dem Boden des Röhrchens sedimentiert und die überstehende Lösung mit einer Pipette abgezogen und durch ein Sieb (Porengröße: 40 µm) in ein neues 50 ml-Röhrchen transferiert. Anschließend wurde das Sieb mit 10 ml Isolationsmedium nachgespült und die Zellsuspension bei 500 U/min für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Hierdurch wurden die Zellen pelletiert und der Überstand (Kollagenase B-Lösung) konnte abgesaugt werden. Daraufhin wurden die Zellen in 15 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die zuvor sedimentierten Gewebstücke wurden vor dem Aussäen (T-75 Zellkulturflaschen) in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wodurch alle nicht adhärenen Zellen sowie abgestorbene Zellen entfernt wurden. Bedingt durch die enorm hohe Proliferationsrate von Fibroblasten werden nach einiger Zeit alle anderen adhärenen Zelltypen überwachsen und sterben ab. Nach spätestens zwei Passagen bestand die Primärkultur ausschließlich aus

Fibroblasten (langgezogene Zellen mit vielen irregulären zytoplasmatischen Fortsätzen; heller, ovaler Zellkern mit deutlichem Nucleolus) und konnte für Experimente verwendet werden.

3.2.6.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Um einer Kontamination der Zellkulturen durch Keime und Partikel entgegenzuwirken, wurden alle Arbeitsschritte an einer Werkbank mit vertikalen Laminar-Flow-Verhältnissen durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile oder autoklavierte Labormaterialien und Substanzen benutzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit Filter-Top bei 37°C mit 5 % CO₂-Begasung und gesättigter Wasserdampfatmosphäre.

Das Kulturmedium der primären murinen Fibroblasten, bestehend aus phenolrothaltigem DMEM (GlutaMax mit Pyruvat) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, wurde vor dem Kontakt mit den Zellen auf Raumtemperatur erwärmt. Auf die gleiche Weise wurde mit dem Medium für die humanen Zellen SAEC verfahren, das aus dem SABM™-Basalmedium ergänzt mit speziellen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen des SAGM SingleQuot Kits bestand. Zur Inaktivierung der Komplementfaktoren wurde das FCS für die Kultur der primären Fibroblasten vor der ersten Anwendung für 40 Minuten bei 56 °C inkubiert.

Bei einer Konfluenz > 85 % wurden die Zellen passagiert, indem das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5 ml PBS gewaschen wurden. Durch eine 2-5 minütige Inkubation mit 5 ml 2,5 %iger Trypsinlösung bei 37 °C wurden die Zellen vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Zum Erhalt der Stammkultur wurde ein Zehntel der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und zur weiteren Kultivierung mit frischem Medium versetzt. Je nach Bedarf wurden die verbleibenden Zellen zu Versuchszwecken in Loch-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) ausgesät, eingefroren oder verworfen. Nach maximal 7 Passagen wurde die Stammkultur nicht weiter verwendet, da sich der ursprüngliche Phänotyp der Zellen sonst zu sehr verändert hätte.

3.2.6.3 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Um die Zellen längerfristig in flüssigem Stickstoff bei –196 °C einlagern zu können, wurden diese nach dem Ablösen in Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Spitzbodenröhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 U/min wurden die pelletierten Zellen nach Absaugen des Überstandes in einem Gemisch aus FCS und 20 % DMSO resuspendiert und jeweils 1 ml in ein 1,5 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Vor der Überführung in den Stickstofftank wurden die befüllten Kryo-Röhrchen zunächst bei -80°C zwischengelagert.

Das Auftauen erfolgte durch schnelles Erwärmen auf maximal 37°C. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurde die aufgetaute Zellsuspension nach der Überführung in ein 15 ml-Spitzbodenröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) mit 5 ml Kulturmedium versetzt und durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1000 U/min pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes und der Resuspension des Zellpellets mit frischem Kulturmedium konnten die Zellen in Kulturflaschen mit Filter-Top (Greiner bio-one, Frickenhausen) ausgesät werden. Um eventuell verbliebenes DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde 24 h nach dem Aussäen das Kulturmedium erneut ausgetauscht.

3.2.6.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot Zellsuspension aus dem Überstand nach der Trypsinbehandlung im Verhältnis 1:2 mit 0,4 % Trypanblau in PBS verdünnt. Die Lösung wurde nun in das Zählraster einer Neubauer Zählkammer mit 0,1 mm Kammertiefe eingebracht. Mit seiner Eigenschaft als saurer Farbstoff wurden mittels Trypanblau tote Zellen eingefärbt. Diese wurden folglich nicht in der anschließenden Zählung mit eingeschlossen. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops und der auf einer Neubauer Zählkammer befindlichen vier Großquadrate (bestehend aus je 16 Einzelquadraten) kann mit der Formel

$$N \times V \times 10^4$$

die Lebendzellzahl pro Milliliter Zellsuspension ermittelt werden. N ist hierbei die Anzahl der gezählten Zellen eines Großquadrates, V der Verdünnungsfaktor und 10^4 die Kammerkonstante, welche sich u.a. aus Kammertiefe und Umfang der Großquadrate zusammensetzt.

3.2.6.5 Aussäen von Zellen in Lochplatten

Für anschließende Zellkulturversuche mussten zuvor Zellen in Lochplatten passagiert werden. Um hierfür eine nötige Konfluenz von > 80 % pro Loch zu erhalten, wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten ausgesät.

3.2.6.6 Stimulation eukaryoter Zellen

Nach dem Aussäen der Zellen in 6-Lochplatten und dem Erreichen einer Konfluenz > 80 % wurde 18 Stunden vor einer Stimulation ein Mediumwechsel mit serumfreien Medium durchgeführt, um ein Angleichen des Zellzyklus zu erreichen.

Je eine Hälfte der Zellen wurde daraufhin mit Zytokinen (z.B. TGF β 1) oder bioaktiven Substanzen (z.B. Timp1) stimuliert, wobei die andere Hälfte unbehandelt als Kontrolle diente. Die murinen primären Fibroblasten wurden mit TGF β 1 (2 ng/ml) für 3 Stunden in 6-Lochplatten stimuliert. Die Stimulation der SAEC-Zellen erfolgte mit Timp1 (500 ng/ml) über 24 Stunden.

3.2.6.6.1 mechanische Stimulation von eukaryotischen Zellen

Um Zellen einer mechanischen Stimulation auszusetzen, wurde eine in der institutseigenen Werkstatt eigens hierfür hergestellte Apparatur verwendet (Abbildung 3.9).

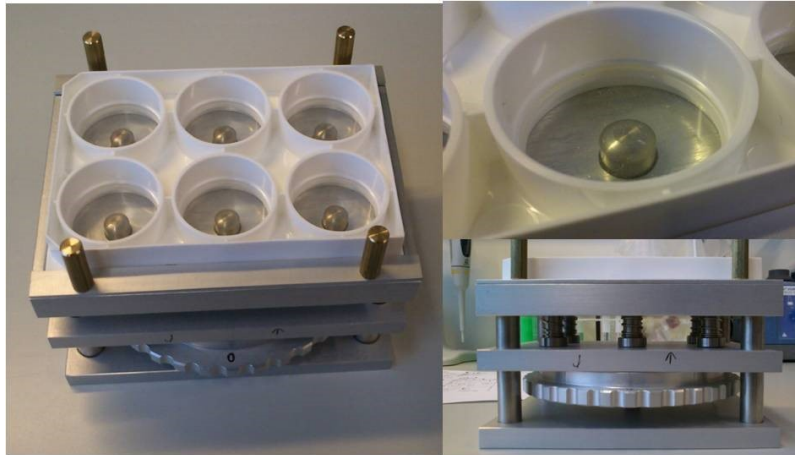


Abbildung 3.9: mechanischer Stimulator für Zellkulturexperimente mit eingesetzter Zellkulturplatte mit flexiblem Boden

Hierzu wurden die Zellen in spezielle Zellkulturplatten (6-Loch, Bioflex® Kulturplatten von Flexcell) ausgesät, deren Boden aus einer unbehandelten flexiblen Silikon-Elastomermembran bestand. Sobald eine Konfluenz von $> 95\%$ erreicht war, wurde die Zellkulturplatte mit den Zellen auf dem mechanischen Stimulator befestigt. Der Grad der gleichmäßigen radialen Dehnung des flexiblen Bodens bzw. der Zellen einer Platte konnte per Hand über ein horizontales Drehrad, welches die Stellung von vertikal beweglichen Kolben unter jedem Loch einer Platte veränderte, reguliert werden. Um die Zellen mechanisch zu stimulieren, wurden die Kolben unter den Löchern für eine Minute um 3 mm angehoben und anschließend wieder für eine Minute auf ihre Ausgangsstellung (kein mechanischer Reiz) zurück bewegt. Dieses Stimulationsintervall wurde insgesamt dreimal wiederholt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mechanisch stimuliert wurden, aber auf einer Bioflex®-Zellkulturplatte ausgesät waren. Nach der Stimulation wurden alle Zellen den jeweiligen Analysen entsprechend isoliert (3.2.5.3).

3.2.7 Proteinbiochemische Methoden

3.2.7.1 Proteinaufreinigung aus Lungengewebe

Die Extraktion von Proteinen erfolgte durch das Homogenisieren von 80 mg gefrorenem Lungengewebe, welches mit kaltem RIPA-Puffer (500 μ l) sowie Protease und

Phosphataseinhibitorcocktail (10 µl/ml RIPA-Puffer) von Thermo Scientific versetzt wurde. Das Homogenisieren wurde mit dem 1,4 mm Precellys-Keramik-Kit und dem Precellys 24 Homogenisator (3 x 20 s, bei Raumtemperatur) durchgeführt (siehe auch 3.2.5.2). Anschließend ruhten die Proben für 30 min auf Eis. Zur Entfernung von Geweberesten wurde das Homogenat für 15 min mit 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden direkt analysiert oder bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration an Protein einer Probe wurde mittels des DC Protein Assays von BioRad bestimmt, welcher auf der quantitativen Methode nach Lowry beruht [252]. Bei diesem Nachweis wird die Biuretreaktion genutzt, die zu einer Violettfärbung einer Probe führt, nachdem Kupfer-(II)-Ionen mit Peptiden komplexieren. Diese zweiwertigen Kupferionen werden anschließend zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert, die wiederum gelbliches Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdän reduzieren, was in einer Blaufärbung resultiert. Da die Intensität dieser Blaufärbung abhängig von dem Gehalt an Protein ist, kann somit deren Konzentration indirekt über eine photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden. Vor der Konzentrationsmessung einer Probe wurden diese 1:10 mit RIPA Puffer sowie Protease und Phosphataseinhibitorcocktail (10 µl/ml RIPA Puffer) verdünnt, welcher ohne Homogenat auch als Leerwert diente. Als Referenz diente eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen an boviner Serumalbumin-Lösung (BSA; 0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml). Jeweils 10 µl der zu analysierenden Proben bzw. 10 µl RIPA Puffer für die Leerwertbestimmung wurden zunächst mit 50 µl Reagenz A (enthält weiterhin 20 µl Reagenz S pro ml) versetzt und danach wurde 400 µl Reagenz B hinzu pipettiert und die Küvette gevortext. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Konzentration der Proben mit dem Photospektrometer Smart Spec™ Plus von BioRad bestimmt.

3.2.7.3 Zymographie

Der Einfluss von Matrixmetalloproteasen auf die Extrazellulärmatrix ist abhängig von deren Aktivität, die mithilfe einer Zymographie beurteilt werden kann. Mit dieser sehr sensitiven Methode werden MMPs über ihr Molekulargewicht sowie deren Aktivität über die Degradation eines ihrer Substrate identifiziert [147]. Hierzu wurden Proben, aus denen Proteine aufgereinigt wurden (3.2.7.1), zunächst mittels SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das bei einer SDS-PAGE verwendete anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) ist in der Lage die Eigenladungen

von Proteinen zu überdecken, wodurch alle Proteine eines Gemisches eine konstante negative Ladungsverteilung erhalten. Aus diesem Grund wandern die Proteinkomplexe in einem elektrischen Feld zur Anode mit einer Geschwindigkeit, die von ihrer Molekulargröße abhängig ist [253]. Die Separation der Proteine erfolgte in Polyacrylamidgelen, in denen Gelatin mit dem Acrylamid kopolymerisiert wurde. Jedes Gel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel.

Tabelle 3.31: Zusammensetzung der Gele für Zymographie

Trenngel	
Bestandteil	Menge
Gelatin	10 mg
ddH ₂ O	4,2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
Acrylamid	3,3 ml
APS 10 %	60 µl
TEMED	10 µl
Sammelgel	
Bestandteil	Menge
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid	1,6 ml
ddH ₂ O	5,9 ml
APS 10 %	60 µl
TEMED	10 µl

Vor der Polymerisation des Trenngels wurde das Gelatin bei 45 °C für 2 Stunden in Wasser und Trenngelpuffer gelöst. Vor der Beladung eines polymerisierten Gels wurden die Proben mit Laemmli-Ladepuffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt und nicht aufgekocht, um einer Diffusion der Proben aus den Geltaschen entgegen zu wirken und die Aktivität der MMPs sowie deren molekulare Struktur nicht irreversibel zu beeinträchtigen. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Alle Proben wurden zuvor durch Zugabe von RIPA-Puffer auf eine gleiche Proteinkonzentration angeglichen. Als Proteinstandard wurden 10 µl eines Markers (Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad) aufgetragen. Während der Elektrophorese in Elektrophoresepuffer (1x) bei 100 Volt lagen die in dem Proteingemisch enthaltenen MMPs, bedingt durch das SDS, denaturiert und inaktiviert vor, was ein Waschen (3 x 20 min) des Gels nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer Lösung mit Triton® X-100 (2,5 %) erforderte. Hierdurch wird das SDS eines Gels durch Triton® X-100 substituiert, was zu einem Renaturieren der Enzyme führte. Die Enzyme wurden so wieder aktiviert und latente MMPs autoaktiviert. Anschließend wurde das Gel in 20 ml Inkubationspuffer bei 37 °C über Nacht inkubiert, wodurch die konzentrierten (SDS-PAGE) und renaturierten MMPs das an das Gel

gekoppelte Gelatin verdauen. Am nächsten Tag wurde das Gel mit einer Coomassie® Blau-Lösung gefärbt. Auf der Laufhöhe der MMPs, bedingt durch den Verdau des Gelatins, konnte anhand der Intensität der klaren Banden gegen den blauen Hintergrund (unverdautes Gelatin) die Aktivität der Enzyme detektiert werden. Zur Erhöhung des Kontrastes wurde das gefärbte Gel für kurze Zeit in einer Entfärbelösung inkubiert.

Tabelle 3.32: Puffer und Lösungen für Zymographie

Puffer/Lösung	Konzentration/Menge der Komponente
Elektrophoresepuffer 5x	15,1 g Tris 94 g Glycin 50 ml SDS 10 % ddH ₂ O ad 1 l
Laemmli-Ladepuffer 5x	4 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 10 ml Glycerin 2 g SDS 1 ml Bromphenolblau 1 %
Trenngelpuffer	125 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 10 ml SDS 10 % ddH ₂ O ad 250 ml
Sammelgelpuffer	125 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 10 ml SDS 10 % pH 6,8 mit HCl ddH ₂ O ad 250 ml
APS 10 %	100 mg APS 1 ml ddH ₂ O
Triton® X-100 2,5 %	12,5 ml Triton® X-100 487,5 ml ddH ₂ O
Inkubationspuffer	25 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 100 mg Natriumazid 5 ml Triton® X-100 367 mg CaCl ₂ ddH ₂ O ad 500ml
Coomassie® Blau-Lösung	250 mg Coomassie® Blau G 250 45 ml Methanol 10 ml Essigsäure 45 ml ddH ₂ O
Entfärbelösung	100 ml Ethanol 100 ml Methanol 35 ml Essigsäure 265 ml ddH ₂ O

3.2.8 Statistische Analyse

Sämtliche Daten sind als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (engl.: *standard deviation*; SD) angegeben. Für die statistische Auswertung wurde die GraphPad Prism 5 Software verwendet. Da GraphPad Prism ein internationales Programm ist, wurde bei allen Achsenbeschriftungen ein Komma durch einen Punkt ersetzt. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen miteinander wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Bei einer statistischen Analyse mehrerer Gruppen untereinander wurde eine Varianzanalyse (engl.: *One Way Analysis of Variance*; ANOVA) mit anschließendem Student-Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Signifikant unterschiedliche Werte sind mit * gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende Gen-Expressionsanalyse der Bestandteile elastischer Fasern während der murinen postnatalen Entwicklung (Alveolarisierung) und des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus

Die Bildung und Deposition elastischer Fasern ist obligatorisch für die Bildung von Alveolen während der Entwicklung [50, 254]. Eine Deregulation der Bildung oder Assemblierung elastischer Fasern führt zu einer krankhaften Missbildung von Alveolen [255-257] oder kann sogar letale Folgen in der Entwicklung haben [51, 123]. Es wird vermutet, dass für die Assemblierung funktionsfähiger elastischer Fasern ein spezielles Expressionsprogramm aller dafür nötigen Bestandteile (z.B. Elastin, Fibrillin, MAGP) und Cofaktoren (z.B. Fibuline, Lysyloxidasen) essentiell ist [125, 129]. Diese spezifische und aufeinander abgestimmte Expression der beteiligten Faktoren und Bestandteile elastischer Fasern soll allerdings ausschließlich während der Entwicklung eines Organismus möglich sein [126]. Weiter führt diese Hypothese aus, dass ein vollentwickelter Organismus nicht in der Lage sei, dieses spezifische Expressionsprogramm zu rekapitulieren, wodurch es unmöglich ist, elastische Fasern neu zu bilden bzw. zerstörte adäquat zu ersetzen. Da kompensatorisches Lungenwachstum unter anderem eine Neubildung von Alveolen (Neoalveolarisierung) beinhaltet [56, 57], wozu elastische Fasern zwingend nötig sind, sollte mittels einer ausführlichen vergleichenden Expressionsanalyse der Bestandteile elastischer Fasern sowie der für deren Assemblierung nötigen Faktoren untersucht werden, ob das entwicklungspezifische Expressionsprogramm dieser Gene auch während des Kompensationsprozesses nach Pneumonektomie auftritt. Die Analyse der mRNA-Expression der Hauptbestandteile elastischer Fasern (Elastin, Fibrillin 1) zeigte, dass diese in der postnatalen Entwicklung stärker in der Lunge exprimiert werden, verglichen mit deren Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums (Abbildung 4.1). Besonders die mRNA-Expression von Elastin ist postnatal um ein Vielfaches ($RQ > 30$ an Tag 12, 14 postnatal) erhöht. Das Expressionsmuster der Elastin-mRNA-Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums ist ausgenommen an Tag 8 der postnatalen Expression ähnlich. Allerdings in einem weitaus geringeren Ausmaß (Abbildung 4.1 A). Fibrillin 1 zeigte keine Veränderungen in der mRNA-Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums, verglichen mit den Kontrolltieren, wohingegen dessen postnatale mRNA-Expression an Tag 8 und 12 signifikant erhöht ist. Ausgenommen an Tag 2 und 8 postnatal ist eine tendenziell höhere Fibrillin 1-mRNA-Expression zu erkennen. Das

postnatale Expressionsmuster unterscheidet sich stark von der Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums (Abbildung 4.1 B).

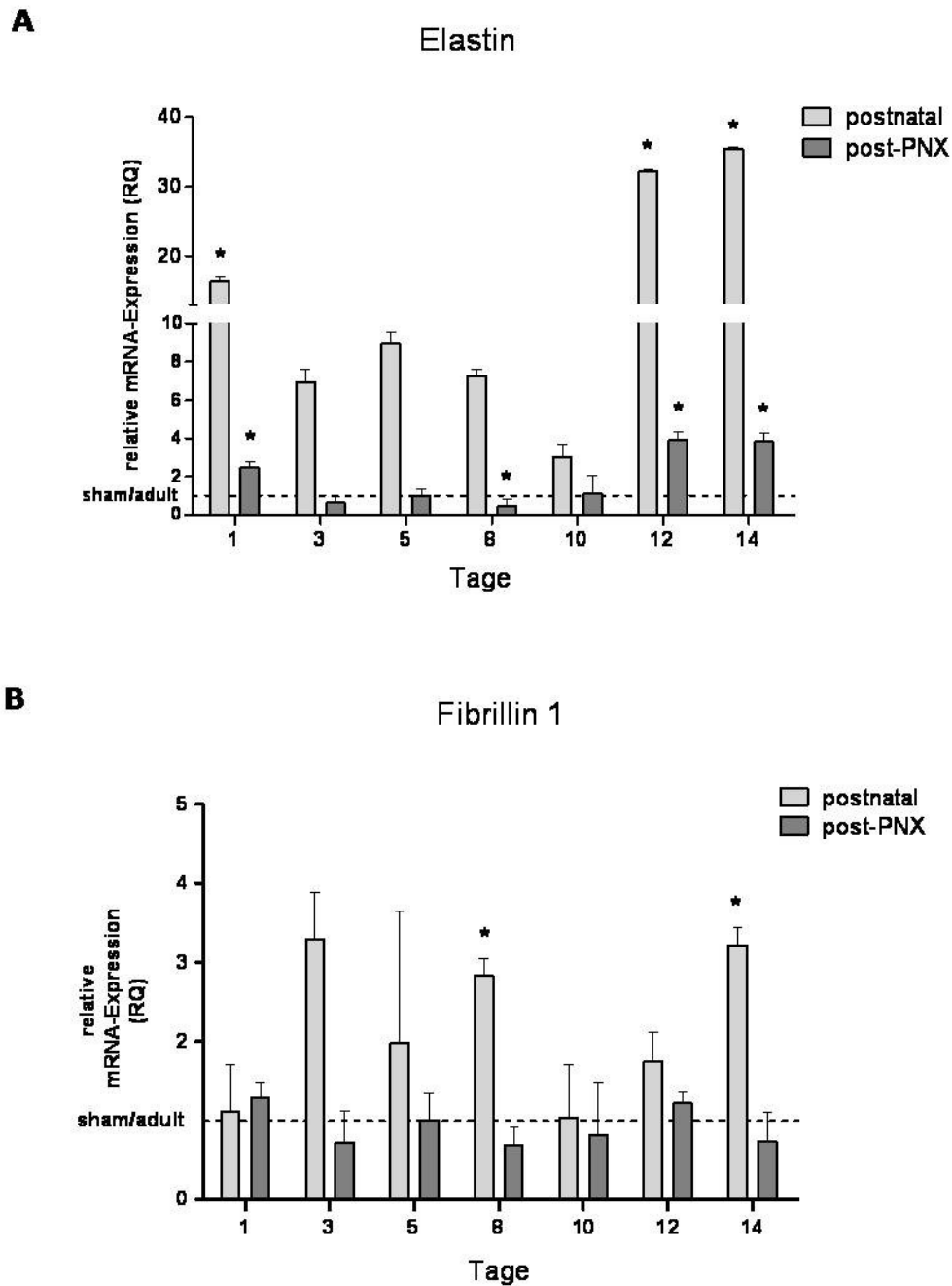


Abbildung 4.1: mRNA-Expression von Elastin und Fibrillin 1 in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen

Die rechte Lunge wurde aus Mäusen an Tag postnatal 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14 isoliert und die mRNA Expression von Elastin (**A**; postnatal) und Fibrillin 1 (**B**; postnatal) via qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente Lungenhomogenat aus den rechten Lungen adulter Mäuse (10 Wochen). Weiterhin wurden adulte Mäuse (10 Wochen) pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14 Tage nach dem Eingriff (post-PNX) wurde die verbliebene bzw. die rechte Lunge isoliert und die mRNA Expression von Elastin (**A**; post-PNX) und Fibrillin 1 (**B**; post-PNX) via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (postnatal/adult wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in adulten/sham-operierten Tieren (sham/adult: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte/adulte Tiere).

Abbildung 4.2 zeigt die postnatale als auch post-PNX mRNA-Expression ausgewählter Helferfaktoren und weiterer Komponenten, die für die Assemblierung elastischer Fasern nötig sind. Auch deren mRNA-Expression war, insofern sie induziert war, postnatal generell höher, verglichen mit deren Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums. Fibrillin 2 war an Tag postnatal 14 am stärksten von allen gezeigten Genen exprimiert. Bezüglich MAGP 1 konnte postnatal (Tag 1, 5, 12, 14; Abbildung 4.2 A) sowie post-PNX (Tag 1; Abbildung 4.2) signifikant erhöhte mRNA-Expression festgestellt werden. Die Expressionsmuster während der postnatalen Entwicklung und während des kompensatorischen Lungenwachstums unterscheiden sich zum Teil stark (Abbildung 4.2 A-B). So war beispielsweise die mRNA- Expression von Fibulin 4 an Tag post-PNX 5 (Abbildung 4.2 B) signifikant erhöht während sie an Tag postnatal 5 tendenziell erniedrigt ist (Abbildung 4.2 A). Das Gegenteil ist der Fall, wenn man die mRNA-Expression von Fibrillin 2 und MAGP 1 postnatal (Tag 14; Abbildung 4.2 A) mit post-PNX (Tag 14; Abbildung 4.2 B) vergleicht.

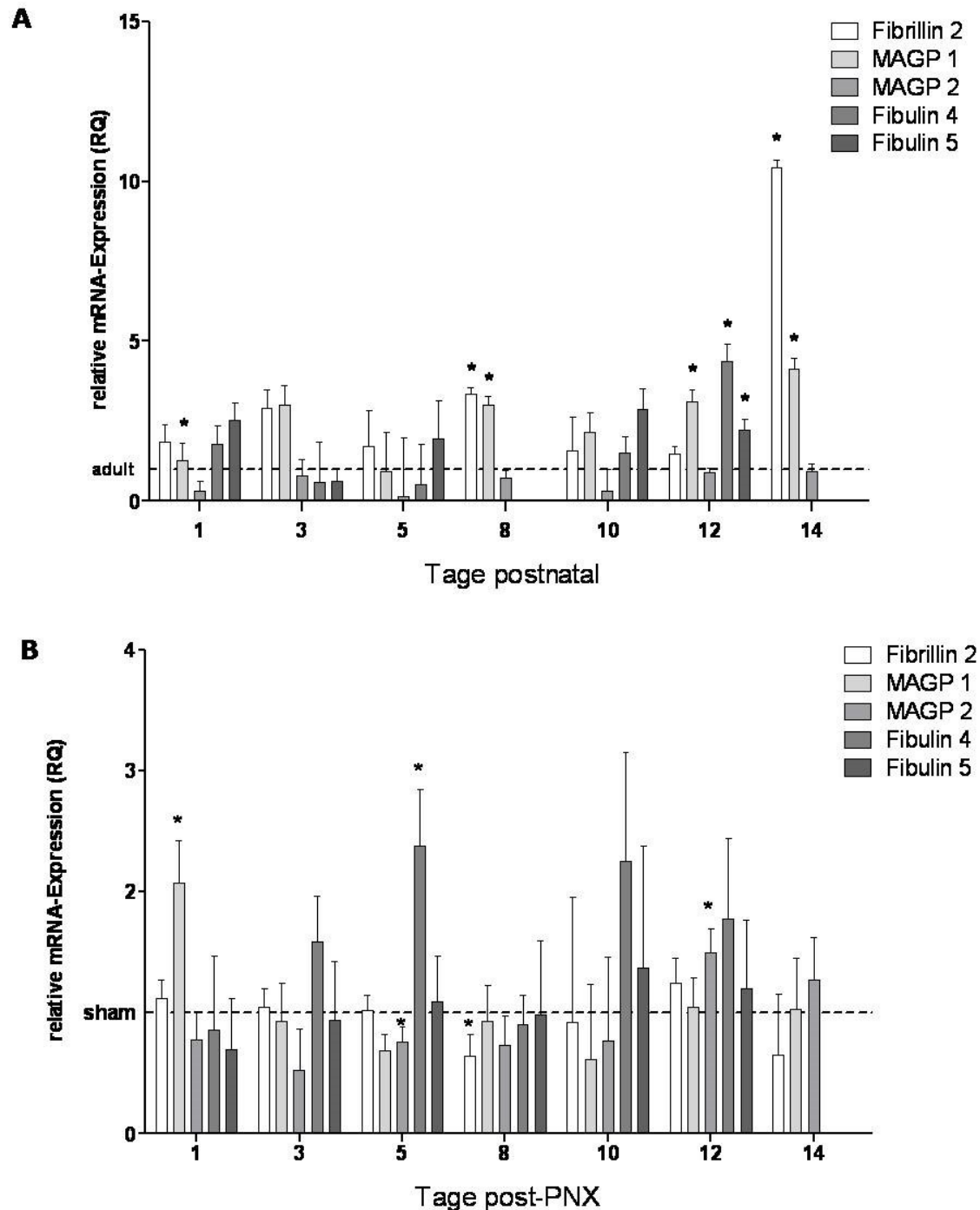


Abbildung 4.2: mRNA-Expression von ausgewählten Assemblierungsfaktoren elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen

A) Die rechte Lunge wurde aus Mäusen an Tag 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14 postnatal isoliert und die mRNA-Expression von Fibrillin 2, MAGP 1, MAGP 2, Fibulin 4 und Fibulin 5 via qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente Lungenhomogenat aus den rechten Lungen adulter Mäuse (10 Wochen). PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (postnatal/adult) wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in adulten Tieren (adult: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. adulte Tiere).

B) Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14 nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. die rechte

*Lunge isoliert und die mRNA-Expression von Fibrillin 2, MAGP 1, MAGP 2, Fibulin 4 und Fibulin 5 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/sham) wurden 4-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere).*

Generell zeigte ein Großteil der analysierten Gene an Tag 12 und 14 postnatal die höchsten mRNA-Expressionen (Abbildung 4.1 A-B, Abbildung 4.2 A). Während des kompensatorischen Lungenwachstums war ausschließlich die mRNA-Expression von Elastin und zu einem geringeren Maße die von MAGP 1 an diesen Tagen erhöht (Abbildung 4.1 A, Abbildung 4.2 B). Die detaillierte Analyse aller anderen Bestandteile elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren ist im Anhang zu finden (siehe Kapitel 11).

4.2 Extrazellulärmatrix-modulierende Faktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus

Kompensatorisches Lungenwachstum ist ein aktiver Prozess, was ein Umbau (engl.: *Remodeling*) der verbliebenen Lungenstruktur nicht ausschließt [56, 57]. Dabei scheint die Extrazellulärmatrix, die unter anderem aus elastischen Fasern besteht, eine wichtige Rolle zu spielen [81]. Die Struktur dieser Matrix kann direkt und indirekt durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden [114, 258], was eine nähere Untersuchung von Extrazellulärmatrix-modulierenden Faktoren rechtfertigte.

4.2.1 Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP 9 und 2) während des kompensatorischen Lungenwachstums

Über die Rolle der Matrixmetalloproteinasen bezüglich der Lungenentwicklung als auch des kompensatorischen Lungenwachstum ist bis heute nur wenig bekannt [87, 139]. Da die Extrazellulärmatrix zum Teil aus unlöslichen Polymeren (z.B. elastische Fasern) besteht, scheint zumindest ein teilweiser enzymatischer Abbau während des Umbaus der verbliebenen Lunge während des kompensatorischen Lungenwachstums unumgänglich. Aus diesen Gründen wurde zunächst mittels Zymographie die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen während des kompensatorischen Lungenwachstums analysiert. Die Analyse zeigte, dass die Aktivität von MMP 9 einen Tag nach Pneumonektomie signifikant höher war als in sham-operierten Tieren (Abbildung 4.3 A-B). An Tag 3, 5 und 7 post-PNX konnten keine Unterschiede in der Aktivität von MMP 9 verglichen mit der Aktivität in sham-operierten Tieren (sham; RQ = 1) detektiert werden. Keine Veränderung wurde ebenfalls bezüglich der Aktivität von MMP 2 während des kompensatorischen Lungenwachstums im Vergleich zu sham-operierten Tieren festgestellt (Abbildung 4.3 C). An Tag 1 nach PNX war die Aktivität dieses Enzyms erniedrigt. Dies war jedoch nicht signifikant.

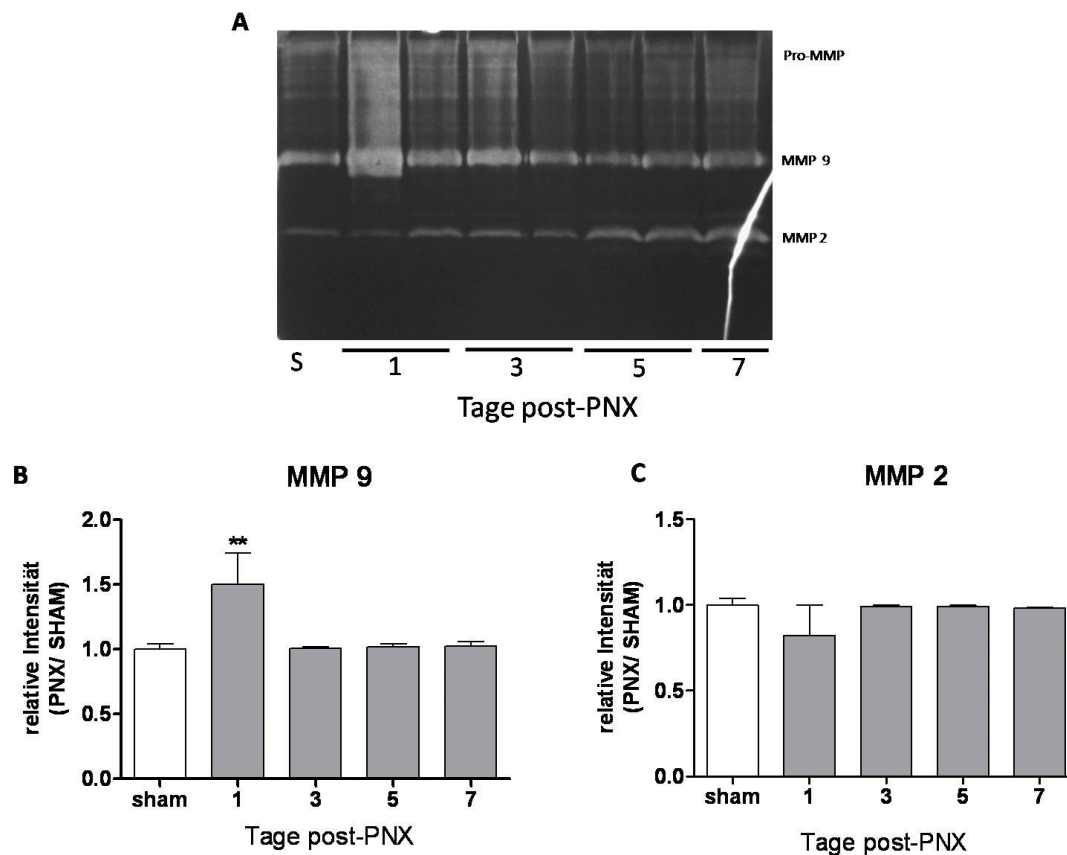


Abbildung 4.3: Aktivität von MMP 9 und MMP 2 während des kompensatorischen Lungenwachstums

Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1, 3, 5, und 7 Tage nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. die rechte Lunge isoliert und die Aktivität von MMP 9 und MMP 2 via Zymographie bestimmt. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/sham) wurden 2-3 Tiere analysiert. Abgebildet sind ein repräsentatives Zymogramm (A) sowie die densitometrische Auswertung der Aktivität von MMP 9 (B) und MMP 2 (C) dargestellt als MW + SD der relativen Intensität in Bezug auf die gepoolte Aktivität in sham-operierten Tieren (**: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere und signifikant unterschiedlich zu anderen Zeitpunkten; S = sham).

4.2.2 mRNA-Expression von MMP 9, Timp1 und Tenascin C während des kompensatorischen Lungenwachstums

Nach der Bestimmung der Aktivität der MMPs wurde untersucht, ob die gesteigerte Aktivität von MMP 9 mit dessen mRNA-Expression korreliert. Weiterhin sollte ein potentieller Einfluss des endogenen MMP-Inhibitors Timp1 auf die Aktivität der MMP evaluiert werden, wozu die mRNA-Expression dieses Gens während des kompensatorischen Lungenwachstums ebenfalls analysiert wurde. Auch die mRNA-Expression des extrazellulären Proteins Tenascin C (TnC) wurde näher analysiert, da es in der Lage ist, die Struktur der Extrazellulärmatrix direkt oder indirekt über eine Modulation von MMP zu beeinflussen [157, 259-261]. Weiterhin war TnC in mehreren Studien eines der am stärksten regulierten Gene während des kompensatorischen Lungenwachstums [100, 101].

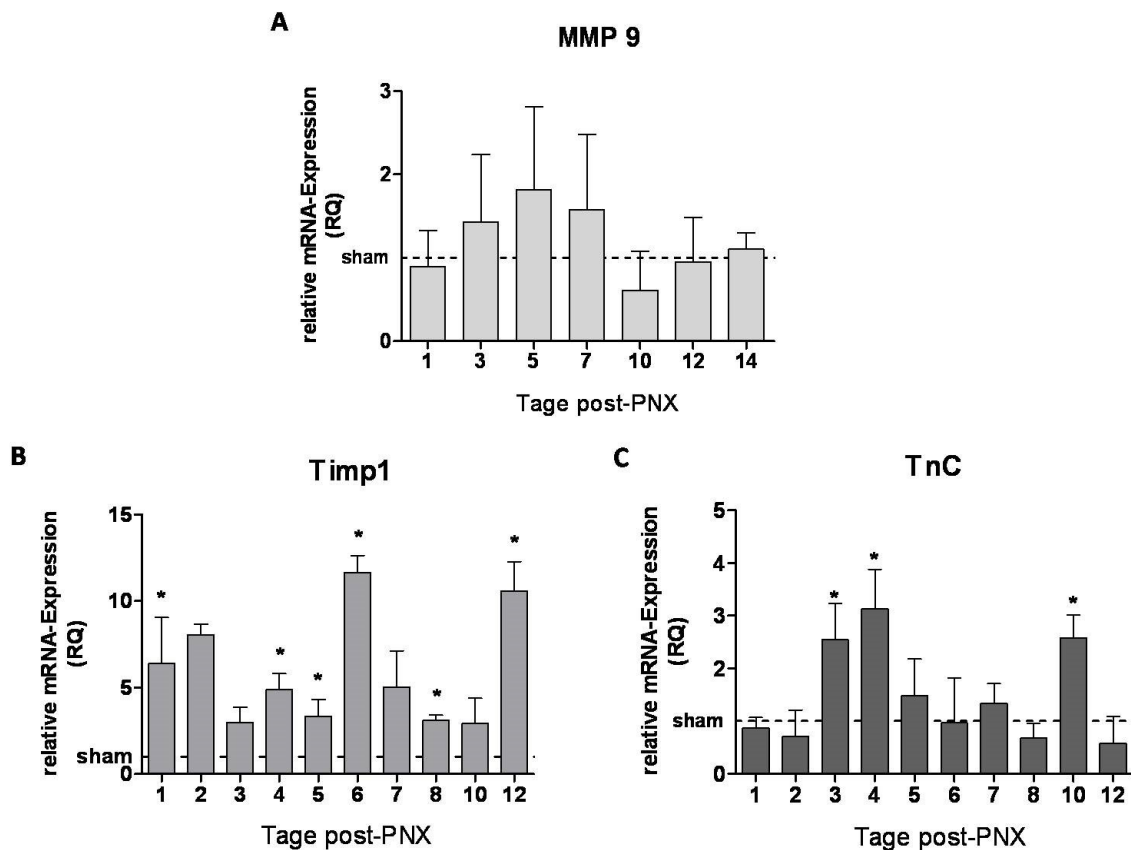


Abbildung 4.4: mRNA-Expression von MMP 9, Timp1 und TnC in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen

Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. An den Tagen 1, 3, 5, 7, 10, 12 und 14 nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. rechte Lunge isoliert und die mRNA-Expression von MMP 9 via qRT-PCR bestimmt (A). Weiterhin wurde an 1-8, 10 und 12 Tage nach dem jeweiligen Eingriff die mRNA-Expression von Timp1 (B) und TnC (C) mittels qRT-PCR analysiert. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/sham) wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge des analysierten Gens (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere).

Abbildung 4.4 A zeigt, dass die mRNA-Expression von MMP 9 nicht signifikant während des kompensatorischen Lungenwachstums reguliert wurde. Es war ein leichter Trend zu einer erhöhten mRNA-Expression an den Tagen 3, 5 und 7 post-PNX zu erkennen. Die mRNA-Expression von Timp1 hingegen war an allen analysierten Zeitpunkten post-PNX signifikant (Tag 1, 4, 5, 6, 8, 12 post-PNX) oder tendenziell (2, 3, 7, 10 post-PNX) hochreguliert, wobei die mRNA-Expression an den Tagen 6 und 12 während des kompensatorischen Lungenwachstums am stärksten war. An diesen Tagen war die mRNA-Expression von Timp1 mehr als 10fach höher als in den sham-operierten Kontrolltieren (Abbildung 4.4 B). Abbildung 4.4 C zeigt, dass die mRNA-Expression des Gens TnC an Tag 3 und 4 nach PNX signifikant höher war als in sham-operierten Tieren. In einer späten Phase (Tag 10) des

kompensatorischen Lungenwachstums konnte eine erneute signifikant gesteigerte Expression des Gens TnC festgestellt werden. Zu allen anderen Zeitpunkten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen pneumonektomierten und sham-operierten Mäusen bezüglich der mRNA-Expression dieses Gens festgestellt.

4.3 Kompensatorisches Lungenwachstum in Timp1-defizienten Mäusen

Da die mRNA-Expression von Timp1 nahezu bei allen analysierten Zeitpunkten post-PNX hochreguliert war, sollte eine Untersuchung der strukturellen Lungenparameter, wie Lungenvolumen, alveolare Oberfläche, alveolare Septendicke sowie der Anzahl der Alveolen, in pneumonektomierten Timp1^{-/-} Mäusen Aufschluss über den Einfluss von Timp1 auf das kompensatorische Lungenwachstum geben. Hierbei wurden die genannten Strukturparameter mittels stereologischer Methoden bestimmt und mit den strukturellen Parametern von Wildtypmäusen (C57BL/6J) verglichen (3.2.2).

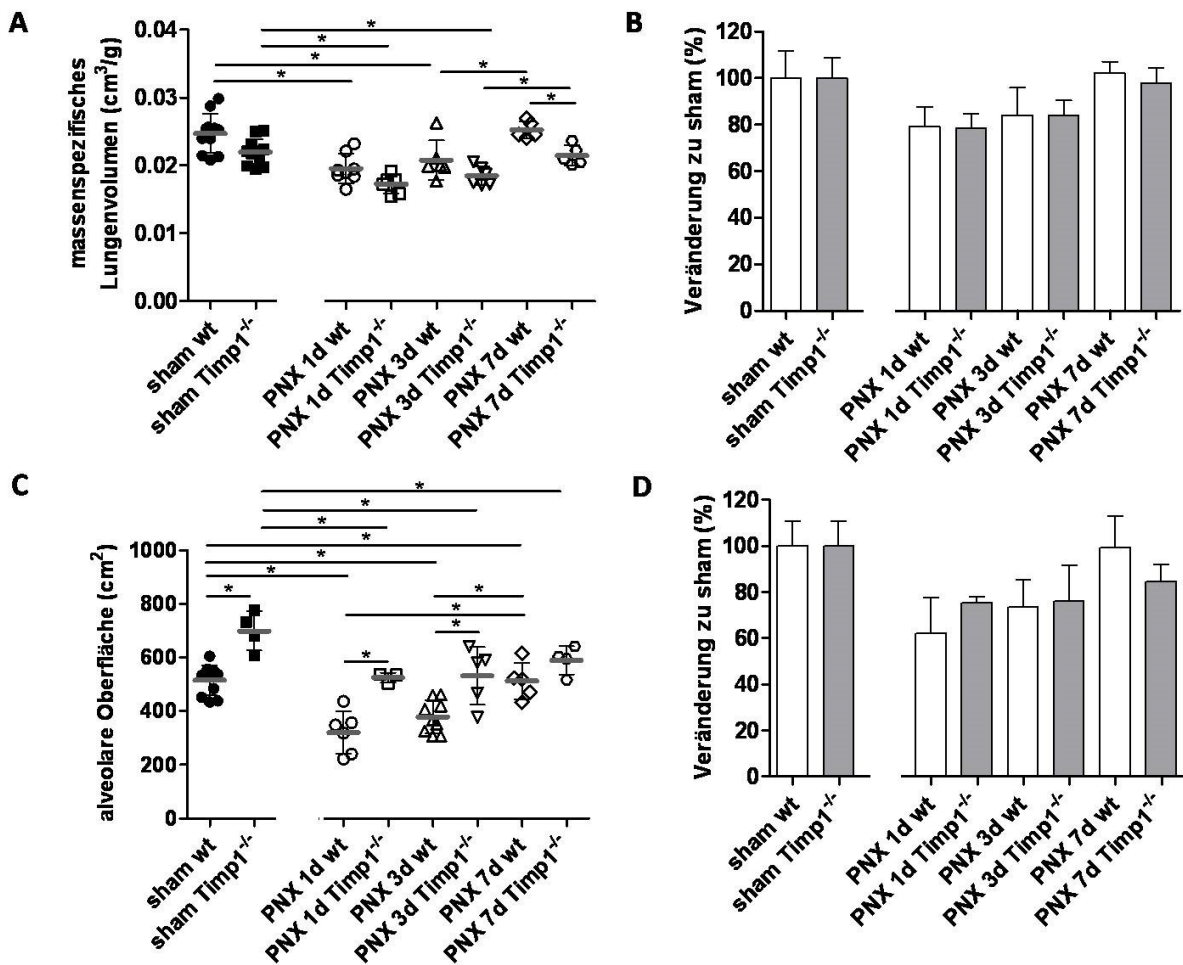


Abbildung 4.5: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten Timp1 Knockout- und Wildtypmäusen

Timp1^{-/-} Mäuse und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge bzw. die gesamte Lunge isoliert und das massenspezifische Lungenvolumen (A) sowie die alveolare Oberfläche (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Lungenvolumen bzw. alveolare Oberfläche sowie MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$)

Zusätzlich ist die Veränderung des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche in % (B, D) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder *Timp1*^{-/-}) dargestellt. Abgebildet sind MW + SD.

Die Analyse des massenspezifischen Lungenvolumens zeigte, dass *Timp1*^{-/-} Mäuse mit im Mittel $0,022 \pm 0,002$ cm³/g ein kleineres Lungenvolumen als Wildtypmäuse ($0,025 \pm 0,003$ cm³/g) hatten (Abbildung 4.5 A). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Signifikant unterschiedlich war der durch Pneumonektomie hervorgerufene Verlust des massenspezifischen Lungenvolumens bei Wildtyp- sowie bei *Timp1*^{-/-} Tieren. Bezieht man das gemessene Lungenvolumen der beiden Mausstämme auf das Ursprungsvolumen nach einer sham-Operation, so war bei *Timp1*^{-/-} als auch bei Wildtypmäusen ein Zugewinn an

Lungenvolumen nach Pneumonektomie zu erkennen. Der Volumentrückgang durch den Verlust der linken Lunge wurde hierbei nach 7 Tagen durch eine Volumenzunahme der verbliebenen rechten Lunge ausgeglichen (Abbildung 4.5 B). Diese Zunahme war zwischen Tag 3 und 7 in beiden untersuchten Mausstämmen signifikant. Auch bezüglich der Regenerationsrate konnte für $Timp1^{-/-}$ - und Wildtypmäuse ähnliche Werte gemessen werden. Zwischen Tag 1 und 3 vergrößerte sich das massenspezifische Lungenvolumen beider Gruppen um ungefähr 10 %, bezogen auf das Ursprungsvolumen der jeweiligen sham-Gruppe (Abbildung 4.5 B). Drei Tage nach PNX betrug das Lungenvolumen $84,1 \pm 11,7$ (wt) bzw. $\pm 6,3$ ($Timp1^{-/-}$) % des Volumens der entsprechenden sham-Gruppe. Aus Abbildung 4.5 C-D geht hervor, dass $Timp1^{-/-}$ Tiere der sham-Kontrollgruppe eine signifikant größere alveolare Oberfläche hatten als Wildtypmäuse der gleichen Gruppe. Wie bei der Messung des massenspezifischen Lungenvolumens, war der pneumonektomiebedingte Verlust der linken Lunge signifikant an einem Rückgang der alveolaren Oberfläche bei beiden Mausstämmen erkennbar. Bei pneumonektomierten Wildtypmäusen wurde weiterhin ein signifikanter Anstieg der alveolaren Oberfläche beobachtet, welche an Tag 7 einen Wert von $512,5 \pm 68$ cm² erreichte und somit wieder nahezu der alveolaren Oberfläche der Wildtyp-sham-Gruppe ($515,7 \pm 55,3$ cm²) entsprach. Zwischen Tag 1 und 3 nach PNX hingegen, nahm die alveolare Oberfläche bei $Timp1^{-/-}$ Mäusen tendenziell nur sehr gering zu im Vergleich zu pneumonektomierten Wildtypmäusen. So wurde für $Timp1^{-/-}$ Tiere eine Zunahme der alveolaren Oberfläche um $6,5$ cm² und bei Wildtypmäusen um $58,21$ cm² festgestellt (Abbildung 4.5 C). Sieben Tage nach PNX betrug die alveolare Oberfläche der $Timp1^{-/-}$ Mäuse 85 % der alveolaren Oberfläche der sham-operierten $Timp1^{-/-}$ Tiere (Abbildung 4.5 D). Die Anzahl der Alveolen war bei sham-operierten $Timp1^{-/-}$ Tieren signifikant niedriger als bei sham-operierten Wildtyptieren. Der Verlust der linken Lunge durch Pneumonektomie äußerte sich in einem signifikanten Rückgang der Alveolenzahl bei beiden Mausstämmen (Abbildung 4.6 A). Der kompensatorische Zugewinn an Alveolen der verbliebenen rechten Lunge zwischen Tag 1 und 3 nach Pneumonektomie betrug in $Timp1^{-/-}$ und Wildtypmäusen ungefähr 3 %, wobei an Tag 1 die Anzahl der Alveolen bei Wildtypmäusen $63,8 \pm 9,5$ % und bei $Timp1^{-/-}$ Tieren $75,9 \pm 5,6$ % bezogen auf die Anzahl der Alveolen der jeweiligen sham-Gruppe betrug (Abbildung 4.6 B). An Tag 7 post-PNX zeigten die Messwerte von $Timp1^{-/-}$ Mäusen eine starke Streuung, wobei die mittlere Alveolenzahl dieser Gruppe die Anzahl der Alveolen der sham-Gruppe um $11 \pm 29,6$ % überstieg.

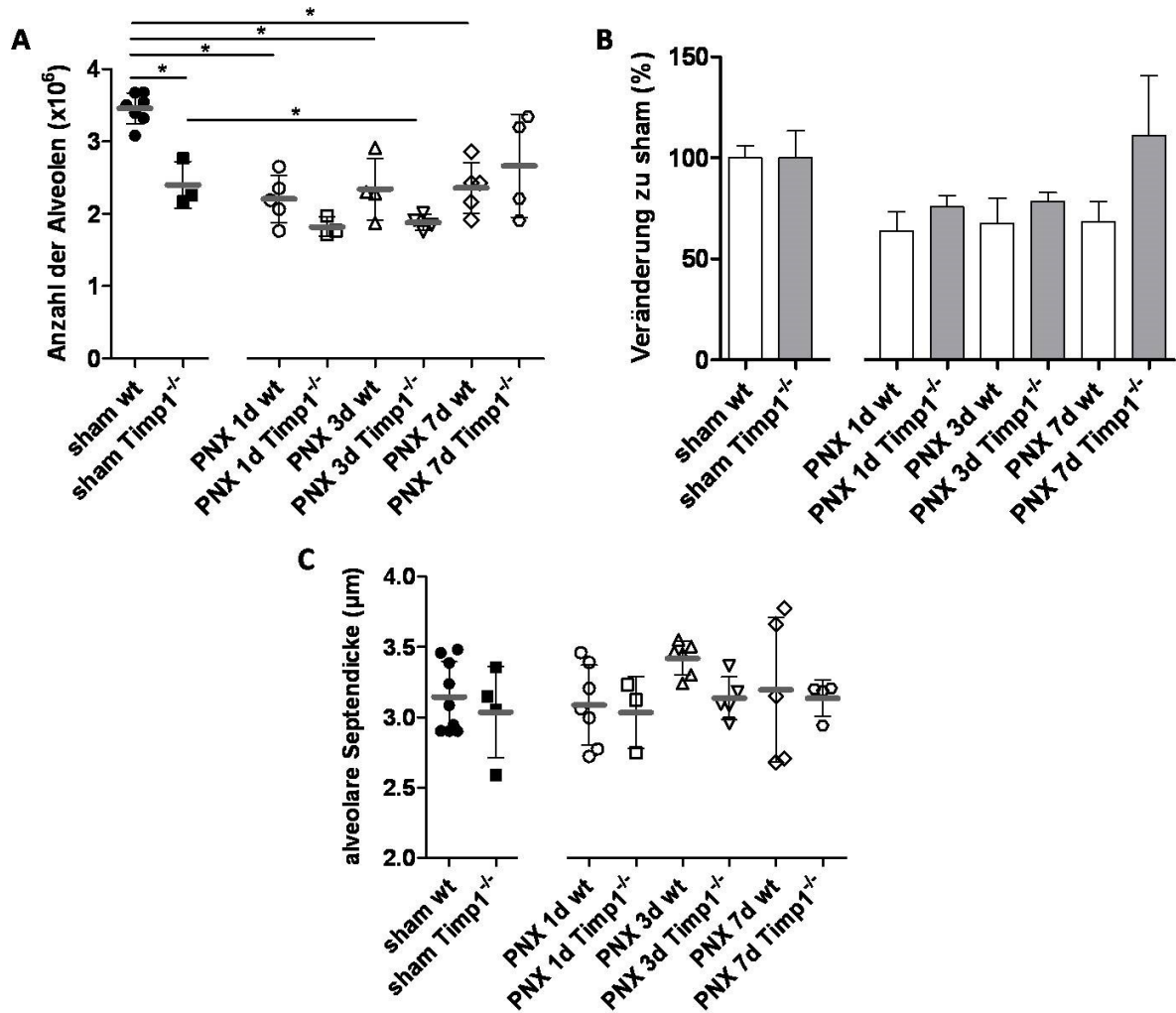


Abbildung 4.6: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/sham-operierten $Timp1^{-/-}$ Mäusen und Wildtypmäusen

$Timp1^{-/-}$ und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge isoliert bzw. die gesamte Lunge und die Anzahl der Alveolen (A) sowie die alveolare Septendicke (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Alveolarzahlen bzw. alveolare Septendicke sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$). Zusätzlich ist die Veränderung der alveolaren Anzahl in % (B) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder $Timp1^{-/-}$) dargestellt. Abgebildet sind MW + SD.

Die Zahl der Alveolen der Wildtypmäuse betrug an Tag 7 nach Pneumonektomie $68,2 \pm 10,1$ % der Alveolenzahl der Wildtyp sham-Gruppe. Die alveolare Septendicke änderte sich in keiner Gruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abbildung 4.6 C). Tendenziell wurde ein leichter Anstieg der Septendicke an Tag 3 nach PNX bei Wildtyptieren beobachtet.

4.4 Messung der Lungenfunktion bei $Timp1^{-/-}$ Mäusen

Die signifikant unterschiedliche alveolare Oberfläche sowie Anzahl der Alveolen bei $Timp1^{-/-}$ im Vergleich zu Wildtyptieren deuteten an, dass dieser Phänotyp auch die Lungenfunktion dieses Knockout-Stammes beeinflussen könnte (4.3.) Zur besseren Beurteilung der stereologischen Untersuchungen wurde die Lungenfunktion von $Timp1^{-/-}$ Mäusen gemessen und die bestimmten Parameter mit Wildtypmäusen (C57BL/6) verglichen (3.2.3).

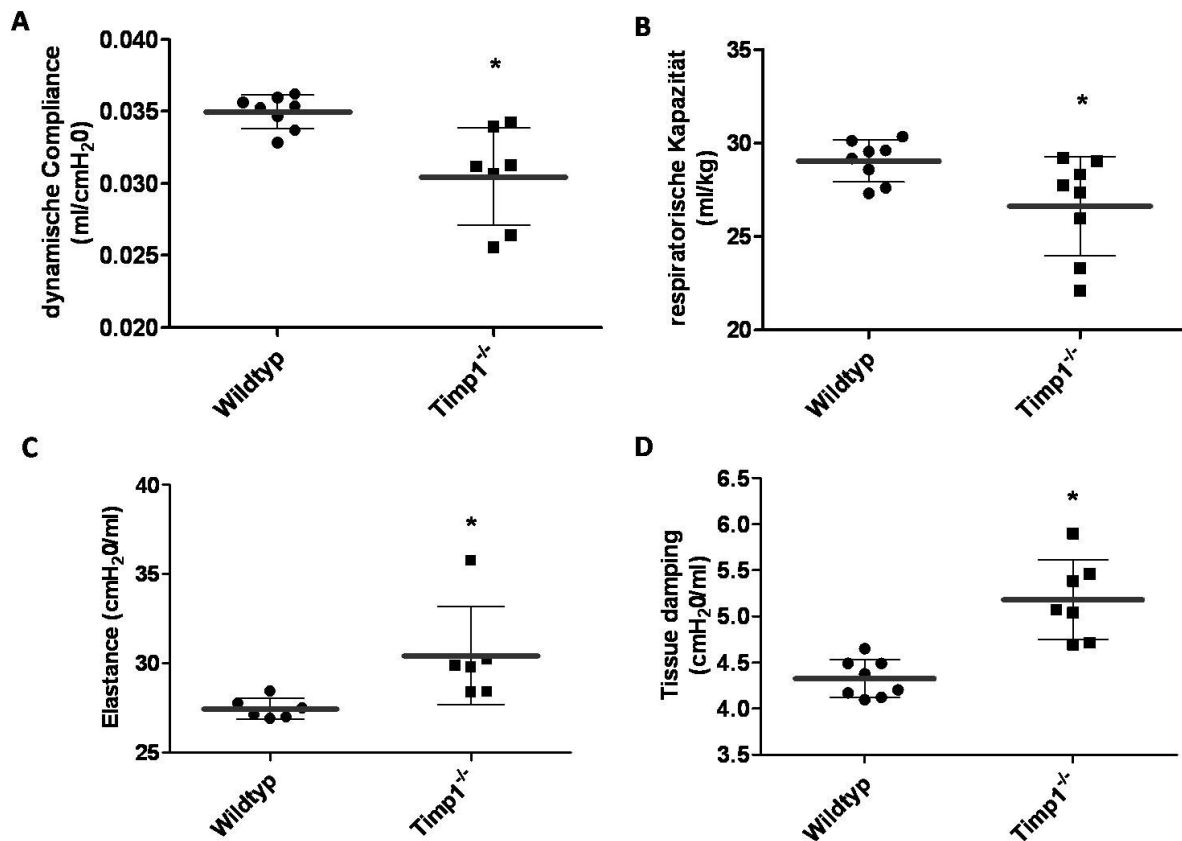


Abbildung 4.7: Messung der Lungenfunktion bei $Timp1^{-/-}$ und Wildtypmäusen

Bei 10 Wochen alten $Timp1^{-/-}$ sowie Wildtypmäusen wurde die Lungenfunktion gemessen und folgende Parameter bestimmt: die dynamische Compliance (A), die respiratorische Kapazität (B), die Steifigkeit (Elastance; C) und das Dämpfungsverhalten des Lungengewebes (Tissue damping; D). Abgebildet sind jeweils die individuellen Messwerte sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD (*: $p < 0,05$ = signifikant unterschiedlich)

Aus Abbildung 4.7 geht hervor, dass alle bestimmten Parameter der Lungenfunktion signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp- und $Timp1^{-/-}$ Tieren waren. Die dynamische Compliance, welche als Maß für die Dehnbarkeit einer Lunge unter Flussbedingungen steht, war hierbei in $Timp1^{-/-}$ Mäusen niedriger als in Wildtypmäusen (Abbildung 4.7 A). Die Volumendifferenz zwischen der funktionellen Residualkapazität und der totalen Lungenkapazität (respiratorische Kapazität) war ebenfalls erniedrigt (Abbildung 4.7 B). Die Lungenfunktionsmessung bezüglich der Parameter Elastance als Maß für die Fähigkeit von Lungengewebe Atmungsenergie zu

konservieren (Abbildung 4.7 C) und des Dämpfungsverhaltens von Lungengewebe (Tissue damping; Abbildung 4.7 D) zeigte, dass diese Parameter bei Timp1^{-/-} Mäuse erhöht sind im Vergleich zu den analysierten Wildtypmäusen.

4.4.1 Veränderte Zelleigenschaften von SAEC-Zellen und primären Fibroblasten durch Timp1

Typischerweise wird die enzymatische Aktivität von MMP durch eine nicht-kovalente Bindung von Timp-Proteinen in deren aktives Zentrum inhibiert. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen Timp und MMP beträgt hierbei 1:1 [262]. Da Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums sehr stark exprimiert wurde (4.2.2) und sich Studien mehren, dass Timp-Proteine nicht nur in der Lage sind MMPs zu inhibieren, sondern auch über zelluläre Signaltransduktionswege eine Zellantwort induzieren können [115, 153], wurde in vorläufigen Zellkulturversuchen untersucht, ob Timp1 die Eigenschaften von pulmonalen Zelltypen beeinflussen kann. In ersten Versuchen wurden hierbei der Einfluss eines Verlustes von Timp1 in primären Fibroblasten der Lunge und der Einfluss einer Stimulation mit Timp1 auf eine Lungenepithelzelllinie (SAEC) evaluiert.

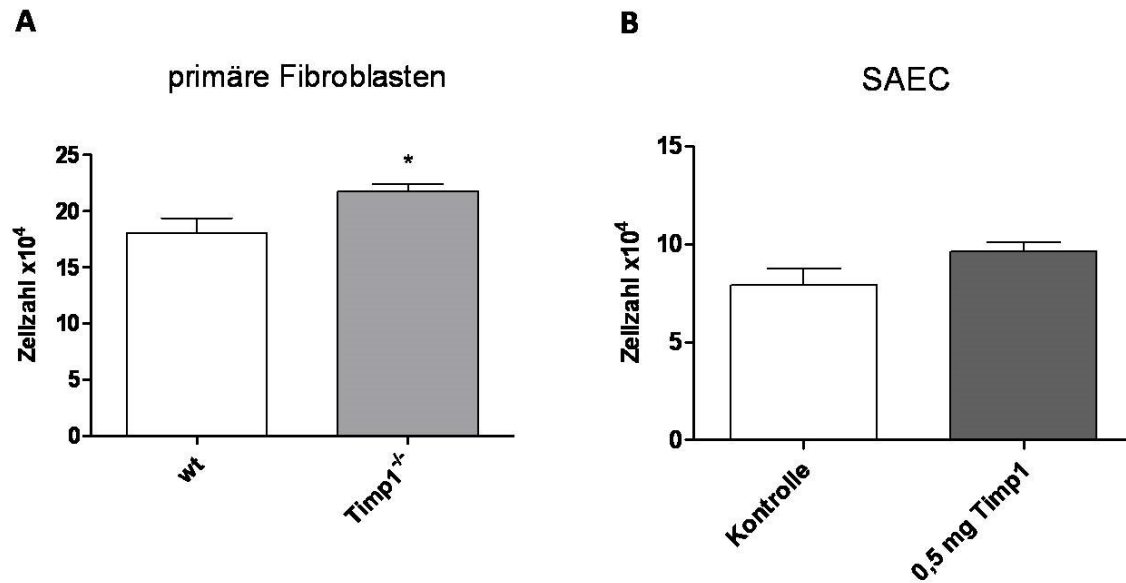


Abbildung 4.8: Einfluss eines Verlustes bzw. Stimulation auf die Zellzahl von primären Fibroblasten und SAEC-Zellen

A) Aus Wildtyp- und *Timp1*^{-/-} Mäusen isolierte primäre Fibroblasten wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt.

B) SAEC-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde mit 0,5 mg *Timp1*-Protein stimuliert. Nicht-stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. 24 Stunden nach der Stimulation wurde die Zellzahl bestimmt.

48 Stunden nach Aussaat der Zellen, war die Zellzahl der primären *Timp1*^{-/-} Fibroblasten signifikant höher als die Zellzahl der primären Wildtypfibroblasten (Abbildung 4.8 A). Eine Stimulation von SAEC-Zellen führte zu einer erhöhten Zellzahl verglichen mit nicht-stimulierten SAEC-Zellen (Abbildung 4.8 B). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine weiterführenden Experimente bezüglich der Proliferations- oder Apoptoserate durchgeführt werden.

4.5 Kompensatorisches Lungenwachstum in TnC-defizienten Mäusen

Aufgrund der Expressionsdaten von TnC während des kompensatorischen Lungenwachstums (4.2.2) wurde ebenfalls dessen Einfluss auf die Fähigkeit zur Kompensation nach einem pneumonektomiebedingten Verlust von Lungengewebe evaluiert (3.2.2). Hierzu wurden TnC knockout Mäuse pneumonektomiert und als Kontrolle sham-operiert. Auch hier wurde durch stereologische Methoden die Strukturparameter Lungenvolumen, alveolare Oberfläche, alveolare Septendicke sowie die Anzahl der Alveolen untersucht und mit den entsprechenden Strukturparametern von Wildtypmäusen (129/Sv) verglichen.

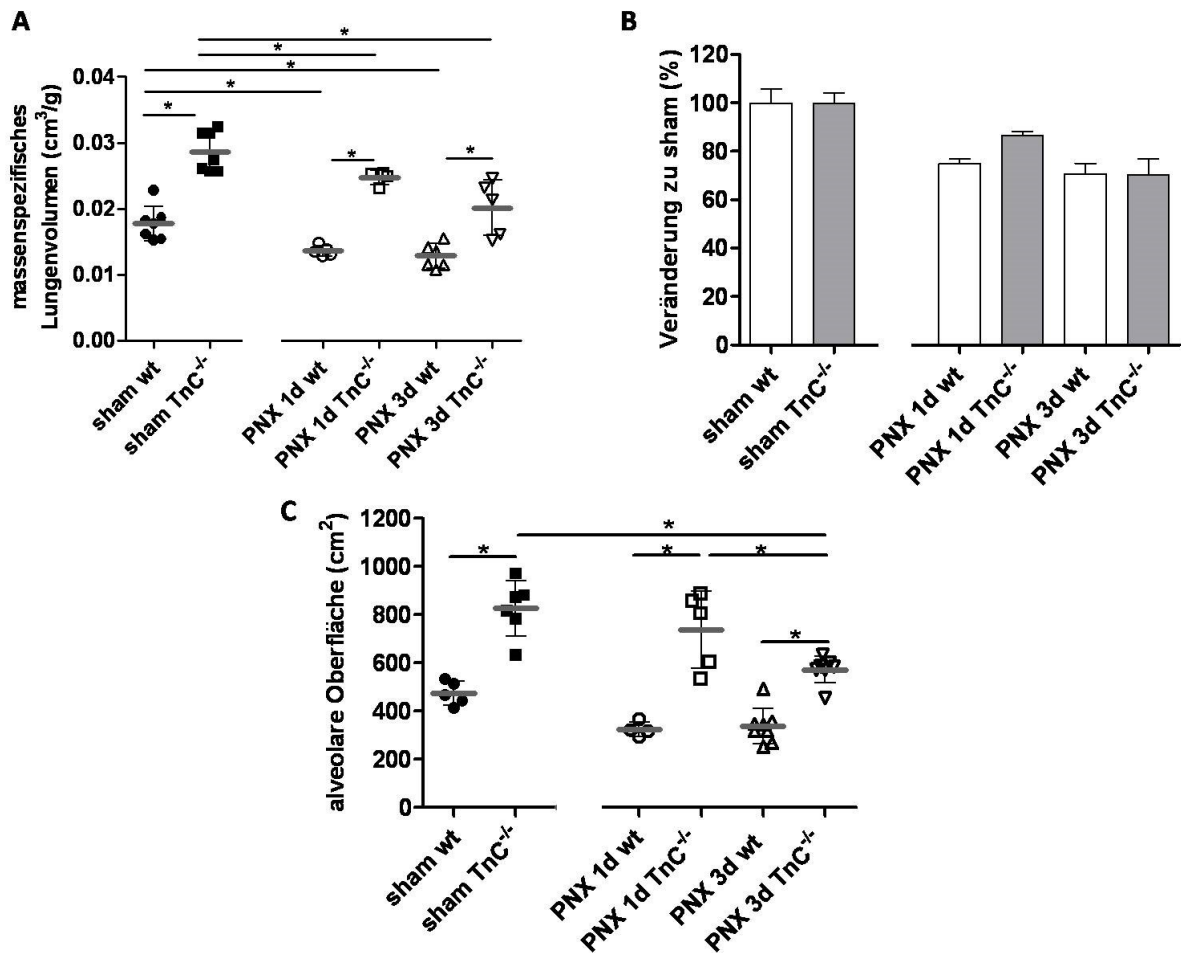


Abbildung 4.9: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten TnC^{-/-} und Wildtypmäusen

TnC^{-/-} Mäuse und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge bzw. die gesamte Lunge isoliert und das massenspezifische Lungenvolumen (A) sowie die alveolare Oberfläche (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Lungenvolumen bzw. alveolare Oberfläche sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$)

Zusätzlich ist die Veränderung des Lungenvolumens in % (B) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder TnC^{-/-}) dargestellt. Abgebildet sind der MW + SD.

Die Analyse des massenspezifischen Lungenvolumens zeigte, dass TnC^{-/-} Mäuse der sham-operierten Kontrollgruppe ein signifikant größeres Lungenvolumen besaßen als Wildtypmäuse der sham-Gruppe. Der PNX-induzierte Volumenverlust war in allen PNX-Gruppen beider Mausstämme ebenfalls signifikant. Jedoch konnte anders als bei der Analyse des Lungenvolumens von Timp1^{-/-} Tieren (4.3; Abbildung 4.5 A-B) kein Anstieg des Lungenvolumens 3 Tage nach PNX in Wildtyp- sowie TnC^{-/-} Mäusen detektiert werden (Abbildung 4.9 A). Die Unterschiede bei den Lungenvolumina waren zwischen TnC^{-/-} und Wildtypmäusen an den Tagen 1 und 3 jeweils signifikant, aber bezogen auf die

Ausgangsvolumina eines Stammes konnte nahezu keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 4.9 A-B). Das massenspezifische Lungenvolumen von TnC^{-/-} Mäusen schien zwischen Tag 1 und 3 nach PNX zurück zu gehen. Ein Tag nach PNX betrug bei Wildtypmäusen das Lungenvolumen $76,8 \pm 4,5$ % des Ausgangslungenvolumens der sham-Wildtypgruppe, wohingegen das Lungenvolumen der TnC^{-/-} Tiere an diesem Tag $86,3 \pm 3,8$ % des Lungenvolumens der TnC^{-/-} sham-Gruppe entsprach (Abbildung 4.9 B). Auch bei der Analyse der alveolaren Oberfläche wurde ein signifikanter Unterschied zwischen sham-operierten TnC^{-/-} und Wildtypmäusen ermittelt, wobei die alveolare Oberfläche der TnC^{-/-} sham-Gruppe größer war. Ein signifikanter Rückgang der alveolaren Oberfläche durch PNX, konnte nur bei TnC^{-/-} Mäusen (Tag 3) beobachtet werden. Zwischen Tag 1 und 3 nach PNX wurde ein geringer bzw. kein Zugewinn an alveolarer Oberfläche bei beiden Mausstämmen detektiert. So erhöhte sich bei Wildtypmäusen in diesem Zeitraum die alveolare Oberfläche um tendenziell $13,2 \text{ cm}^2$ auf $337,8 \pm 73,2 \text{ cm}^2$, wohingegen sich die alveolare Oberfläche bei TnC^{-/-} Mäusen zu verringern schien (Abbildung 4.9 C).

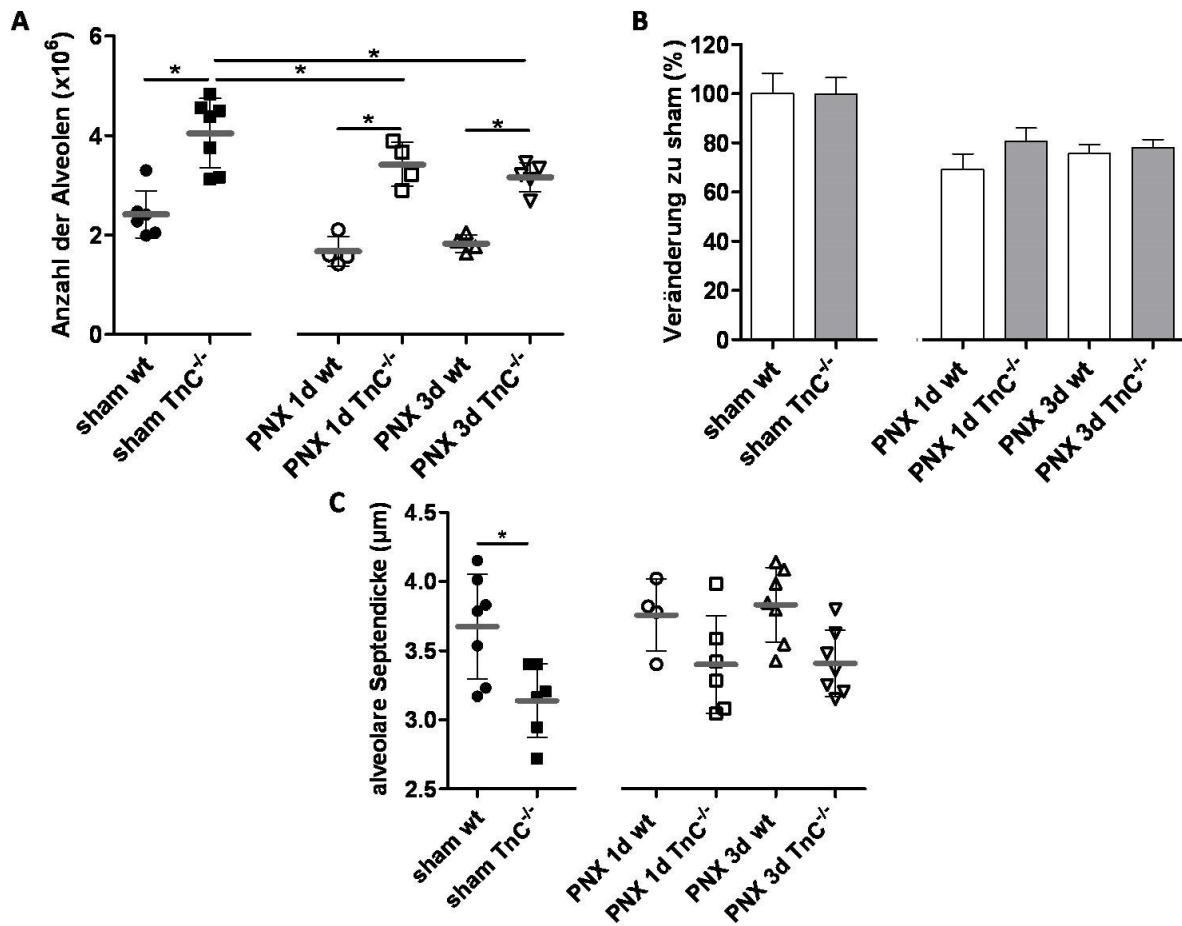


Abbildung 4.10: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/ sham-operierten TnC^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen

TnC^{-/-} und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge isoliert bzw. die gesamte Lunge und die Anzahl der Alveolen (A) sowie die alveolare Septendicke (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Alveolarzahlen bzw. alveolare Septendicke sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$). Zusätzlich ist die Veränderung der alveolaren Anzahl in % (B) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder TnC^{-/-}) dargestellt. Abgebildet sind der MW + SD.

Aus Abbildung 4.10 A ist ersichtlich, dass sich ebenfalls die Anzahl der Alveolen in den beiden sham-Gruppen signifikant unterschieden, wobei TnC^{-/-} Tiere mehr Alveolen als Wildtypmäuse hatten. Die Reduktion der Alveolen durch die operative Entfernung der linken Lunge (PNX) war nur bei TnC^{-/-} Mäusen signifikant unterschiedlich zu sham-operierten TnC^{-/-} Mäusen. Dies war bei Wildtypmäusen nur als Tendenz zu erkennen. An Tag 1 und 3 nach PNX wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Alveolarzahl von Wildtypmäusen zu der Alveolarzahl von TnC^{-/-} Mäusen des gleichen Tages detektiert. Bei keinem der Mausstämme war ein signifikanter Anstieg der Zahl der Alveolen 3 Tage nach PNX zu erkennen. Im Hinblick auf die Anzahl der Alveolen der sham-Gruppe (gesamte Lunge) veränderte sich bei Wildtypmäusen

tendenziell mit einem minimalen Anstieg der Alveolen von $69,2 \pm 12,4$ % an Tag 1 nach PNX auf $75,6 \pm 7,3$ % an Tag 3 nach PNX. Dies konnte nicht bei pneumonektomierten TnC^{-/-} Tieren beobachtet werden, bei denen keine Änderung der Alveolarzahl zu erkennen war (Abbildung 4.10 B). Bezüglich der alveolaren Septendicke konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und TnC^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abbildung 4.10 C). Nach PNX veränderte sich die Septendicke nicht signifikant. In beiden Mausstämmen konnte lediglich ein Trend bezüglich einer Zunahme der alveolaren Septendicke beobachtet werden.

4.6 Messung der Lungenfunktion bei TnC^{-/-} Mäusen

Da die sham-operierte Kontrollgruppe der TnC^{-/-} Mäuse sich bei allen strukturellen Parametern der Lunge signifikant von den strukturellen Parametern der sham-operierten Wildtypmäuse unterschieden hatte (4.6), sollte analysiert werden ob dieser Phänotyp Auswirkungen auf die Lungenfunktion hat. Hierzu wurde die Lungenfunktion von TnC^{-/-} Mäusen gemessen und mit der Lungenfunktion von Wildtypmäusen (129/Sv) verglichen (3.2.3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und TnC^{-/-} Mäusen bezüglich der dynamischen Compliance festgestellt werden. Dennoch war ein Trend zu einer erhöhten dynamischen Compliance als Maß für die Dehnbarkeit einer Lunge während des Atemflusses bei TnC^{-/-} Mäusen zu erkennen (Abbildung 4.11 A). Mit einer Mittelwert von $2,7 \pm 0,2$ ml/cmH₂O/kg wurde eine signifikant höhere statische Compliance bei TnC^{-/-} Mäusen gemessen, wobei die massenspezifische statische Compliance als Maß für die Dehnbarkeit einer Lunge unter flusslosen Bedingungen bei $2,1 \pm 0,4$ ml/cmH₂O/kg in der Gruppe der Wildtypmäuse lag (Abbildung 4.11 B). Die respiratorische Kapazität war in TnC^{-/-} Tieren ebenfalls signifikant höher verglichen mit Wildtypmäusen (Abbildung 4.11 C), wobei die Elastance, als Maß für die Steifigkeit einer Lunge nur tendenziell bei diesen transgenen Tieren erhöht war (Abbildung 4.11 D).

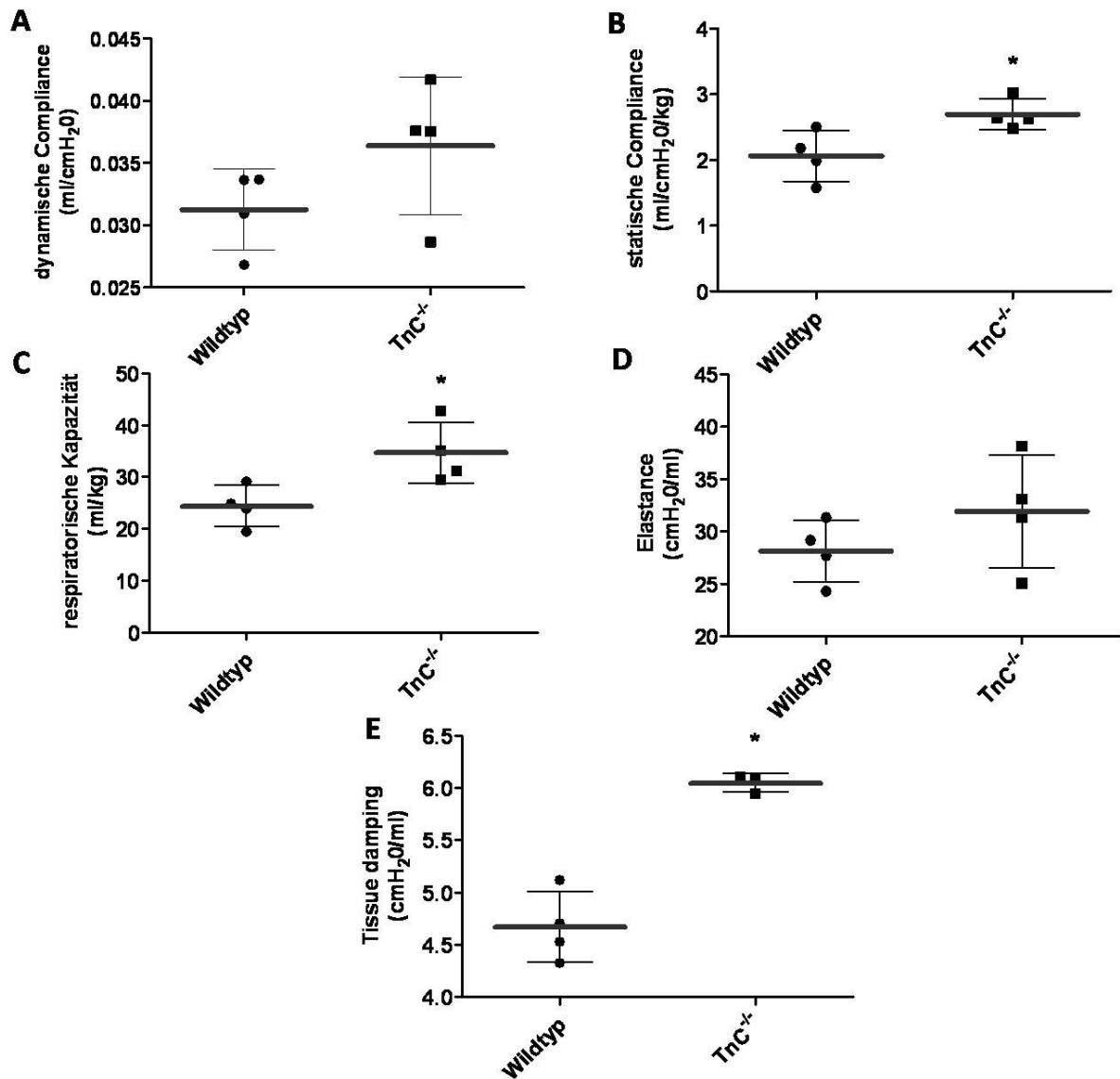


Abbildung 4.11: Messung der Lungenfunktion bei TnC^{-/-}- und Wildtypmäußen

Bei 10 Wochen alten TnC^{-/-} sowie Wildtypmäusen wurde die Lungenfunktion gemessen und folgende Parameter bestimmt: die dynamische Compliance (A), die statische Compliance (B), die respiratorische Kapazität (C), die Steifigkeit (Elastance) (D) und das Dämpfungsverhalten des Lungengewebes (Tissue damping) (E). Abgebildet sind jeweils die individuellen Messwerte sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD (*: $p < 0,05$ =signifikant unterschiedlich).

Das Dämpfungsverhalten des Lungengewebes (Tissue damping) betrug bei TnC^{-/-} Mäusen im Mittel $6 \pm 0,1$ cmH₂O/ml und war somit um ca. 30% größer als in Wildtypmäusen (Abbildung 4.11 E).

4.7 Einfluss einer mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene

Studien konnten zeigen, dass mechanische Kräfte äußerst wichtig für die Induktion des kompensatorischen Lungenwachstum nach Pneumonektomie sind [81, 95]. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob ein mechanischer Reiz eine mRNA-Expression der in dieser Arbeit untersuchten Extrazellulärmatrix-assoziierten Gene (TnC, Elastin und Timp1) induzieren kann. Hierzu wurden primäre Fibroblasten aus den Lungen von Wildtypmäusen isoliert und anschließend auf speziellen 6-Lochplatten mit einem elastischen Boden kultiviert (3.2.6.6.1). Der mechanische Reiz auf die konfluenten Zellen wurde hierbei durch einen vertikal beweglichen Kolben gesetzt, der die elastische Membran der 6-Lochplatten gleichmäßig radial dehnte. Als Kontrolle für die Transduktion des mechanischen Reizes auf die Zellen, diente die mRNA-Expression des Gens *Egr1*, da mehrere Studien zeigen konnten, dass die Expression dieses Gens durch mechanische Reize stimuliert werden kann [263-265]. Aus Abbildung 4.12 geht hervor, dass eine mechanische Stimulation von primären Wildtypfibroblasten die mRNA-Expression von *Egr1* als auch Elastin signifikant hochregulierte. Tendenziell konnte dies auch bezüglich der mRNA-Expression von TnC beobachtet werden. Eine mechanische Dehnung hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Timp1.

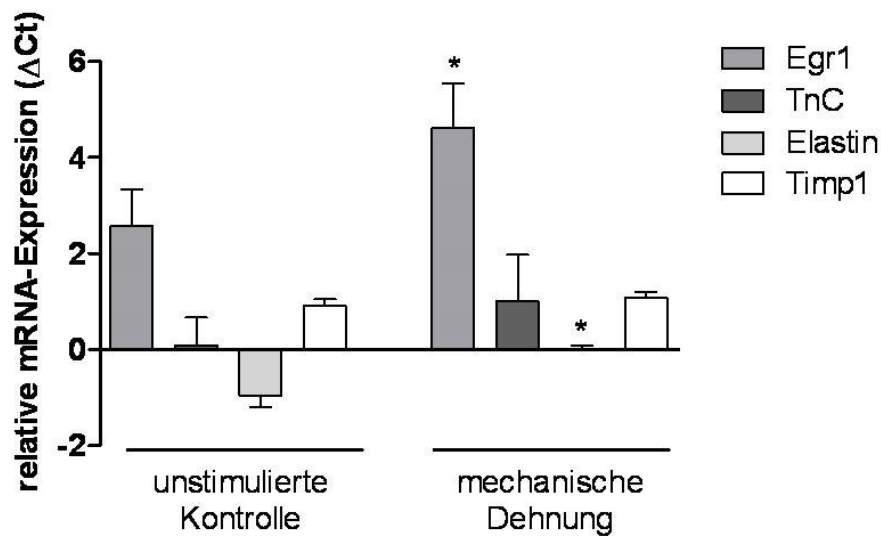


Abbildung 4.12: Einfluss mechanischer Dehnung auf die mRNA-Expression in primären Fibroblasten

Primäre Fibroblasten isoliert aus den Lungen von Wildtypmäusen wurden in Kultur mechanisch stimuliert. Nach der Aufreinigung der RNA aus den Zellen wurde die mRNA-Expression von Egr1, TnC, Elastin und Timp1 in primären Wildtypfibroblasten mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte primäre Wildtypfibroblasten. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (ΔCt) als MW + SD bezogen auf die mRNA-Expression des Referenzgens PBGD. Es wurden primäre Fibroblasten aus den Lungen von 2 Tieren gewonnen. (*: $p < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle).

4.8 Expressionsanalyse von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus

Da die mRNA-Expression von Egr1 durch einen mechanischen Reiz auch in primären Fibroblasten der Lungen möglich war (4.7) und weiterhin ein Micro-Array-Analyse eine Regulation dieses Transkriptionsfaktors nach PNx beobachtete [100], wurde Egr1 ausführlicher untersucht. Zunächst sollte analysiert werden, ob die Expression von Egr1 in sehr frühen Phasen des kompensatorischen Lungenwachstums reguliert ist. Hierzu wurde RNA aus dem Lungenhomogenat pneumonektomierter/sham-operierten Tiere isoliert und mittels quantitativer Real-time PCR analysiert.

Bereits eine Stunde nach der Operation war die mRNA-Expression von Egr1 in pneumonektomierten Tieren um das 7,6-fache höher als in sham-operierten Tieren (Abbildung 4.13). Sechs und 12 Stunden nach Pneumonektomie sank die mRNA-Expression tendenziell auf ein Niveau der Expression in sham-operierten Tieren.

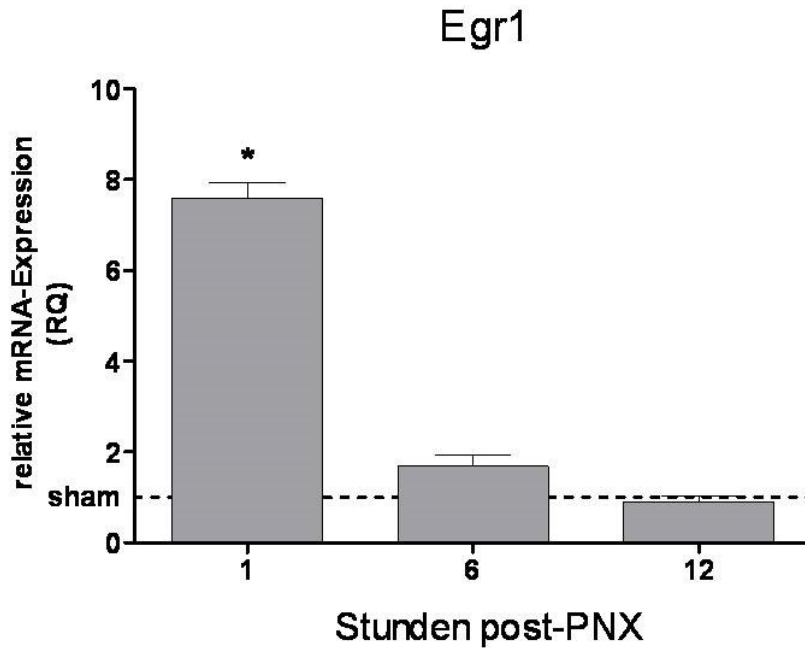


Abbildung 4.13: mRNA-Expression von Egr1 bei frühen Phasen nach dem operativen Eingriff in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen

Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1, 6 und 12 Stunden nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. die rechte Lunge isoliert und die mRNA-Expression von Egr1 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/ sham) wurden 4-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge des analysierten Gens (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tiere (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere).

Eine ausführliche Analyse bezüglich der Expression von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums zeigte, dass dessen mRNA-Expression ebenfalls an Tag 3 und 4 nach PNX signifikant höher war als in sham-operierten Tieren. 7 Tage nach der Pneumonektomie der Tiere war die mRNA-Expression von Egr1 erneut hochreguliert im Vergleich zu den sham-operierten Kontrolltieren. In einer späten Phase (Tag 10) des kompensatorischen Lungenwachstums konnte eine erneute signifikant gesteigerte Expression des Gens TnC festgestellt werden. Zu allen anderen Zeitpunkten wurden keine Unterschiede zwischen pneumonektomierten und sham-operierten Mäusen bezüglich der mRNA-Expression dieser Gene festgestellt.

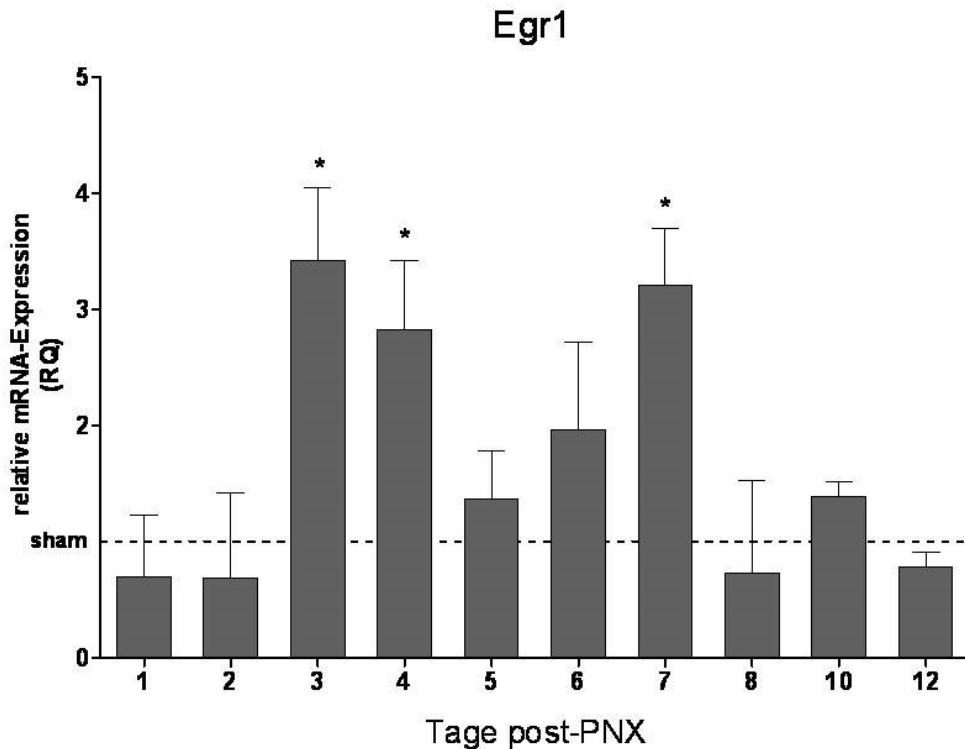


Abbildung 4.14: mRNA-Expression von Egr1 in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen

Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. An den Tagen 2-8, 10 und 12 nach dem Eingriff wurden die verbliebene bzw. rechte Lunge isoliert und die mRNA-Expression von Egr1 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/ sham) wurden 4-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge des analysierten Gens (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tiere (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere).

4.8.1 Expressionsanalyse von Egr1 und TnC in der murinen postnatalen Entwicklung (Alveolarisierung)

Bisher ist kaum etwas über potentielle molekulare Mechanismen bezüglich der Initiation als auch Progression des kompensatorischen Lungenwachstums bekannt [60, 87]. Um mögliche Parallelen des kompensatorischen Lungenwachstums mit der postnatalen Entwicklung besser diskutieren zu können, wurde ebenfalls eine Expressionsanalyse von Egr1 und TnC in einer frühen Phase der Alveolarisierung durchgeführt.

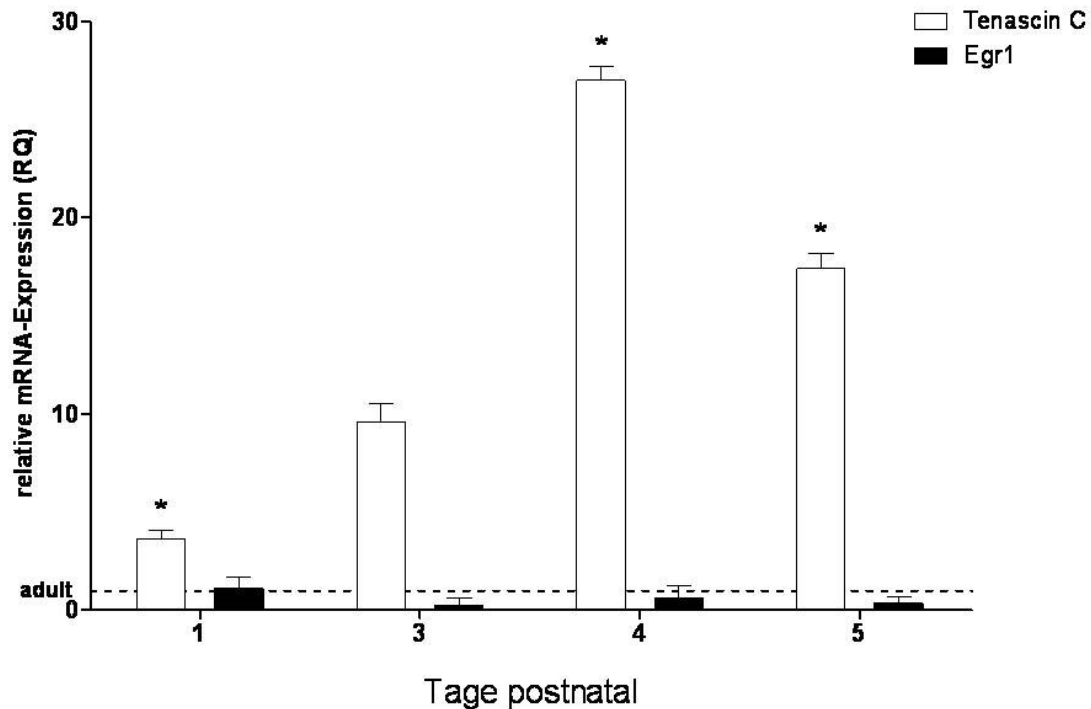


Abbildung 4.15: mRNA-Expression von Egr1 und TnC bei frühen Phasen der Alveolarisierung in Lungenhomogenat von postnatalen Mäusen

Die rechte Lunge wurde aus Mäusen an Tag postnatal 1, 3, 4, 5 isoliert und die mRNA-Expression von Egr1 und TnC via qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle wurde Lungenhomogenat aus den rechten Lungen adulter Mäuse (10 Wochen) verwendet. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (postnatal/ adult) wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in adulten Tieren (adult: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. adulte Tiere).

Die mRNA-Expression von TnC war an allen analysierten Tagen postnatal hochreguliert, wobei an Tag 4 postnatal die stärkste mRNA-Expression festgestellt wurde. Die mRNA-Expression von Egr1 hingegen war nicht reguliert bzw. tendenziell erniedrigt (Abbildung 4.15). Verglichen mit der mRNA-Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums sind Unterschiede zu erkennen. So ist die Expression von TnC-mRNA beispielsweise an Tag 4 postnatal als auch post-PNX erhöht, allerdings ist die postnatale mRNA-Menge im Vergleich nahezu 10mal höher (Abbildung 4.4.). Weiterhin konnte an Tag 5 während des kompensatorischen Lungenwachstums im Gegensatz zu Tag postnatal 5 keine signifikant erhöhte TnC-mRNA-Expression detektiert werden. Während die mRNA-Expression von Egr1 postnatal nicht reguliert bzw. tendenziell erniedrigt war, wurde an den Tagen post-PNX 4 und 5 eine signifikant erhöhte Egr1-mRNA-Expression festgestellt.

4.9 Einfluss einer Deletion des Gens für Egr1 auf die mechanische Stimulation der mRNA-Expression der untersuchten Gene

Da es sich bei Egr1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, wurde untersucht, ob Egr1 möglicherweise einen Einfluss auf die mRNA-Expression der Gene TnC, Elastin und Timp1 nach einer mechanischen Stimulation hat. Hierzu wurde die Expression dieser Gene in mechanisch stimulierten primären Egr1^{-/-} Fibroblasten analysiert und mit deren Expression in nicht-stimulierten primären Egr1^{-/-} Fibroblasten verglichen. Bezüglich der mRNA-Expression von TnC bewirkte eine mechanische Dehnung eine signifikante Hochregulation (Abbildung 4.16), welche auch zumindest tendenziell in Wildtypfibroblasten festgestellt werden konnte (Abbildung 4.12). In primären Egr1^{-/-} Fibroblasten bewirkte eine mechanische Stimulation eine signifikante Herunterregulation der mRNA-Expression von Elastin und Timp1. Im Vergleich zu der mRNA-Expression dieser Gene in Wildtypfibroblasten (Abbildung 4.12) hatte somit ein mechanischer Reiz einen unterschiedlichen Effekt.

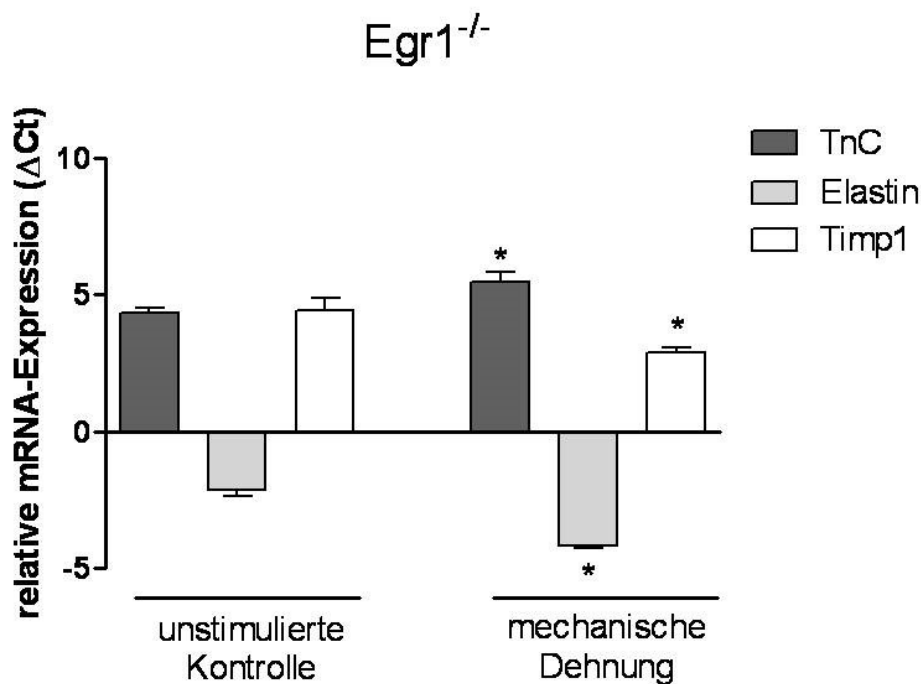


Abbildung 4.16: Einfluss mechanischer Dehnung auf die mRNA-Expression in primären Egr1^{-/-} Fibroblasten

Primäre Fibroblasten isoliert aus den Lungen von Egr1^{-/-} Mäusen wurden in Kultur mechanisch stimuliert. Nach der Aufreinigung der RNA aus den Zellen wurde die mRNA-Expression von TnC, Elastin und Timp1 mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte primäre Egr1^{-/-} Fibroblasten. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (ΔCt) als MW + SD bezogen auf die mRNA-Expression des Referenzgens PBGD. Es wurden primäre Fibroblasten aus den Lungen von 2 Tieren gewonnen. (*: $p < 0,05$ vs. unstimulierte Kontrolle).

4.10 Analyse der Expression von Elastin in primären $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten

Durch die unterschiedlichen Effekte eines mechanischen Reizes auf die Elastin mRNA-Expression in primären Wildtyp und $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten (4.7, 4.9) wurde getestet, ob eine Deletion des Gens für $Egr1$ auch einen negativen Einfluss auf eine gezielte Induktion der Elastin-Expression hat. Zu diesem Zweck wurden primäre Fibroblasten, die aus den Lungen von $Egr1^{-/-}$ Mäusen isoliert wurden, in Kultur mit Tgf β (2 ng/ml), welches ein potenter Induktor der Elastin-Expression ist [266], inkubiert. Als Vergleichsbasis wurden aus Wildtypplungen isolierte primäre Fibroblastenebenfalls mit Tgf β inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte primäre Wildtyp/ $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten.

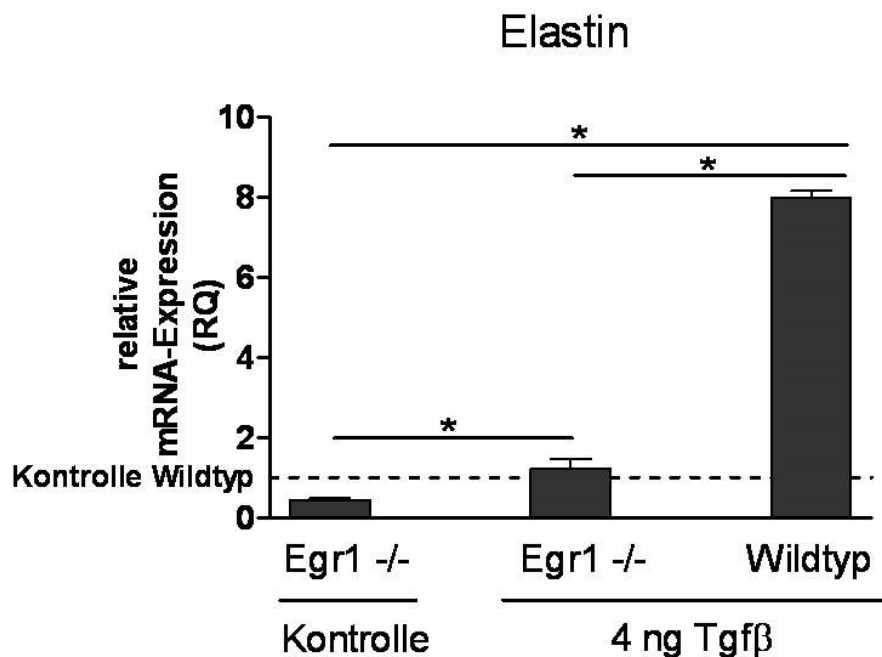


Abbildung 4.17: mRNA-Expression von Elastin in Tgf β -stimulierten primären Wildtyp- und $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten

Primäre Fibroblasten wurden aus den Lungen von $Egr1^{-/-}$ bzw. Wildtypmäusen isoliert und in Kultur für 3 Stunden mit Tgf β (2 ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte primäre Wildtyp- bzw. $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten. Nach der Aufreinigung der RNA aus den Zellen wurde die mRNA-Expression von Elastin mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression (RQ; relative Quantität) als MW + SD bezogen auf die mRNA-Expression von Elastin in der Wildtypkontrolle (Kontrolle Wildtyp: RQ = 1). Als Referenzgen diente PBGD. Pro Mausstamm wurden primäre Fibroblasten aus den Lungen von 2 Tieren gewonnen (*: $p < 0,05$).

Die Inkubation von primären Fibroblasten aus Wildtypmäusen mit Tgf β steigerte die Elastin mRNA-Expression dieser Zellen um nahezu das Achtfache der mRNA-Expression der Wildtypkontrolle (Abbildung 4.17). Bei primären Fibroblasten aus den Lungen von $Egr1^{-/-}$ Mäusen wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Elastin detektiert,

allerdings in einer weitaus geringeren Intensität. Die mRNA-Expression von Elastin in primären $Egr1^{-/-}$ Fibroblasten erreichte nach der Stimulation mit Tgf β lediglich ein Niveau, das der Expression der nicht-stimulierten Wildtypkontrolle entsprach.

4.11 Expression von Bestandteilen elastischer Fasern während des kompensatorischen Lungenwachstums in $Egr1$ -defizienten Mäusen

Nach den Erkenntnissen aus den Zellkulturversuchen (4.7, 4.9, 4.10) sollte überprüft werden, ob $Egr1$ auch *in vivo* – während des kompensatorischen Lungenwachstums – negative Effekte auf die Elastin-Expression hat. Um dies zu überprüfen, wurden $Egr1^{-/-}$ Mäuse als auch Wildtypmäuse pneumonektomiert bzw. sham-operiert. An Tag 1 post-PNX wurde die mRNA-Expression von Elastin und weiteren Bestandteilen elastischer Fasern (Fibrillin 1, Fibulin 2 und MAGP 2) analysiert.

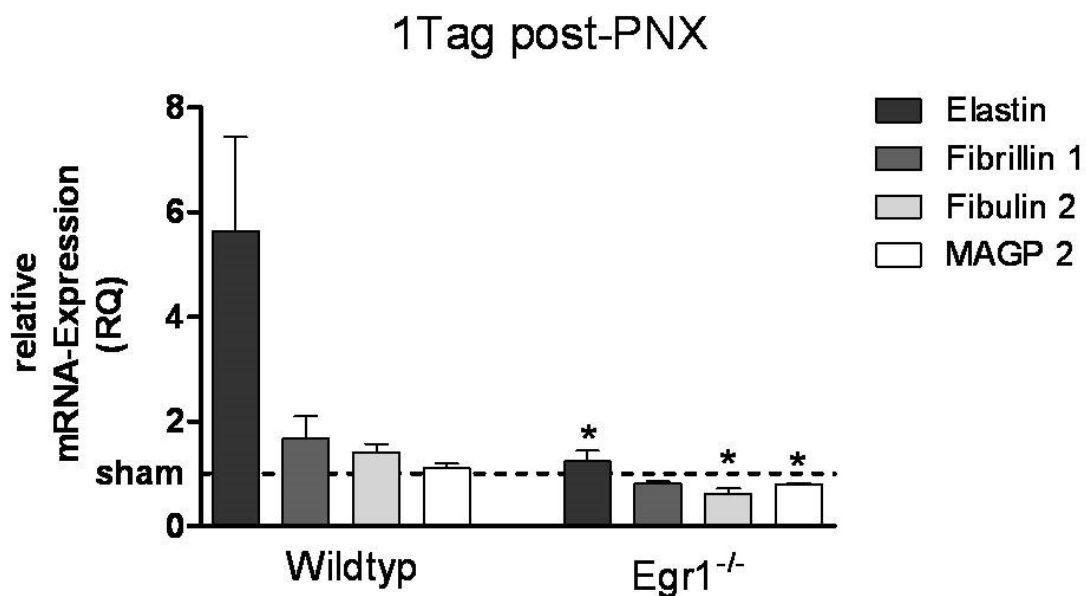


Abbildung 4.18: Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse von Bestandteilen elastischer Fasern in $Egr1^{-/-}$ und Wildtypmäusen

Adulte Mäuse $Egr1^{-/-}$ und Wildtypmäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. An Tag 1 nach dem Eingriff wurden die verbliebene bzw. rechte Lunge isoliert und die mRNA-Expression von Elastin, Fibrillin 1, Fibulin 2 und MAGP 2 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/sham) wurden 3 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. Wildtyp).

Abbildung 4.18 zeigt, dass die Elastin mRNA-Expression 1 Tag nach Pneumonektomie in Wildtypmäusen hochreguliert ist (siehe auch Abbildung 4.1 A). Gemäß den Erkenntnissen aus den Versuchen mit primären Fibroblasten (4.10) war diese Regulation in pneumonektomierten $Egr1^{-/-}$ Tieren nur in einem sehr geringen Ausmaß der Fall. Auch die mRNA-Expression der anderen analysierten Bestandteile elastischer Fasern war im Vergleich zu pneumonektomierten Wildtypmäusen geringer und unterschritt sogar das Expressionslevel von sham-operierten Tieren.

4.12 Expression von TnC und Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums in $Egr1$ -defizienten Mäusen

Vorangegangene Versuche zeigten (4.7, 4.9, 4.11), dass nicht nur die Elastin-Expression in Zellen und Tieren, die defizient für das Gen des Transkriptionsfaktors $Egr1$ sind, dereguliert zu sein scheint, sondern ebenfalls die des zuvor analysierten Gens $Timp1$ (4.3). Eine Analyse der mRNA-Expression von $Timp1$ in pneumonektomierten $Egr1^{-/-}$ Mäusen sollte klären, ob dies auch *in vivo* – während des kompensatorischen Lungenwachstums – zutrifft. Weiterhin wurde dies ebenfalls für das Kandidatengen TnC evaluiert.

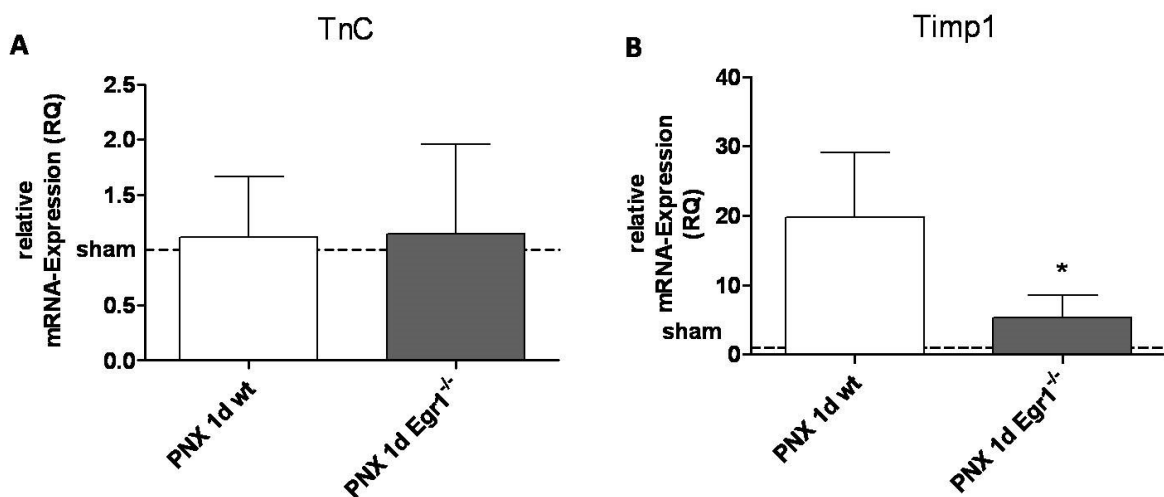


Abbildung 4.19: Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse von TnC und Timp1 in $Egr1^{-/-}$ und Wildtypmäusen

Adulte $Egr1^{-/-}$ und Wildtypmäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. An Tag 1 nach dem Eingriff wurden die verbliebene bzw. rechte Lunge isoliert und die mRNA-Expression von TnC (A) und Timp1 (B) via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/sham) wurden 3 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. Wildtyp).

Es konnten keine Unterschiede in der mRNA-Expression von TnC zwischen Wildtyp- und *Egr1*^{-/-} Mäusen einen Tag nach Pneumonektomie detektiert werden (Abbildung 4.19 A). Die mRNA-Expression von Timp1 hingegen war in *Egr1*^{-/-} Mäusen an Tag 1 post-PNX signifikant unterschiedlich verglichen mit der Expression in Wildtypmäusen einen Tag nach Pneumonektomie (Abbildung 4.19 B). Zwar war Timp1-mRNA im Vergleich zu sham-operierten Tieren in beiden Mausstämmen hochreguliert, jedoch war die mRNA-Expression in *Egr1*^{-/-} Tieren um das 3,7fache geringer im Vergleich zu der Expression in Wildtyptieren.

4.13 Einfluss einer Deletion des Gens für Egr1 auf das kompensatorische Lungenwachstum der Maus

Aus den vorangegangenen Versuchen geht hervor, dass ein Verlust des Transkriptionsfaktors *Egr1* eine Induktion der mRNA-Expression von Timp1 und Elastin nach Pneumonektomie zum Teil hemmt. Da die Expression von *Egr1* in den frühen Phasen sowie während des kompensatorischen Lungenwachstums reguliert war (4.8), wurde der Einfluss einer Deletion des Gens für *Egr1* auf den Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums näher charakterisiert (3.2.2). Hierzu wurden *Egr1*^{-/-} Mäuse pneumonektomiert und als Kontrolle sham-operiert. Die dadurch induzierten Veränderungen der Strukturparameter Lungenvolumen, alveolare Oberfläche, alveolare Septendicke sowie die Anzahl der Alveolen wurden morphometrisch mit Hilfe stereologischer Methoden erfasst und mit den entsprechenden Lungenstrukturparametern pneumonektomierter/sham-operierter Wildtypmäuse (C57BL/6J) verglichen.

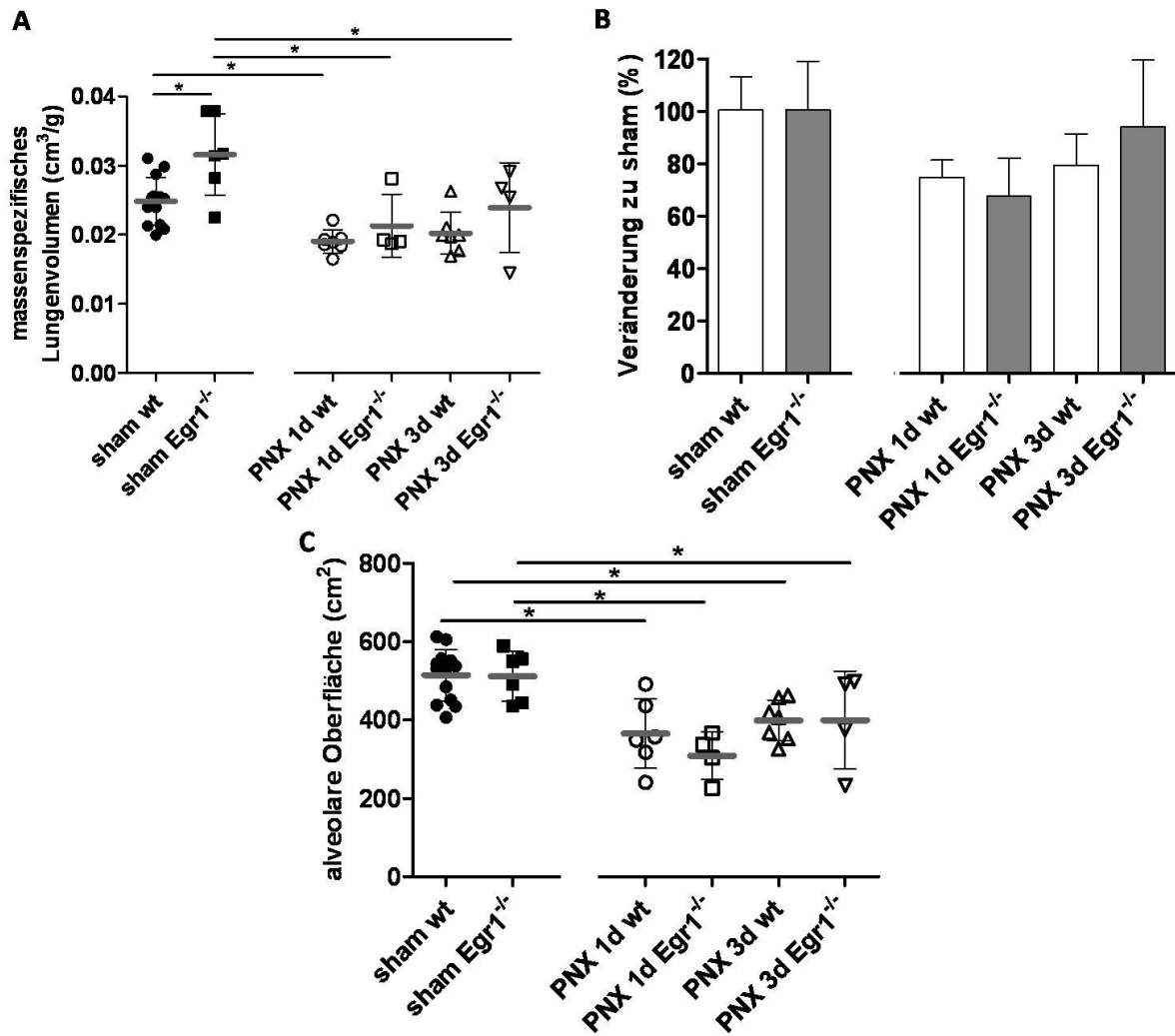


Abbildung 4.20: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten Egr1^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen

Egr1^{-/-} Mäuse und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge bzw. die gesamte Lunge isoliert und das massenspezifische Lungenvolumen (A) sowie die alveolare Oberfläche (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Lungenvolumen bzw. alveolare Oberfläche sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$). Zusätzlich ist die Veränderung des Lungenvolumens in % (B) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder Egr1^{-/-}) dargestellt. Abgebildet sind MW + SD.

Die Analyse des massenspezifischen Lungenvolumens zeigte, dass sham-operierte Egr1^{-/-} Tiere ein signifikant größeres Lungenvolumen aufwiesen als Wildtyptiere. Der pneumonektomiebedingte Verlust der linken Lunge führte bei Wildtyp- als auch Knockout-Tieren zu einem signifikanten Verlust des Lungenvolumens, welches an Tag 3 post-PNX in beiden untersuchten Stämmen zumindest tendenziell wieder anstieg (Abbildung 4.20 A). An Tag 1 nach Pneumonektomie betrug das massenspezifische Lungenvolumen bei Egr1^{-/-} Mäusen $67,8 \pm 14,5$ % im Vergleich zu dem Lungenvolumen sham-operierten Tiere dieses

Stammes, wohingegen bei Wildtypmäusen ein massenspezifisches Lungenvolumen von $75 \pm 6,6$ % bezogen auf das initiale Lungenvolumen der sham-operierten Wildtypkontrolle dieses Stammes festgestellt wurde. Das Lungenvolumen der Wildtyptiere stieg an Tag 3 nach PNX um 5 % auf $80 \pm 11,9$ % bezogen auf das Gesamtvolumen der entsprechenden sham-Gruppe und verzeichnete somit eine tendenziell geringere Zunahme des Lungenvolumens als *Egr1*^{-/-} Tiere an Tag 3 post-PNX, deren Lungenvolumen ($94 \pm 25,6$ %) wieder nahezu den sham-operierten *Egr1*^{-/-} Tieren entsprach (Abbildung 4.20 B). Die alveolare Oberfläche war bei beiden sham-operierten Kontrollgruppen gleich groß. Wie bei der Bestimmung des massenspezifischen Lungenvolumens führte die operative Entfernung der linken Lunge zu einem signifikanten Rückgang der alveolaren Oberfläche in Wildtyp- als auch *Egr1*^{-/-} Mäusen. An Tag 1 nach PNX war die alveolare Oberfläche in *Egr1*^{-/-} Mäusen tendenziell niedriger verglichen mit Wildtypmäusen, wobei diese an Tag 3 wieder in beiden Mausstämmen gleich groß war. Dies war jedoch nicht signifikant. Weiterhin wurde in Wildtyp und *Egr1* Knockout-Stamm tendenziell eine Zunahme der alveolaren Oberfläche 3 Tage post-PNX detektiert (Abbildung 4.20 C).

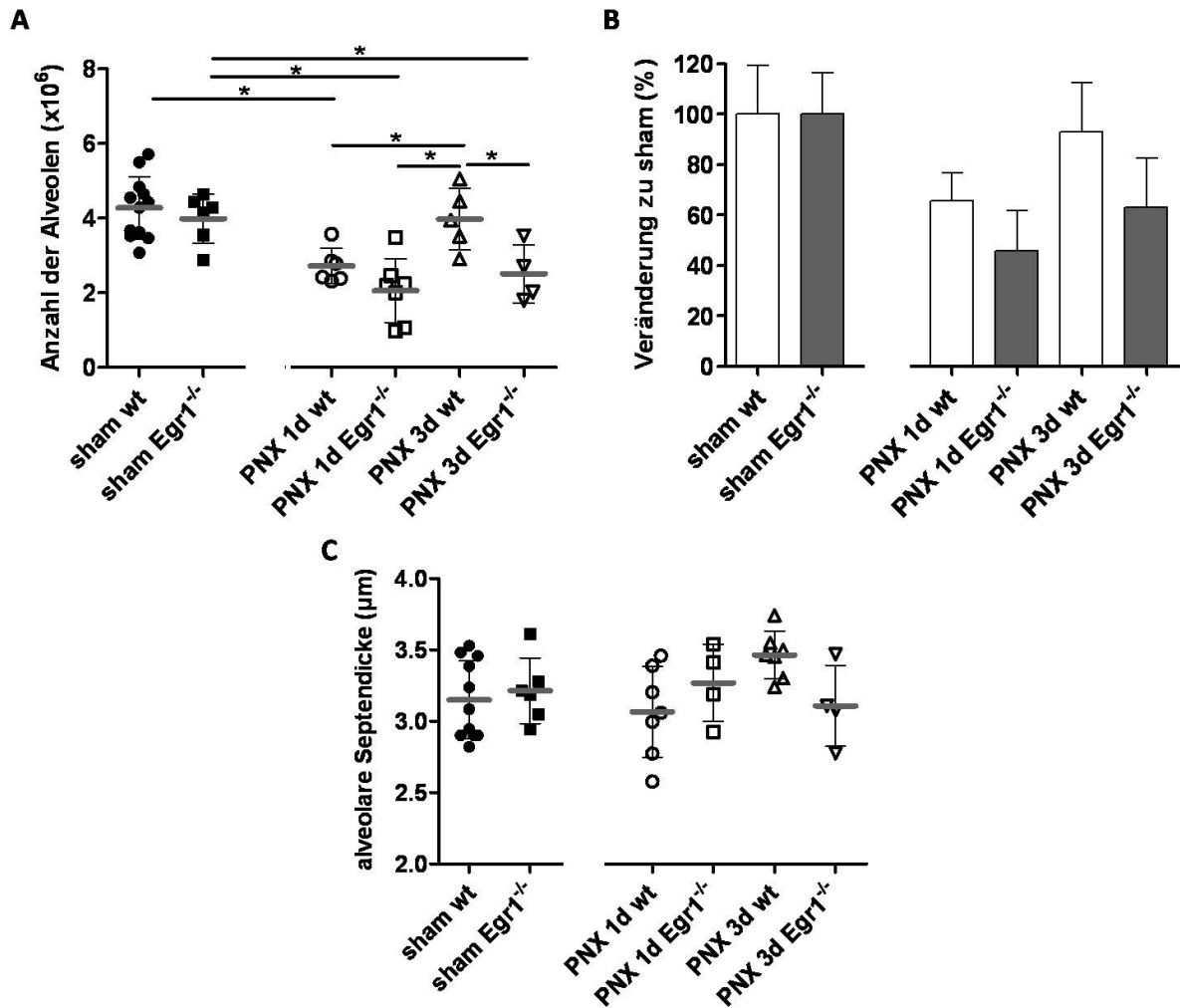


Abbildung 4.21: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/sham-operierten Egr1^{-/-} und Wildtypmäusen

Egr1^{-/-} Mäuse und Wildtypmäuse (wt) wurden im Alter von 10 Wochen pneumonektomiert (PNX) bzw. als Kontrolle sham-operiert (sham). An Tag (d) 1 und 3 nach PNX wurde die verbliebene rechte Lunge isoliert bzw. die gesamte Lunge und die Anzahl der Alveolen (A) sowie die alveolare Septendicke (C) bestimmt. Bei sham-operierten Gruppen wurde jeweils die gesamte Lunge analysiert. Abgebildet sind die individuellen Alveolarzahlen bzw. alveolare Septendicke sowie der MW einer Gruppe (graue Linie) + SD. Schwarze Balkenzeigen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$). Zusätzlich ist die Veränderung der alveolaren Anzahl in % (B) bezogen auf die jeweilige sham-operierte Gruppe (sham wt oder Egr1^{-/-}) dargestellt. Abgebildet sind MW + SD.

In Abbildung 4.21 A ist zu erkennen, dass die Anzahl der Alveolen in sham-operierten Egr1^{-/-} Mäusen sich nicht signifikant von der Anzahl der sham-operierten Wildtypmäuse unterschied. Nach PNX ging die alveolare Anzahl in Wildtyp- als auch Egr1^{-/-} Mäusen signifikant zurück, wobei diese in Wildtypmäusen an Tag 3 höher war als an Tag 1 nach PNX (Abbildung 4.21 A). Dies war ebenfalls tendenziell bei Egr1^{-/-} Mäusen zu erkennen, aber in einem geringeren Ausmaß auch in Bezug auf die prozentuale Veränderung auf deren sham-Gruppe (Abbildung 4.21 A-B). Weiterhin war die prozentuale Zunahme der Alveolenzahl nach PNX (Tag 1 und 3)

bei Wildtypmäusen größer als bei $Egr1^{-/-}$ Mäusen in Bezug auf die jeweilige Anzahl der Alveolen der entsprechenden sham-Gruppen. Bezüglich der alveolaren Septendicke konnten keine signifikanten Veränderungen detektiert werden (Abbildung 4.21 C).

5 Diskussion

Kompensatorisches Lungenwachstum ist seit über einem Jahrhundert bekannt und wurde schon in vielen verschiedenen Spezies beschrieben [56, 57, 61-75, 87]. Weiterhin konnte erstmals in einer Fallstudie gezeigt werden, dass kompensatorisches Lungenwachstum grundsätzlich auch bei erwachsenen Menschen möglich zu sein scheint [90]. Dennoch ist bis heute kaum etwas über die molekularen Mechanismen, die diesen Kompensationsprozess initiieren, regulieren und vorantreiben, bekannt.

Grundsätzlich scheint der Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums in allen bisher untersuchten Säugetierarten ähnlich zu sein. Abgesehen von wenigen Unterschieden konnte generell eine Rekonstitution von Lungenparenchym und von gasaustauschenden Oberflächen bei diesen Säugetierspezies auch im Erwachsenenalter nachgewiesen werden [86, 88, 95, 96, 267]. Dies legt den Schluss nahe, dass intrinsische und zumindest zum Teil konservierte biologische Regulationsmechanismen existieren, welche das kompensatorische Lungenwachstum steuern [58, 105, 268-272].

Von allen diesbezüglich untersuchten Tierarten nimmt die Maus eine Sonderstellung bei dem Verständnis der physiologischen und molekularen Aspekte des kompensatorischen Lungenwachstums ein. Da die Möglichkeiten zur genetischen Manipulation dieser Tierart bereits bestens etabliert und viele transgene Mausstämmen mittlerweile auch kommerziell erhältlich sind, stellt die (transgene) Maus ein effizientes, aber auf diesem Feld bisher kaum genutztes Werkzeug für die Aufklärung der Mechanismen des kompensatorischen Lungenwachstums dar [87]. So wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von spezifischen knockout Mausstämmen die Rolle der Matrix-modulierenden Proteine Timp1 und TnC sowie des Transkriptionsfaktors Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums näher beschrieben und ein erster Zusammenhang bei der Regulation von Timp1 und Elastin über Egr1 festgestellt. Für solche Analysen des induzierten postnatalen Lungenwachstums bzw. des kompensatorischen Lungenwachstums erwies sich das Pneumonektomie-Modell der Maus als ein sehr robustes Modell. Die verbliebene Lunge wird dabei nicht geschädigt und der Verlust als auch die Neubildung der Alveolen bzw. der respiratorischen Oberfläche ist dabei quantifizierbar und reproduzierbar [87].

Da die Extrazellulärmatrix und besonders die darin enthaltenen elastischen Fasern mit ihren Eigenschaften, Organisation und Verteilung bei der Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums und auch bei der Alveolarisierung bzw. Neoalveolarisierung eine zentrale Rolle einnehmen, wurde weiterhin unter Bezugnahme auf verschiedene Hypothesen eine

potentielle mit der Neoalveolarisierung einhergehende Neubildung elastischer Fasern evaluiert [58, 87, 125, 128].

Im Hinblick auf das noch unzureichende Verständnis der funktionellen molekularen Hintergründe und dem hohen therapeutischen Potenzial des kompensatorischen Lungenwachstums ist die in dieser Arbeit durchgeführte Erforschung der Grundlagen dieses Prozesses für zukünftige erfolgreiche translationale Ansätze (engl.: „*from bench to bedside*“; vom Labortisch zur Krankenbettkante“) unabdingbar. Die hier vorgelegten Daten bilden ein Fundament für weitere funktionelle Untersuchungen des kompensatorischen Lungenwachstums und gewähren einen ersten Einblick in Regulationsmechanismen, auf deren Basis pharmakologische oder auch physiologische Therapieansätze zu einer gezielten Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums etabliert werden können.

5.1 Die Expression der Bestandteile elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums und der postnatalen Alveolarisierung

Da bis heute unklar ist, ob es während des kompensatorischen Lungenwachstums zu einer Rekapitulation von Entwicklungsmechanismen kommt, lag ein Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung einer potentiellen Neubildung elastischer Fasern im Zuge der Neoalveolarisierung während des kompensatorischen Lungenwachstums. Hierzu wurde die Expression aller bisher bekannten Bestandteile elastischer Fasern und die dafür nötigen Assemblierungsfaktoren postnatal und während des kompensatorischen Lungenwachstums analysiert.

Die Bildung bzw. die Assemblierung von elastischen Fasern ist ein komplexer Prozess und ist bisher nur lückenhaft verstanden [125]. Die derzeitige Theorie über den Assemblierungsmechanismus von elastischen Fasern wurde dabei maßgeblich von Mecham *et al.* geprägt [126]. Hierbei wird die Assemblierung elastischer Fasern als ein schrittweise regulierter Prozess beschrieben (Koazervation, Quervernetzung, Deposition und Organisation), der mit der Formation eines mikrofibrillären Gerüsts beginnt. Zuvor sekretierte und koazervierte Elastin-Monomere (Tropoelastin) werden daraufhin in dieses Gerüst eingelagert und ständig durch Enzyme quervernetzt, wodurch ein unlösliches Polymer – die elastische Faser – entsteht. Für eine Assemblierung einer funktionellen elastischen Faser sind dabei eine Vielzahl von Molekülen zum Teil zwingend erforderlich (siehe Einleitung 2.4.1.1) [132]. Die Bildung elastischer Fasern beginnt auch in der Lunge in der zweiten Hälfte der Gestation und ist erst während der postnatalen Entwicklung abgeschlossen [128].

Von besonderer Wichtigkeit in dieser Arbeit war der Hintergrund, dass eine erfolgreiche Assemblierung funktioneller elastischer Fasern auf einem sehr koordinierten Genexpressionsprogramm aller dafür nötigen Bestandteile und Faktoren basiert, welches nur während der Entwicklung auftritt [125]. Ausgehend von dieser Hypothese wird angenommen, dass elastische Fasern zwar altersbedingten Modifikationen (z.B. faltige Haut, Versteifung der Gefäße) unterliegen, aber unter normalen Umständen keine Erneuerung elastischer Fasern im Erwachsenenalter möglich ist [273]. Dies erklärt auch, dass ein Organismus bei verschiedenen pathologischen Konditionen (z.B. Lungenemphysem) nicht mehr in der Lage ist, zerstörte elastische Fasern ordnungsgemäß durch funktionelle Fasern zu ersetzen [126]. Da es aber während des kompensatorischen Lungenwachstums zu einer Neubildung von Alveolen kommt und die Bildung von Alveolen bzw. der sekundären alveolaren Septen während der Lungenentwicklung durch elastische Fasern bedingt ist [38, 118, 274], sollte untersucht werden, ob es während des kompensatorischen Lungenwachstums zu einer Reaktivierung des Expressionsprogramms für die Assemblierung funktioneller elastischer Fasern kommt. Dies wäre ein Hinweis für eine Neubildung elastischer Fasern und würde zeigen, dass auch ein adultes Gewebe unter bestimmten Umständen in der Lage ist elastische Fasern zu bilden.

Der Vergleich der postnatalen mRNA-Expression mit der mRNA-Expression der Bestandteile elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums zeigte, dass wichtige Bestandteile wie Elastin oder Fibrillin 1 nicht nur postnatal, sondern auch während des kompensatorischen Lungenwachstums hochreguliert waren (Abbildung 4.1, Abbildung 4.2). Eine Microarray-Studie bestätigt diese Regulation, allerdings wurden hierbei lediglich Tag 1 und 3 postnatal sowie post-PNX analysiert [100]. Auch eine zeitpunktsunabhängige Microarray-Analyse einer anderen Arbeitsgruppe, die sich ausschließlich mit der Expression von Genen während des kompensatorischen Lungenwachstum beschäftigte, konnte eine allgemein gesteigerte Expression der Hauptkomponenten (Elastin und Fibrillin 1) elastischer Fasern nachweisen.

Verglichen mit der postnatalen Expression war im Allgemeinen die Expressionsintensität der in dieser Arbeit untersuchten Gene während des kompensatorischen Lungenwachstums geringer. Eine potentielle Erklärung hierfür wäre die geringere Anzahl an Alveolen, die während des kompensatorischen Lungenwachstums neu gebildet werden, im Vergleich zur postnatalen Alveolarisierung. Bei der rapiden Massenalveolarisierung (engl.: *bulk alveolarization*) während der postnatalen Lungenentwicklung kommt es zu einer ca. 20-fachen Vergrößerung der respiratorischen Oberfläche der gesamten Lunge. Hinzu kommt, dass die

Alveolen in der gesamten postnatalen Lunge erstmals ausgebildet werden und nicht wie beim kompensatorischen Lungenwachstum zu bereits bestehenden Strukturen hinzugefügt werden [36, 41, 275]. Während des kompensatorischen Lungenwachstums hingegen wird lediglich der pneumonektomiebedingte Verlust an respiratorischer Oberfläche (ca. 30-40 %) in der verbliebenen Lunge wiederhergestellt.

Da für die Bildung neuer alveolarer Septen die Anwesenheit von Elastin bzw. elastischer Fasern eminent wichtig ist [51], könnte hierbei eine Korrelation bestehen. Allerdings ist nicht eindeutig geklärt, ob der Prozess der Neoalveolarisierung während des kompensatorischen Lungenwachstums mit dem der postnatalen (klassischen) Alveolarisierung übereinstimmt. Wahrscheinlicher ist ein Mechanismus entsprechend der so genannten späten Alveolarisierung (engl.: *late alveolarization*), da in der adulten Lunge das kapillare Netzwerk der Septen größtenteils einschichtig ist und nicht mehr doppelschichtig, wie dies bei der Alveolarisierung während der Lungenentwicklung der Fall ist [40, 54, 55]. Dennoch sind auch für diese Art der Alveolenformierung Elastin bzw. elastische Fasern wichtig [55].

Abgesehen von der geringeren Intensität zeigte das Expressionsprofil von Elastin während des kompensatorischen Lungenwachstums ein ähnliches Muster wie das postnatale Expressionsprofil. Bei allen anderen untersuchten Komponenten hingegen wichen die Expressionsmuster während des kompensatorischen Lungenwachstums zum Teil sehr stark von dem postnatalen Muster ab. Dies deutet daraufhin, dass es im Zuge des kompensatorischen Lungenwachstums nicht zu einer Neubildung elastischer Fasern kommt.

Spekulativ könnte ein alternativer Assemblierungsmechanismus in Betracht gezogen werden, wozu es jedoch weiterführende Experimente bedürfte. Die autosomal dominante Form von Cutis Laxa könnte Hinweise über die Existenz alternativer bzw. verschiedener Assemblierungsmechanismen von elastischen Fasern geben. Bei dieser genetisch vererbten Krankheit führen Mutationen des Gens für Elastin üblicherweise zu einer schlaffen, unelastischen, faltigen und herunterhängenden Haut. Sie kann weiterhin auch schwere pulmonale Komplikationen beinhalten [276]. Die Aorta, welche einen viel höheren Elastingehalt als die Haut und Lunge hat, zeigt jedoch kaum Symptome. Neue Studien deuten daraufhin, dass zum einen verschiedene Splice-Varianten der Elastin mRNA aber auch unterschiedliche Assemblierungsmechanismen dafür verantwortlich sein könnten [277, 278]. Da in der verbliebenen rechten Lunge nach der chirurgischen Entfernung der linken Lunge im Unterschied zu der sich noch in der Entwicklung befindenden postnatalen Lunge bereits voll ausgebildete Strukturen und elastische Fasern vorliegen, ist es aber wahrscheinlicher, dass die bereits bestehenden Fasern lediglich verstärkt oder verlängert werden. Ein Hinweis darauf

ist, dass bei der Expressionsanalyse der elastischen Faserbestandteile und Assemblierungsfaktoren die Elastin mRNA-Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums allgemein am stärksten war.

Auch die signifikante erhöhte mRNA-Expression von Fibulin 4 könnte diese Vermutung unterstützen, dass Elastin-Aggregate bzw. Tropoelastin-Monomere an die bestehenden Fasern angebaut und mit ihnen vernetzt werden. In einem *in vitro* Modell zur Assemblierung elastischer Fasern konnte gezeigt werden, dass sich Elastin an bereits bestehende Mikrofibrillen anlagern kann und mit ihnen vernetzt [279]. Fibulin 4 hat zwar wenig Affinität zu Elastin, scheint aber bei der Vermittlung der Quervernetzungen von Elastin von enormer Bedeutung zu sein. Fibulin 4 Knockout-Mäuse zeigen weiterhin den schwersten Phänotyp aller Fibulin Knockout-Mäuse. Sie sterben perinatal an schweren Lungendefekten und vaskulären Anomalitäten. Die elastischen Fasern dieser Tiere beinhalten irreguläre Elastin-Aggregate, die kaum miteinander vernetzt sind [123]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einer zusätzlichen densitometrischen Bestimmung der Dichte elastischer Fasern oder einer stereologischen Analyse („*point sampled intercept*“) des Faservolumens während des kompensatorischen Lungenwachstum könnten weitere Erkenntnisse über die Art der Modulation der elastischen Fasern liefern [245, 280].

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Expressionsanalyse ist die Wahl der Zeitpunkte kritisch zu betrachten. Das Expressionsprogramm für die Assemblierung elastischer Fasern zeigte zwar postnatal die stärkste Expressionsaktivität, beginnt aber bereits während der Gestation [50, 126]. Dieser Vorlauf wurde für die Expression der elastogenen Assemblierungsmaschinerie nicht berücksichtigt. Somit könnten die Expressionsprofile, die während des kompensatorischen Lungenwachstums (Tag 1-12/ 14) gemessen wurden, dem Expressionsprofil der embryonalen Entwicklung und nicht der hier analysierten postnatalen Entwicklung entsprechen. Ein Vergleich mit detaillierten Studien, die eine embryonale Expression der Bestandteile elastischer Fasern und deren Assemblierungsfaktoren beinhalteten, konnte jedoch zeigen, dass sich das elastogene Expressionsprogramm des kompensatorischen Lungenwachstum höchstwahrscheinlich ebenfalls davon unterscheidet [127, 281].

Mittels einer kompartimentspezifischen Expressionsanalyse (über Laser-Mikrodissektion) könnte eine genauere Lokalisation der Expression festgestellt werden. Die Hauptquelle der elastogenen Maschinerie der Lunge sind Myofibroblasten, die üblicherweise an der Spitze von alveolaren Septen und innerhalb der alveolaren Wände aufzufinden sind [53]. Eine solche gezieltere Isolation von RNA dürfte zu einer genaueren Detektion der mRNA-Expression

führen, da im Vergleich zu der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse von Lungenhomogenat nur Bereiche höchster Expressionsaktivität ausgewählt werden können, was ein „Hintergrundrauschen“ nichtbeteiligter Komponenten (z.B. Bronchien, Gefäße) minimieren würde. Auf diese Art könnte ebenfalls festgestellt werden, in welchen Bereichen der verbliebenen Lunge (z.B. Subpleural oder in der Nähe von Bronchien) die Expression der elastischen Faserbestandteile und deren Assemblierungsfaktoren während des kompensatorischen Lungenwachstums vorwiegend auftritt. Dennoch dürfte auch hiermit keine Rekapitulation des postnatalen Expressionsprogramms für die Bildung elastischer Fasern festgestellt werden, sondern lediglich detailliertere Daten geliefert werden.

Da, wie bereits erwähnt, die elastischen Fasern der verbliebenen rechten Lunge nach der Pneumonektomie der linken Lunge noch intakt sind, könnte ein Versuch, bei dem zuvor die elastischen Fasern der verbliebenen Lunge geschädigt bzw. zerstört wurden (z.B. in einem Elastase-Modell der Maus oder rauchinduziertes Emphysem Modell der Maus), weitere Einblicke in die elastogene Maschinerie während des kompensatorischen Lungenwachstums liefern. Hoffmann *et al.* konnte zeigen, dass Mäuse, deren Lunge zuvor mit Elastase behandelt wurden, ein vermindertes kompensatorisches Wachstum nach Pneumonektomie aufweisen [81]. Sie folgerten daraus, dass elastische Fasern für die Weiterleitung der mechanischen Signale für die Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums wichtig zu sein scheinen. Weiterhin konnte diese Gruppe zeigen, dass haploinsuffiziente Mäuse bezüglich des Gens für Elastin ein normales kompensatorisches Lungenwachstum nach Pneumonektomie zeigen.

5.2 Matrixmetalloproteinase 9 und Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums

Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zur Rolle von Matrixmetalloproteinasen während des kompensatorischen Lungenwachstums. Gerade im Hinblick auf eine Remodulierung der elastischen Fasern und der Neoalveolarisierung wird davon ausgegangen, dass möglicherweise hauptsächlich MMP 9 und/oder MMP 12 für das kompensatorische Lungenwachstum wichtig sein könnten [87]. Dass bisher keine Veröffentlichungen zu der Rolle von MMPs während des kompensatorischen Lungenwachstum existieren, könnte mit den redundanten Funktionen der großen MMP-Familie zusammenhängen [139]. Ein weiterer Grund hierfür könnte sein, dass die bisher veröffentlichten globalen Expressionsanalysen über das kompensatorische Lungenwachstum keine signifikant veränderte Expression der MMPs feststellen konnten [100, 101]. Dies ist verwunderlich, da während der Lungenentwicklung und besonders während der Alveolarisierung verschiedene MMPs wichtig zu sein scheinen. Beispielsweise ist MMP 2 konstitutiv während der Lungenentwicklung exprimiert [282, 283].

Gerade während der Alveolarisierung werden MMPs verstärkt exprimiert, da sie hierbei anscheinend die nötigen Remodulierungen an der Extrazellulärmatrix durchführen. Nach Abschluss der Alveolarisierung geht deren Expression schlagartig zurück [139]. Hierzu gehört ebenfalls die Expression von MMP 2 und MMP 9 [284]. Beiden wird eine potentielle Rolle bei der Ausbildung der sekundären Septen während der Alveolarisierung zugeschrieben [285, 286]. Weiterhin wurde berichtet, dass eine reduzierte MMP 9 Aktivität an einem Arrest der Alveolarisierung beteiligt sein könnte [146].

Bisher wurden zumeist MMP 9 und MMP 2 mit der Entstehung und Progression verschiedener Lungenkrankheiten in Verbindung gebracht. So wurde MMP 9 mehrfach als Mediator eines rauchinduzierten Lungenemphysems beschrieben [287-289]. In Mukoviszidose Patienten – einer fibrotischen Erkrankung der Lunge – konnte eine erhöhte Konzentration von MMP 2 und MMP 9 in der bronchioalveolaren Flüssigkeit (BALF) nach einer Spülung der Lunge entdeckt werden [290]. Jedoch scheint MMP 9 bei der Reparatur und Langzeitregeneration von Lungenkrankheiten von Bedeutung zu sein, da MMP 9 Knockout-Mäuse eine unterbrochene Regeneration der Bronchiolen nach einer Bleomycin-induzierten Lungenentzündung aufweisen [291].

In dieser Arbeit wurde die Expression und Aktivität von MMP 9 und die Aktivität von MMP 2 während des kompensatorischen Lungenwachstums untersucht, um einen ersten Einblick über die potentielle Rolle dieser MMPs auch während des kompensatorischen Lungenwachstums und der damit einhergehenden Neoalveolarisierung zu erhalten. Dies erschien besonders auch in Bezug auf die nähere Charakterisierung von deren Inhibitor Timp1 sinnvoll.

Die Expressionsanalyse während des kompensatorischen Lungenwachstums zeigte keine Regulation der MMP 9 und stimmt mit den Daten der zurzeit publizierten globalen Expressionsanalysen bezüglich des kompensatorischen Lungenwachstums überein [100, 101]. Da MMP 9 verstärkt während der Alveolarisierung exprimiert wird, könnte dies entgegen einiger Spekulationen ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Neubildung von Alveolen zumindest teilweise nicht auf einer Reaktivierung von Entwicklungsprozessen beruht [106, 292]. Obwohl die mRNA-Expression von MMP 9 nach PNX nicht induziert war, wurde eine gesteigerte Aktivität von MMP 9 aber nicht MMP 2 in den Lungen von pneumonektomierten Mäusen an Tag 1 nach PNX im Vergleich zu sham-operierten Kontrollmäusen detektiert (Abbildung 4.3). Möglicherweise wurde diese gesteigerte Aktivität direkt oder indirekt durch den auftretenden mechanischen Stress auf die verbliebene Lunge nach PNX hervorgerufen, der für eine Initiation des kompensatorischen Lungenwachstums nötig ist [81]. In einer Studie

konnte gezeigt werden, dass die mit einem gesteigerten pulmonalen Blutfluss einhergehenden mechanischen Veränderungen über die Extrazellulärmatrix von quieszenten Glattmuskelzellen zu einer gesteigerten Aktivität von Metalloproteinasen (vermutlich MMP 9 oder MMP 2) führt [293]. Spekulativ könnte diese kurzzeitig gesteigerte Aktivität zu einer Remodulierung der Extrazellulärmatrix führen. Dies könnte wichtig für die darauffolgenden strukturellen Veränderungen der verbliebenen Lunge sein (evtl. Neoalveolarisierung).

Weiterhin wäre eine Freisetzung oder Prozessierung von in das EZM eingelagerten oder bereits sekretierten Wachstumsfaktoren (z.B. Tgf β) durch MMP 9 in Betracht zu ziehen [294]. Über diese Wachstumsfaktoren könnte dann eine oder mehrere Signalkaskaden ausgelöst werden, welche dann die Progression des kompensatorischen Lungenwachstums vorantreiben. Eventuell spielt auch das Gleichgewicht von MMPs zu deren endogenen Inhibitoren (Timp) beim kompensatorischen Lungenwachstum eine Rolle. Für einige Lungenkrankheiten (z.B. COPD, ARDS, Lungensarkoidose) wird eine Fehlregulation des MMP/Timp-Gleichgewichts als maßgeblich für deren Entstehung und Progression diskutiert [31, 116]. Bei Frühgeborenen, die durch mechanische Ventilation an einer bronchiopulmonalen Dysplasie leiden, die mit einem reduzierten Lungengewicht und mangelhafter Alveolarisierung einhergeht, konnte ebenfalls ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und Timp festgestellt werden [295, 296].

Um Aussagen über das MMP/Timp-Gleichgewicht treffen zu können, wurde in der vorgelegten Arbeit die mRNA-Expression von Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums analysiert (Abbildung 4.4). Während allen untersuchten Zeitpunkten war dabei die Timp1 mRNA-Expression erhöht (besonders an den Tagen 1, 6 und 8 post-PNX), woraufhin der Entschluss gefasst wurde, diesen endogenen Inhibitor bezüglich der Lunge und des kompensatorischen Lungenwachstums näher zu charakterisieren.

Die Lungenfunktionsmessungen an Timp1 Knockout-Mäusen zeigten, dass diese Tiere eine Art fibrotischen Lungenphänotyp aufweisen. Alle analysierten Parameter (erhöhte dynamische Compliance, Elastance und Tissue damping; verminderte respiratorische Kapazität) unterstützten diese Folgerung und zeigten, dass Timp1^{-/-} Mäuse einen höheren Atemaufwand aufbringen müssen als Wildtypmäuse.

Durch die Deletion des Gens für Timp1 war jedoch eine Verlagerung des MMP/Timp-Gleichgewichts auf die Seite der MMPs zu erwarten, wobei davon ausgegangen wurde, dass Timp1 Knockout-Tiere bedingt durch einen weniger gehemmten Abbau der Extrazellulärmatrix durch MMPs einen eher emphysematösen Lungenphänotyp aufweisen sollten. Da alle Timp-

Isoformen eine ähnliche Affinität für die Inhibition von MMPs aufweisen, könnte diesbezüglich der Verlust von Timp1 durch sie kompensiert werden [152]. Dennoch deuteten die stereologischen Daten von sham-operierten Timp1^{-/-} Tieren darauf hin, dass die Lungenfunktionsmessungen eher einem emphysematösen Phänotyp entsprechen würden.

Bei nahezu gleichem Lungenvolumen aber mit einer größeren alveolaren Oberfläche mit insgesamt weniger Alveolen im Vergleich zu den analysierten Wildtypmäusen kann gefolgert werden, dass Timp1^{-/-} Mäuse größere Alveolen haben, als Tiere, denen das Gen für Timp1 nicht deletiert wurde. In der Literatur konnte bezüglich der strukturellen Unterschiede zwischen Timp1^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen keine Daten gefunden werden, die dieses Ergebnis unterstützten oder widerlegen. Versuche mit dem Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bestätigen aber die in dieser Arbeit gemessene Lungenfunktion von Timp1^{-/-} Mäusen. So wurde Timp1 als ein potentieller Schlüsselfaktor für eine fibrotische Reaktion auf Bleomycin vorgestellt [297]. Eine weitere Studie unterstützt diese Folgerung [298]. Hierbei zeigten Timp1^{-/-} Mäuse in der akuten Phase nach einer fibroseauslösenden Bleomycin-Behandlung eine viel stärkere fibrotische Reaktion als Wildtypmäuse. Dies äußerte sich in einer massiv gesteigerten Neutrophileninvasion in die Lunge, Hämorrhagie und in einer gesteigerten vaskulären Permeabilität verglichen mit den gleichbehandelten Wildtypmäusen.

Weiterhin wies die Timp1^{-/-} Versuchsgruppe 30 Tage nach der Bleomycin Behandlung eine höhere Sterberate auf. Möglicherweise reagieren Timp1 Knockout-Mäuse sensibler auf induzierte strukturelle Veränderungen als Wildtypmäuse, was auf eine wichtige (protektive) Rolle von Timp1 bei Remodulierungsprozessen schließen lässt.

Neben ihrer bereits beschriebenen starken Reaktion auf eine Bleomycin-Behandlung der Lunge, neigen Mäuse, deren Gen für Timp1 deletiert wurde, zu einer verstärkten Bildung und einer kontinuierlichen Progression von Aneurysmen der Aorta im Vergleich zu Wildtypmäusen [299]. Eine Studie, die das murine Modell der Elastase-induzierten Aneurysmenformation für ihre Versuche an Timp1^{-/-} Mäusen verwendete, kam zu dem gleichen Ergebnis und folgerte für Timp1 eine protektive Rolle [300].

Eine schützende Funktion von Timp1 konnte ebenfalls in einem Asthma-Mausmodell nachgewiesen werden. So führte ein Verlust von Timp1 unter anderem zu einer gesteigerten Inflammation der Lunge sowie zu einer gesteigerten Remodulierung der Lunge [301].

Eine solche Sensibilität von Timp1 Knockout-Mäusen gegenüber Remodulierung und auch Inflammation könnte eine Erklärung für die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten stereologischen Analyse von Timp1^{-/-} Mäusen während des pneumonektomieinduzierten kompensatorischen Lungenwachstums sein. Zwar konnte kein Unterschied bezüglich des

kompensationsbedingten Anstiegs des Lungenvolumens im Vergleich zu Wildtyptieren detektiert werden, aber zumindest die Regeneration der alveolaren Oberfläche in der verbliebenen Lunge schien bei *Timp1*^{-/-} Tieren gestört zu sein. Das kompensatorische Lungenwachstum in diesen Tieren scheint gehemmt zu sein oder zumindest nicht der Geschwindigkeit von Wildtyptieren zu entsprechen (Abbildung 4.5).

An Tag 7 des kompensatorischen Wachstums betrug die gesamte alveolare Oberfläche bei *Timp1*^{-/-} Tieren nur ca. 85 % der alveolaren Oberfläche der sham-operierten *Timp1*^{-/-} Kontrollgruppe. Die alveolare Oberfläche von pneumonektomierten Wildtyptieren hingegen entsprach zu diesem Zeitpunkt wieder nahezu der Oberfläche der sham-operierten Wildtyptiere. Die im Verhältnis gesehene normale Zunahme des Lungenvolumens im Zuge des kompensatorischen Lungenwachstums bei pneumonektomierten *Timp1* Knockout-Mäusen ist somit nicht vollkommen über die verminderte Wiederherstellung der alveolaren Oberfläche zu erklären. Möglich wäre eine gleichzeitige Zunahme der Dicke der alveolaren Septen nach PNX dieser Tiere. Dies konnte allerdings nicht festgestellt werden und deutet darauf hin, dass womöglich das nicht-parenchymale Gewebe (konduktive Atemwege, Gefäße) außerordentlich an der Volumenzunahme beteiligt sein könnte.

Es wird davon ausgegangen, dass das kompensatorische Lungenwachstum ein dysanaptisches Wachstum ist, weil die konduktiven Atemwege und Blutgefäße im Vergleich zu den parenchymalen gasaustauschenden Geweben nur in einem geringeren Maße in adulten Säugetieren wachsen können [74, 87, 302]. Entweder war bei den untersuchten *Timp1*^{-/-} Mäusen das Wachstum der nicht-parenchymalen Gewebe stärker als bei Wildtyptieren oder eine mögliche Erkrankung bzw. die mit der PNX einhergehende Belastung führte zu einer Vergrößerung der konduktiven Atemwege und/oder Gefäße. Die bereits erwähnten Studien zur Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und asthmabedingten Inflammation in *Timp1*^{-/-} Mäusen konnten eine verstärkte Akkumulation von Neutrophilen und anderen inflammatorischen Zellen um die Bronchien und größeren Gefäße beobachten [298, 301], was zu einer allgemeinen Volumenzunahme dieser Strukturen führte. Die hier durchgeführten stereologischen Analysen waren auf die Veränderungen des parenchymalen Gewebes fokussiert, da während des kompensatorischen Lungenwachstums aufgrund der Neubildung von gasaustauschenden Oberflächen dort die stärksten Veränderungen stattfinden [57, 275]. Bei der Analyse der *Timp1*^{-/-}Lungen waren die Gefäße und Bronchien unauffällig und es fielen keine abnormen Veränderungen auf.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Anzahl der Alveolen unterstützt die Annahme, dass das kompensatorische Lungenwachstum nach einem Verlust von *Timp1* gestört ist. Diese Daten

sollten allerdings mit größter Vorsicht betrachtet werden. Sieben Tage nach PNX wurde für Timp1 Knockout-Tiere eine höhere Alveolenzahl festgestellt als in der sham-operierten Kontrollgruppe. Der Zugewinn von Alveolen war in pneumonektomierten Wildtyptieren und Timp1^{-/-} Tieren bis Tag 3 nach PNX nur minimal. Dies ist zumindest für die Gruppe der pneumonektomierten Wildtyptiere sehr ungewöhnlich, da zum Einen ein Zugewinn an alveolarer Oberfläche und Lungenvolumen festgestellt und zum Anderen bei den pneumonektomierten Wildtyptiergruppen (gleicher Ursprungsstamm) im Rahmen der stereologischen Analyse von Egr1 Knockout-Tieren eine signifikante Zunahme der Alveolarzahl zwischen Tag 1 und 3 nach PNX detektiert wurde. Möglicherweise führten nicht mehr nachvollziehbare Umstände (z.B. Erkrankung, Stress) zu diesen Ergebnissen, wobei die anderen analysierten Parameter nicht derart beeinflusst sind. Um die genauen Gründe für diese Ergebnisse aufklären zu können, wäre eine erneute Durchführung dieses Versuches nötig, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

Dennoch gilt ein Einfluss von Timp1 auf das kompensatorische Lungenwachstum gesichert. Die stereologische Analyse konnte diesbezüglich einen Einblick liefern und die durchgängig starke Expression des Gens für Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums unterstreicht dies ebenfalls.

Molche, denen eine Extremität abgetrennt wurde, zeigen ebenfalls eine sehr starke Expression von Timp1, während die Extremität wieder regeneriert wird. Dabei dient Timp1 der Aufrechterhaltung einer für die Regeneration optimalen MMP Aktivität [303].

Bei Feuerwehrleuten, die bei dem Einsturz des World Trade Centers in New York (11.09.2001) durch den eingeatmeten Staub Lungenschäden davontrugen, war eine erhöhte Timp1 Konzentration im Serum stets mit einer nahezu kompletten Heilung der Lungenschäden verbunden [304].

Dennoch bleibt stets zu berücksichtigen, dass es sich bei einer Pneumonektomie nicht um eine Schädigung der Lunge im klassischen Sinne handelt. Die verbliebene Lunge in der das kompensatorische Lungenwachstum auftritt, bleibt unversehrt. Die Abtrennung von Extremitäten oder die Schädigung der Lunge durch zum Beispiel Bleomycin, Elastase oder Staub geht stets mit einer zum Teil starken Inflammation einher und die Lunge muss das zerstörte gasaustauschende Gewebe regenerieren und nicht kompensieren [87].

Ob Timp1 eine Progression des kompensatorischen Lungenwachstums über eine Regulation des MMP/Timp-Gleichgewichts reguliert, kann nicht abschließend geklärt werden. Weiterführende Experimente wie eine Messung der MMP Aktivität in pneumonektomierten

Timp1^{-/-} Mäusen und eine Reverse Zymographie zur Bestimmung des Inhibitionsgrades von Timp1 auf MMP in Wildtypmäusen während des kompensatorischen Lungenwachstums könnten diese Art der Regulation bestätigen.

Da allerdings Timp1 mit solch einer starken Intensität während des kompensatorischen Lungenwachstums exprimiert wurde, scheint es wahrscheinlich, dass auch MMP-unabhängige Funktionen von Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums von Bedeutung sein könnten. Die Inhibition von MMPs durch Timp1 folgt einer 1:1 Stöchiometrie und überschüssige Timp1 Proteine könnten direkt über ihre Wachstumsfaktor-ähnlichen Funktionen beispielsweise das Zellwachstum und die Apoptose während des kompensatorischen Lungenwachstums (mit-) regulieren [152].

In dieser Arbeit konnten vorläufige Versuche zeigen, dass Timp1 in Zellen der Lunge die Zellzahl verändern kann. Dabei scheint es abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Wirkungen zu haben. So führte ein Verlust von Timp1 bei primären Fibroblasten der Lunge zu einer erhöhten Zellzahl, wohingegen eine Stimulation von Epithelzellen (SAEC) mit Timp1 (tendenziell) ebenfalls zu einer gesteigerten Zellzahl verglichen mit den jeweiligen Kontrollen führte (Abbildung 4.8). So könnte der Verlust von Timp1 in primären Fibroblasten der Lunge über einen damit einhergehenden Verlust der schon beschriebenen wachstumshemmenden Funktion von Timp1 zu einer verstärkten Proliferation führen [305]. In SAEC-Zellen könnte die erhöhte Zellzahl nach einer Stimulation mit Timp1 über die anti-apoptotischen und wachstumsfördernden Funktionen von Timp1 erklärt werden [306-309].

Studien deuten darauf hin, dass Timp-assoziierte Zellantworten sehr stark von dem zellulären Kontext und den damit durchgeführten Experimenten (Modellen/Stimuli) abhängen [152].

5.3 Tenascin C (TnC) während des kompensatorischen Lungenwachstums

Die Expression von Tenascin C kann durch verschiedenste Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, KGF, NGF), Matrixmetalloproteinasen und durch mechanischen Stress aktiviert werden [108]. Dabei ist das Extrazellulärmatrix-assoziierte TnC mit seinen regulatorischen Funktionen wichtig bei der Organogenese und bei der Wiederherstellung von Geweben nach Verletzung [157, 170].

Fast während der gesamten Lungenentwicklung wird TnC sehr stark exprimiert, wobei die stärkste Expression postnatal während der Alveolarisierung stattfindet. [158, 159, 169]. Dies wurde auch bei der postnatalen Expressionsanalyse von TnC in dieser Arbeit festgestellt. An

Tag 4 postnatal wurde dabei die stärkste Expression von TnC festgestellt (Abbildung 4.15). Genau an diesem Tag setzt in der Maus die Alveolarisierung ein [39]. Obwohl TnC ein so markantes Expressionsprofil während der Lungenentwicklung aufweist, zeigen Mäuse, deren Gen für TnC deletiert wurde, weder global noch lungenspezifisch einen ausgeprägten Phänotyp [235]. Bisher wurde nur eine leicht gestörte Verästelung des Bronchialbaumes während der Entwicklung dokumentiert. Dennoch scheint dies zu keiner Beeinträchtigung zu führen [170]. Bisher wird vermutet, dass Tenascin C eine ähnliche Funktion wie Elastin bei der Ausbildung der sekundären Septen während der Alveolarisierung besitzt [38]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Dexamethason-vermittelte Unterdrückung der Expression von TnC, aber auch von Elastin und Glattmuskelaktin (engl.: *smooth muscle actin*; SMA) negative Auswirkungen auf die erste Phase der Alveolarisierung hat [55].

In der vorliegenden Arbeit wurde an Tag 3-4 während des kompensatorischen Lungenwachstums eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von TnC detektiert (Abbildung 4.4). Dies stimmt nahezu mit einer Studie überein, welche sich mit dem Differenzierungsstatus von Fibroblasten während des kompensatorischen Lungenwachstums beschäftigte [80]. Dabei wurde an Tag 5 nach Pneumonektomie eine signifikant erhöhte TnC Expression festgestellt. An diesem Tag konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich eine tendenziell erhöhte Expression für TnC festgestellt werden. Diese Studie kam zu dem Schluss, dass der Differenzierungsstatus von Fibroblasten einen Einfluss auf das kompensatorische Lungenwachstum hat, wobei Myofibroblasten für eine ungestörte Kompensation verantwortlich sein sollen. Dieser Zelltyp wird als Hauptquelle von Tenascin C und auch Elastin angesehen [53, 101, 310, 311]. Zwar konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von TnC durch mechanische Dehnung in primären Fibroblasten der Lunge induziert werden kann, da aber erst ab Tag 3 nach PNX eine signifikant erhöhte TnC Expression detektiert wurde, scheint es wahrscheinlicher, dass die mechanischen Veränderungen zumindest nicht direkt die mRNA-Expression von TnC während des kompensatorischen Lungenwachstums induzieren (Abbildung 4.16).

Möglicherweise findet in den frühen Phasen des kompensatorischen Lungenwachstums zunächst eine vermehrte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten statt, wonach es dann zu einer erhöhten Expression von TnC kommt. Allerdings war die Expression von Elastin bereits an Tag 1 nach PNX signifikant gesteigert, was darauf hinweist, dass Myofibroblasten schon in der Lunge zugegen sind. Nach Abschluss der Alveolarisierung lokalisieren diese Zellen an der Spitze von alveolaren Wänden und verweilen dort [53, 80]. Somit scheint die gesteigerte TnC Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums nicht ausschließlich über den Differenzierungsstatus von Fibroblasten

erklärbar zu sein. Bei Gewebsschädigungen, Krebs, Inflammation und Remodulierungsprozessen konnte sehr häufig eine gesteigerte Expression von TnC detektiert werden [108, 168, 311, 312]. Hierbei soll TnC unter anderem die Migration von (Myo-)Fibroblasten fördern, was darauf hindeutet, dass TnC eventuell mitverantwortlich für ein vermehrtes Vorkommen von Myofibroblasten im Zuge des kompensatorischen Lungenwachstums sein könnte [173]. Spekulativ könnte zunächst eine vermehrte Myofibroblastendifferenzierung mit einer stetigen Steigerung der TnC-Expression einhergehen, welche dann zu einer vermehrten Migration von diesen Zellen an die Orte der strukturellen Veränderungen des kompensatorischen Lungenwachstums führt. Um dies aufklären zu können, wäre zunächst eine detailliertere Analyse der TnC Transkripte und deren bioaktiven Fragmente nötig.

In dieser Arbeit wurde ein Primerpaar gewählt, das alle bisher dokumentierten Splice-Varianten von TnC detektiert. Ob und welche Varianten während des kompensatorischen Lungenwachstums exprimiert werden, wurde noch nicht untersucht. Weiterhin ist nicht bekannt, ob auch eine proteolytische Regulation der TnC Funktion während des kompensatorischen Lungenwachstums stattfindet. Dieses Wissen wäre für weiterführende Studien nötig, da verschiedene Splice-Varianten und Fragmente von TnC zum Teil unterschiedliche oder gar gegenteilige Funktionen ausüben [108, 173].

In Abhängigkeit hiervon sollten auch die anti-adhäsiven Funktionen von TnC im Kontext des kompensatorischen Lungenwachstums und den damit einhergehenden mechanischen Belastungen des Lungengewebes in Betracht gezogen werden. Zwar kann davon ausgegangen werden, dass die TnC Expression nicht direkt über mechanische Kräfte während der initialen Phasen des kompensatorischen Lungenwachstums induziert wird. Doch könnten kompensationsbedingte strukturelle Veränderungen (Neoalveolarisierung, Vergrößerung der alveolaren Oberfläche) die alveolären Zellen (bei TnC vornehmlich Fibroblasten) zunehmend unter mechanische Spannung setzen. Diese Spannung führt ab einem gewissen Zeitpunkt zu einer gesteigerten Expression von TnC. Um eine Überdehnung der alveolären Zellen zu verhindern, vermittelt TnC eine Lockerung der EZM-Zellkontakte [180, 313]. Dies würde auch die erneute gesteigerte Expression von TnC an Tag 10 nach PNX erklären.

Dabei könnte TnC an Tag 3 und 4 nach PNX eine modulierungsbedingte stark erhöhte Dehnung der Zellen erstmals durch Lockerung der EZM-Zellkontakte verringern. Als Folge von dem abnehmenden mechanischen Stress geht die TnC Expression wieder zurück. Da allerdings das kompensatorische Lungenwachstum noch nicht abgeschlossen ist, führen weitere strukturelle Veränderungen erneut zu einer ansteigenden Dehnung der alveolären

Zellen der verbliebenen Lunge. An Tag 10 nach PNX ist diese Dehnung der Zellen erneut kritisch und führt zu einer erneuten Expression von TnC mit dessen anti-adhäsiven Funktionen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass TnC zwar durch mechanische Kräfte aktiviert werden kann, aber dies nicht – wie zunächst vermutet – über Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums stattfindet, sondern durch einen anderen Mechanismus (Abbildung 4.16). So war die durch mechanische Stimulation gesteigerte Expression von TnC in Egr1^{-/-} Fibroblasten sogar stärker als in Wildtypfibroblasten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass hämodynamische Scherkräfte MMPs aktivieren können, was dann über deren Matrixmodulationen zu einer Expression von Egr1 führt. Die Bindung von Egr1 an den TnC Promoter bewirkt daraufhin eine verstärkte Expression und Sekretion von TnC [293]. Nach PNX war die Expression von TnC in Egr1^{-/-} Mäusen nicht verschieden zu der Expression in Wildtyptieren, was auf eine Aktivierung der TnC Expression über andere Faktoren hindeutet (Abbildung 4.19).

Eine Deletion des Gens für TnC sollte – diesen Hypothesen nach – den Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums negativ beeinflussen. Aus diesem Grund wurden mittels Design-basierter Stereologie die strukturellen Parameter (Volumen, alveolare Oberfläche, Anzahl der Alveolen, alveolare Septendicke) während des kompensatorischen Lungenwachstums bei TnC^{-/-} Mäusen analysiert und mit denen von Wildtypmäusen verglichen (Abbildung 4.9, Abbildung 4.10).

Dabei stellte sich der Zuchthintergrund der analysierten TnC^{-/-}- und Wildtypiere als ungünstig für die durchgeführten Versuche heraus. Bei der Generierung des in dieser Arbeit verwendeten TnC Knockout-Stammes wurde der Mausstamm 129/Sv gewählt [235]. Dieser Inzuchtstamm mit der Fellfarbe Chinchilla/Agouti wurde 1928 entwickelt und ist ein Unterstamm des 129 Mausstammes [314]. Neben dem C57BL/6-Mausstamm wurde dieser Stamm gerne für die Herstellung von transgenen/knockout Stämmen und weiterhin für die Krebsforschung verwendet [315, 316]. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass verschiedene Mausstämme eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Mauskrankheitsmodellen aufweisen [317-319]. Das Zigarettenrauchexpositionsmodell der Maus beispielsweise wird in der COPD- und akuten Lungeninflammationsforschung standardmäßig verwendet. Es stellte sich heraus, dass der Grad der Inflammation und der pulmonalen Hypertonie sich zum Teil sehr stark unterscheidet bei verschiedenen Inzuchtstämmen der Maus [317, 320].

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass der Inzuchtstamm von Mäusen ebenfalls einen Einfluss auf das kompensatorische Lungenwachstum hat. Die Analysen der strukturellen Lungenparameter während des kompensatorischen Lungenwachstums an TnC^{-/-}- und Wildtypmäusen mit dem Zuchthintergrund 129/Sv zeigten, dass in den ersten drei Tagen nach PNX nahezu kein oder nur ein tendenziell sehr geringer Zugewinn an Lungenvolumen, alveolarer Oberfläche und Anzahl der Alveolen sowohl in der Wildtyp- als auch Knockout-Gruppe zu erkennen war.

Die meisten, wenn nicht alle, durchgeführten Studien über das kompensatorische Lungenwachstum bei Mäusen, nutzten Tiere des C57BL/6 Inzuchtstammes [71, 80, 84, 87]. Dabei konnten alle deskriptiven Studien an Wildtypmäusen einen Anstieg der untersuchten strukturellen Parameter der Lunge nach Pneumonektomie feststellen. Auch die Erkenntnis, dass eine Neoalveolarisierung während des kompensatorischen Lungenwachstums stattfindet, wurde durch Versuche mit C57BL/6-Mäusen erlangt [57]. Bei allen anderen durchgeführten strukturellen Analysen dieser Arbeit wurden ebenfalls Mäuse mit einem C57BL/6J-Hintergrund verwendet und die pneumonektomierten Kontrollgruppen zeigten eine positive Veränderung der strukturellen Parameter gemäß der Literatur. Bisher liegen keine Veröffentlichungen vor, die sich mit dem kompensatorischen Lungenwachstum in verschiedenen Inzuchtstämmen der Maus befassen.

In 129/Sv Mäusen scheint das kompensatorische Lungenwachstum (unabhängig von TnC) entweder inhibiert oder verlangsamt zu sein verglichen mit dem in C57BL/6-Mäusen. Der 129/Sv Mausstamm ist genetisch näher verwandt zu Balb/c- und A/J-Mausstämmen und entfernter verwandt zu C57BL/6-Mäusen [320]. Eine Studie mit primären Lungenfibroblasten aus Mäusen mit dem Zuchthintergrund C57BL/6 und 129/Sv zeigte, dass Fibroblasten des 129/Sv Stammes schlechter auf eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren reagieren als Fibroblasten des C57BL/6-Stammes [321]. Unter anderem kam dabei der Wachstumsfaktor PDGF α zum Einsatz, welcher für die Differenzierung von Fibroblasten eine große Rolle spielt [53]. Weiterhin führt eine Deletion des Gens für PDGF α zu einer sehr stark gestörten Alveolarisierung während der Entwicklung [52].

Da Chen *et al.*, wie bereits erwähnt, zeigen konnten, dass der Differenzierungsstatus von Fibroblasten wichtig für den Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums ist, könnte dies eine Erklärung für das schlechte bzw. das vermeintliche Ausbleiben des kompensatorischen Lungenwachstums in diesen Mäusen sein [80]. Der Wachstumsfaktor und der Signaltransduktionsweg um EGF spielen ebenfalls eine Rolle während der Alveolarisierung und auch während des kompensatorischen Lungenwachstums [269, 322].

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Administration von EGF bei Ratten das kompensatorische Lungenwachstum steigert [323], wohingegen bei EGF^{-/-} Mäusen unter anderem die Alveolarisierung gestört ist [324]. Im Zuge der Charakterisierung der EGF^{-/-} Mäuse war aufgefallen, dass die Deletion des Gens für EGF in verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche Effekte auf den Phänotyp hatte [325]. Der Zuchthintergrund dieser Knockout-Tiere war 129/Sv, wo eine Deletion von EGF zu einer embryonalen Letalität führte. Knockout-Tiere hingegen, deren Hintergrund gemischt war (129/Sv x C57BL/6 oder 129/Sv x C57BL/6x MF1) überlebten maximal bis postnatal Tag 20. Eine Veränderung des EGF-Signaltransduktionsweges in dem 129/Sv-Mausstamm im Vergleich zu dem C57BL/6-Inzuchtstamm könnte eine weitere Erklärung für das veränderte kompensatorische Lungenwachstum dieses Stammes sein.

Dennoch reichen die hier erhobenen Daten nicht aus, um dies abschließend zu klären. Spätere Analysezeitpunkte könnten klären, ob das kompensatorische Lungenwachstum bei diesen Mäusen nicht stattfindet oder nur verlangsamt ist. Daraufhin könnten zum Beispiel Differenzierungsstudien von Fibroblasten und Experimente mit dem Wachstumsfaktor EGF während des kompensatorischen Lungenwachstums die Ursachen dieser stammesspezifischen Unterschiede klarstellen.

Die stereologische Analyse der sham-operierten Wildtypiere und TnC Knockout-Kontrolliere konnte zeigen, dass TnC^{-/-} Mäuse nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im Allgemeinen einen anderen Lungenphänotyp besitzen [170, 235]. Im Vergleich hatten diese Tiere allgemein größere Lungen (Volumen, alveolare Oberfläche, Anzahl der Alveolen) aber dünnere alveolare Septen als Wildtypiere. Roth-Kleiner *et al.* stellte bereits fest, dass TnC^{-/-} Mäuse an Tag 2 postnatal vergrößerte Atemwege haben und tendenziell ein größeres Lungenvolumen aufweisen [170].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lungenfunktionsmessung an 10 Wochen alten Mäusen zeigte, dass die strukturellen Unterschiede zwischen TnC^{-/-}- und Wildtypieren sich auch in der Lungenfunktion niederschlagen (Abbildung 4.11). Dabei zeigen die Werte eine Verschiebung in Richtung von emphysematösen Lungen, was allerdings nicht bedeutet, dass TnC^{-/-} Tiere spontan ein Lungenemphysem ausbilden. Wahrscheinlich beruht die veränderte Lungenfunktion auf dem Fakt, dass TnC Knockout-Mäuse eine größere Lunge besitzen als Wildtypiere. Dies unterstreicht den Einfluss von TnC auf die Entwicklung der Lunge [169]. Da die Septen dieser Tiere trotz größerer Lungen dünner waren als bei Wildtypieren, könnten weiterführende Experimente prüfen, ob die elastischen Fasern dieser Tiere und/oder der Differenzierungsstatus der Fibroblasten verändert ist [55, 173].

Der Einfluss einer Deletion von TnC auf das kompensatorische Lungenwachstum konnte aufgrund des bereits erwähnten mausstammbedingten Einflusses auf das kompensatorische Lungenwachstum nicht näher erörtert werden. Sinnvoll wäre ein Rückkreuzung des TnC Knockouts auf einen C57BL/6J-Zuchthintergrund, da dies die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zum kompensatorischen Lungenwachstum verbessern würde und der Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums in diesem Mausstamm bereits gut dokumentiert ist [56, 57]. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

5.4 Early Growth Response 1 (Egr1) während des kompensatorischen Lungenwachstums

DeLigio *et al.* bezeichnete Egr1 als ein Gen, das mindestens genauso viele Namen besitzt wie biologische Funktionen [326]. Dies spiegelt sich auch in der Entdeckung von Egr1 wider. Mehrere Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen wissenschaftlichen Schwerpunkten entdeckten den Transkriptionsfaktor unabhängig voneinander, was zu seinen unterschiedlichen Bezeichnungen führte [193-197].

Als „immediate early response“-Gen (unmittelbare frühe Antwort) kann Egr1 durch viele verschiedene Stimuli induziert werden und eine Vielzahl von Signalkaskaden auslösen, welche zu unterschiedlichsten Zellantworten (Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese) führen [327]. Allerdings ist fast 30 Jahre nach seiner Entdeckung weder bekannt, welche distinkte Signalwege Egr1 allgemein aktivieren, noch konnten die regulatorischen Mechanismen der spezifischen Effekte von Egr1 lückenlos aufgeklärt werden [225]. Viele *in vitro*-Studien, die einen regulatorischen Mechanismus von Egr1 entdeckten, ließen sich nicht *in vivo* bestätigen [326].

Ein Hindernis bei der Aufklärung der exakten Mechanismen um Egr1 ist dessen Spezifität. Es stellte sich heraus, dass dessen Aktivierung und Effekte stark von dem Stimulus, Gewebe, Zelltyp bzw. Zelllinie und dem verwendeten Tiermodell abhängen [217, 328]. So wurde Egr1 und dessen Expression schon mehrfach mit verschiedensten Erkrankungen, wie COPD, ALI (akute Lungenverletzung), Fibrose, Krebs, Diabetes und Arteriosklerose, in Verbindung gebracht [208, 213, 222, 224-226, 329-331]. Doch auch bei regenerativen Prozessen scheint Egr1 eine Rolle zu spielen. Bei der Regeneration der Leber nach Hepatektomie konnte eine erhöhte Expression von Egr1 festgestellt werden [332, 333].

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen dies und zeigen, dass Egr1 auch während des kompensatorischen Lungenwachstums eine Rolle spielt, da unter anderem dessen Expression schon unmittelbar zu Beginn und während des kompensatorischen Lungenwachstums hochreguliert war (Abbildung 4.13). Dabei stimmen die hier durchgeführten Expressionsanalysen bezüglich Egr1 mit einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2001 überein [102]. Die Studie untersuchte die Expression von Transkriptionsfaktoren in frühen Phasen (2 Stunden nach PNX) des kompensatorischen Lungenwachstums. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Egr1 bereits eine Stunde nach PNX im Vergleich zu sham-operierten Mäusen signifikant hochreguliert war. Der anschließende Verlauf der mRNA-Expression von Egr1 ist im Einklang mit den Ergebnissen von Landesberg *et al.*. Im Gegensatz hierzu sah eine Microarray-Studie über das kompensatorische Lungenwachstum Egr1 einen Tag nach PNX signifikant hochreguliert [100]. Dies steht im Widerspruch zu den Analysen dieser Arbeit und von Landesberg *et al.*.

Nach einer Hepatektomie der Leber gehört Egr1 ebenfalls zu den ersten induzierten Genen überhaupt [334]. Es wird davon ausgegangen, dass dabei die TNF α -IL-6-STAT-3-Zytokin-Signalkaskade, gefolgt von einer koordinierten Generierung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Prostaglandinen zu einer Aktivierung der stress- und mitogenaktivierten Proteinkinasekaskade (MAPK) unter gleichzeitiger Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (NFKB, AP-1, STAT 3, cAMP-response-element-binding protein) zu einer erhöhten Egr1 Expression nach Hepatektomie führen [221, 335-338].

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass hepatektomiebedingte hämodynamische Änderungen - folglich eine Änderung der mechanischen Belastung – mit einer gesteigerten Expression von Egr1 assoziiert sind [333]. Eine ebensolche Aktivierung der Egr1 Expression über die erwähnte Zytokin-ROS-Mitogen-Achse könnte auch während des kompensatorischen Lungenwachstums eine Rolle spielen. In der Studie von Landesberg *et al.* war ebenfalls NFKB zwei Stunden nach PNX induziert und eine weitere globale Expressionsanalyse des kompensatorischen Lungenwachstums sah einige der erwähnten Faktoren (MAPK, c-fos, jun) dieser Achse in ihrer Expression erhöht [101, 102].

Da mechanischer Stress als einer der Hauptstimulatoren des pneumonektomiebedingten kompensatorischen Lungenwachstums gesehen wird, könnte die frühe Expression von Egr1 während dieses Prozesses direkt oder indirekt durch Mechanotransduktion verursacht worden sein [60]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Egr1 Expression in primären Fibroblasten der Lunge durch mechanischen Stress erhöht wurde (Abbildung 4.16). Andere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass Egr1 auch in anderen Zelltypen über mechanische

Kräfte reguliert werden kann [227, 263, 265, 339]. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass diese Art der erhöhten Egr1 Expression ähnliche Hintergründe hat, wie dessen Expression nach Hepatektomie.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zytokinexpression und Aktivierung (darunter TNF α und IL 6) auch in der Lunge durch mechanische Kräfte möglich ist [340-342]. Allerdings ist anzufügen, dass diese Studien sich alle mit der Erforschung der akuten Lungenverletzung bzw. mit den Konsequenzen eines Barotraumas beschäftigten [343]. Es ist unwahrscheinlich, dass die dort induzierten starken mechanischen Kräfte vergleichbar mit denen während des kompensatorischen Lungenwachstums sind. Weiterhin wurde beschrieben, dass die NF κ B Aktivität durch mechanische Dehnung in Skelettmuskeln induzierbar ist [344].

Egr1 trägt in seinem proximalen Promoter fünf „Serum Response Elements“ (Serum-reagierende Elemente; SRE) in deren Nähe sich fünf Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie befinden [345]. Nach einer Deletion der SRE im Promoter von Egr1, konnte die Transkription nicht mehr durch mechanische Scherkräfte aktiviert werden [346]. Der Transkriptionsfaktor SRF (engl.: Serum Response Factor) bindet vorzüglich an SRE und seine Aktivierung über mechanische Kräfte konnte ebenfalls schon bestätigt werden [347].

Eine solche mechanisch initiierte Aktivierung der Transkription von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums würde, wie bei der Initiation der Leberregeneration nach Hepatektomie, eine Beteiligung des klassischen MAPK Signalwegs (auch bekannt als: ERK 1/2; engl.: *Extracellular signal-Related Kinase*) beinhalten. Einige Komponenten dieses Signalweges waren in einer der bereits erwähnten globalen Expressionsanalysen während des kompensatorischen Lungenwachstums ebenfalls reguliert [100].

Möglicherweise erfolgt die Steigerung der Egr1 mRNA-Expression auch durch eine Mechanotransduktion über Proteinkinase C (PKC)- und Kalzium-abhängige Mechanismen. Die Expression von Egr1 konnte in einer Studie nach einer Inhibition von PKC und einer Depletion von Kalzium nicht mehr durch mechanische Dehnung induziert werden [263]. Intrazelluläre Kalzium-abhängige Mechanismen sind ein fester Bestandteil der Forschung über Mechanotransduktion und Egr1^{-/-} Mäuse zeigen eine gestörte Kalzium Regulation [180, 348].

Desweiteren wurden schon PKC-Isoformen bei der Aktivierung der Expression von Egr1 beschrieben [349, 350]. Da allerdings die Aktivierung der Transkription des Gens für Egr1, wie bereits erwähnt, stark von der Art des Stimulus, Zelltyp und dem verwendeten Modell

abhängen, sind weiterführende Experimente nötig, um die Beteiligung dieser potentiellen (mechanisch gesteuerten) Signalwege an der (initialen) Expression von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums zu bestätigen [328].

Auch wenn der genaue Stimulus für die Aktivierung der Egr1 Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums noch hypothetisch ist, so konnten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit pneumonektomierten Egr1^{-/-} Mäusen eindeutig zeigen, dass Egr1 für ein geregeltes kompensatorisches Lungenwachstum wichtig ist. Eine Deletion des Gens für Egr1 äußerte sich in einer verzögerten Wiederherstellung der alveolaren Oberfläche und Anzahl der Alveolen während des kompensatorischen Lungenwachstums im Vergleich zu Wildtypmäuern (Abbildung 4.20, Abbildung 4.21).

Erneut bestehen hier Parallelen mit der hepatektomieinduzierten Leberregeneration. Diese Versuche stellten eine Verzögerung der Leberregeneration bei hepatektomierten Egr1^{-/-} Mäusen fest [221]. Die Autoren dieser Arbeit führten dies auf eine, durch den Verlust von Egr1 bedingte, gestörte hepatozelluläre mitotische Progression zurück. Sie folgerten, dass Egr1 in Hepatozyten ein wichtiger Regulator für den Übergang von der Metaphase zur Anaphase während der Mitose (G₁ zu S Progression) ist und die Assemblierung des Spindelapparates fördert. Bei einer anschließenden Microarray-Analyse konnte diese Gruppe eine reduzierte Expression eines Schlüsseligens für den Zellzyklus (Cdc20; engl. *Cell division cycle 20 homolog*) in hepatektomierten Egr1^{-/-} Mäusen nachweisen. Die von Paxson *et al.* durchgeführte globale Expressionsanalyse während des kompensatorischen Lungenwachstums bei Wildtypmäusen detektierte ebenfalls eine Hochregulation von Cdc20 und anderen Faktoren des Zellzyklus (z.B. Cycline) [101].

Telomerase-defiziente Mäuse zeigen nach PNX ein eingeschränktes kompensatorisches Lungenwachstum im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dies war ebenfalls verbunden mit einem Ausbleiben der gesteigerten Egr1 Expression, wobei auch keine Phosphorylierung des ERK 1/2 detektiert werden konnte [107]. Dies könnten Hinweise darauf sein, dass Egr1 auch während des kompensatorischen Lungenwachstums ein Regulator der mitotischen Progression ist. An Tag 3 und 4 nach PNX war die Expression von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums signifikant erhöht. Zu diesem Zeitpunkt steigt ebenfalls die Proliferationsrate während des kompensatorischen Lungenwachstums an und gipfelt zwischen Tag 6 und 8 post-PNX [237]. An Tag 7 nach PNX war die mRNA-Expression von Egr1 erneut signifikant erhöht. Somit korreliert die Expression von Egr1 mit der gemessenen Proliferationsrate während des kompensatorischen Lungenwachstums.

Eine Stunde nach PNX wurde jedoch die stärkste mRNA-Expression von Egr1 detektiert, wobei eine erste leicht erhöhte Proliferationsrate erst zwei Tage nach PNX detektiert werden konnte [78, 237]. Eventuell erfüllt Egr1 mehrere Funktionen während des kompensatorischen Lungenwachstums.

Weiterführende Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums einen Einfluss auf die Expression von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (z.B. Elastin) und deren Modulatoren (Timp1) hat (Abbildung 4.18, Abbildung 4.19). Ein Tag nach PNX war die mRNA-Expression von Elastin und einiger ausgewählter Bestandteile elastischer Fasern sowie die mRNA-Expression von Timp1 bei Egr1^{-/-} Mäusen zum Teil stark vermindert im Vergleich zu deren mRNA-Expression in pneumonektomierten Wildtypmäusen. Dabei könnte die mRNA-Expression von Timp1 direkt über Egr1 aktiviert werden. Eine Studie mit humanen synovialen Fibroblasten zeigte, dass der Promoter von Timp1 zwei potentielle Bindestellen für Egr1 aufweist, worüber dessen Expression induziert werden kann [351].

Die mechanische Stimulation von primären Lungenfibroblasten aus Wildtypmäusen zeigte, dass die Expression von Timp1 nicht durch mechanische Signale reguliert wurde. In primären Lungenfibroblasten aus Egr1^{-/-} Mäusen hingegen war die Expression von Timp1 erniedrigt (Abbildung 4.16). Da die mechanische Stimulation von Wildtypfibroblasten die Expression von Egr1 steigerte, könnte es über Egr1 zu einer Stabilisierung der Expression von Timp1 in diesen Zellen geführt haben, was bedingt durch die Deletion des Gens für Egr1 in Egr1^{-/-} Fibroblasten nicht mehr möglich war.

Weiterhin konnte mit den mechanischen Stimulationsversuchen bestätigt werden, dass Egr1 direkt oder indirekt einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Elastin hatte. So führte die mechanische Stimulation von Wildtypzellen neben einer signifikant gesteigerten Egr1 Expression ebenfalls zu einer signifikant gesteigerten Expression von Elastin. Eine mechanische Stimulation von Egr1^{-/-} Fibroblasten führte hingegen zu einer verminderten Expression von Elastin.

Zwar scheint die Expression von Elastin auch durch Mechanotransduktion induzierbar, aber dies erfolgt wohl indirekt über andere Faktoren wie beispielsweise Tgf β oder latentes Tgf β , welches in die EZM eingelagert ist [352-356]. Möglicherweise beinhaltet die Kaskade zur Aktivierung der Expression von Elastin über Egr1 ebenfalls Tgf β . Der Wachstumsfaktor ist ein potenter Stimulator der Elastin Transkription [266]. Dennoch zeigte eine Stimulation von

primären Egr1^{-/-} Fibroblasten mit Tgfβ nahezu keinen Effekt auf die Expression von Elastin verglichen mit der Stimulation von primären Wildtypfibroblasten (Abbildung 4.17).

Weiterhin weist der Promoter des Gens für Elastin keine Egr1 Bindestelle auf, was einen direkten Einfluss von Egr1 auf dessen Transkription unwahrscheinlich macht [357]. Ein Tgfβ-Kontrollelement innerhalb des Elastin-Promoters hingegen, wurde schon in den 1990er Jahren identifiziert und ausgiebig untersucht [358]. Dennoch könnte eine direkte Bindung von Egr1 am Promoter des Gens für Elastin, verbunden mit einer Aktivierung der Expression, stattfinden. Innerhalb des Elastin-Promoters konnten verschiedene Sp-1 Bindestellen detektiert werden, deren Sequenz der Egr1 Bindesequenz sehr ähnlich ist [359]. Dabei kann es zu einer sogenannten „Egr1 Ersetzung von Sp-1“ (engl.: *Egr1 displacement of Sp-1*) kommen, was meist zu einer Aktivierung des betreffenden Gens führt [210, 360, 361]. Zwar konnte gezeigt werden, dass Egr1 die Expression von Kollagen stimulieren kann, aber es konnte keine Literatur bezüglich der Regulation von Elastin durch Egr1 gefunden werden [362].

Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass Egr1^{-/-} Mäuse durch eine verminderte Expression von Kollagen (Col1a1, Col1a2) die mechanische Belastbarkeit der Sehnen stark beeinträchtigt und Egr1 für die Bildung intakter Sehnen nötig ist. Dies soll teilweise über Tgfβ2 erfolgen [363]. Ein Zusammenhang zwischen Tgfβ und Egr1 konnte auch bei der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose festgestellt werden. Dabei wurde Egr1 als ein potentieller Mediator der fibrotischen Effekte von Tgfβ identifiziert [364]. Weiterführende Experimente zur genauen Identifikation der Egr1-vermittelten Aktivierung der Elastin und Timp1 Expression waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Diese erstmalig festgestellte Regulation von Elastin und Timp1 über Egr1 könnte eine Erklärung für die sehr frühe Expression von Egr1 zu Beginn des kompensatorischen Lungenwachstums sein.

Spekulativ könnte Egr1 unter Berücksichtigung der anderen in dieser Arbeit analysierten Kandidatengene folgende Rolle während des kompensatorischen Lungenwachstums einnehmen:

Die unmittelbar nach PNX auftretenden mechanischen Veränderungen führen über Mechanotransduktion (z.B. via MAPK-SRF-, Kalzium-abhängige- oder NFκB Signalwege) zu einer gesteigerten Expression von Egr1. Diese erste erhöhte Expression führt im Anschluss direkt oder indirekt (z.B. über Tgfβ Signalwege) zu einer Aktivierung der Expression von Timp1, Elastin und anderen Komponenten elastischer Fasern, womit erste strukturelle

Veränderungen beginnen. Dies schließt eine an Tag 1 nach PNX gesteigerte Aktivität von MMP 9 mit ein. MMP 9 degradiert die EZM oder elastische Fasern, wird aber relativ schnell durch die im weiteren Verlauf konstant gesteigerte Expression von Timp1 wieder inhibiert.

Möglicherweise besteht der Hauptzweck der initialen hohen MMP 9 Aktivität allerdings in einer Liberation von Wachstumsfaktoren und anderen bioaktiven Faktoren (evtl. auch TnC) aus dem EZM bzw. in deren proteolytischen Aktivierung (Timp1^{-/-} Mäuse wiesen eine beeinträchtigte Wiederherstellung der alveolaren Oberfläche auf und nicht eine stärkere bzw. schnellere Vergrößerung der alveolaren Oberfläche). Diese freigesetzten und/oder aktivierten Faktoren könnten dann weiter über andere wichtige Signalwege zur Progression des kompensatorischen Lungenwachstums beitragen.

Möglicherweise spielen die Wachstumsfaktor-ähnlichen Funktionen von Timp1 hierbei ebenfalls eine Rolle, wodurch es beispielsweise zu einer Inhibition der Proliferation bei Fibroblasten und/oder zu einer Inhibition der Apoptose bei Epithelzellen kommen könnte [152].

Da die gesteigerte Expression von Elastin und Timp1 in den Egr1^{-/-} Experimenten niemals komplett inhibiert, sondern nur reduziert war, ist es sehr wahrscheinlich, dass mehrere Faktoren und Signalwege gemeinsam und zum Teil unabhängig voneinander das kompensatorische Lungenwachstum regulieren. Ein Verlust eines Faktors führt deshalb nur zu einer Verlangsamung des Kompensationsprozesses. Bei pneumonektomierten Egr1^{-/-} Tieren wurde zunächst eine verzögerte Kompensation der alveolaren Oberfläche detektiert. An Tag 3 nach PNX war diese aber wieder vergleichbar mit dem Zugewinn an alveolarer Oberfläche in Wildtyptieren, wohingegen die alveolare Oberfläche in Timp1^{-/-} Mäusen nach PNX zu jedem analysierten Zeitpunkt geringer war als in pneumonektomierten Wildtypmäusen. Möglicherweise wurde Timp1 in Egr1^{-/-} Tieren durch einen anderen kompensatorischen Mechanismus induziert.

Die ersten strukturellen Veränderungen des kompensatorischen Lungenwachstums gehen mit einer Vergrößerung der alveolaren Oberfläche einher und sie scheinen nur bedingt Proliferation zu erfordern [237]. Die Vergrößerung der alveolaren Oberfläche könnte dabei aus einer Kombination, bestehend aus einer Vergrößerung der bestehenden Alveolen und aus einer Neubildung von Alveolen hervorgehen, wobei diese Prozesse parallel verlaufen, aber unabhängig voneinander zu sein scheinen.

Ein Indiz hierfür ist die Regeneration der alveolaren Oberfläche und der alveolaren Anzahl bei pneumonektomierten Egr1^{-/-} Mäusen. Die alveolare Oberfläche entsprach an Tag 3 nach PNX wieder der von Wildtyptieren und war nur an Tag 1 nach PNX in pneumonektomierten Egr1^{-/-}

Tieren geringer. Der pneumonektomiebedingte Zugewinn an Alveolen war aber bei allen analysierten Zeitpunkten nach PNX bei Egr1^{-/-} Mäusen stets geringer als bei entsprechenden Wildtyptieren. Die Neoalveolarisierung könnte dabei nach dem Mechanismus der späten Alveolarisierung oder einer noch unbekanntem Art der Alveolarisierung verlaufen [40]. Dabei könnten Timp1 bzw. Egr1 bei der hierfür nötigen Angiogenese beteiligt sein und Elastin bei der Ausfaltung der neuen alveolaren Septen [115, 327, 328, 365].

Bedingt durch die Vergrößerung der Alveolen und die Neubildung von Alveolen kommt es an Tag 3 nach PNX zu einer (kritischen) Dehnung der alveolaren Zellen, wodurch in einem Egr1-unabhängigen Mechanismus TnC – eventuell auch mechanisch induziert – exprimiert wird. Über seine anti-adhäsiven Funktionen lockert es die EZM-Zellkontakte und verhindert somit eine Überdehnung der alveolaren Zellen [310, 366]. Ab diesem Zeitpunkt erfordern die strukturellen Veränderungen innerhalb des Lungenparenchyms eine Proliferation der darin enthaltenen Zellen. Die ansteigende Proliferation (post-PNX Tag 3 und 4) könnte ebenfalls unter Mitwirkung von Egr1 erfolgen, wobei es diesmal eine mitogene Funktion ausübt (z.B. bei Epithelzellen). Auch hierfür könnte die Expression von Egr1 wieder über Mechanotransduktion erfolgen. Hervorgerufen durch eine Dehnung der alveolaren Zellen im Zuge des kompensatorischen Lungenwachstums (vgl. TnC).

Zu diesen Zeitpunkten korreliert die Expression von Egr1 mit der von TnC und eine Beteiligung dieser Proteine an Zelldifferenzierungsprozessen könnte ebenfalls möglich sein, wobei TnC auch die Migration von Myofibroblasten steuern könnte [80, 157, 173, 326].

Die vermehrte Proliferation ist dabei als ein zellulärer Anpassungsprozess auf die vorhergehenden strukturellen Veränderungen zu verstehen und gipfelt an Tag 7 während des kompensatorischen Lungenwachstums, wobei Egr1 ebenfalls nochmals stark exprimiert wird. Zu diesem Zeitpunkt ist der pneumonektomiebedingte Verlust der respiratorischen Strukturen bereits zu einem Großteil kompensiert und die folgenden Prozesse dienen zur Wiederherstellung der ursprünglichen Homöostase bzw. zur finalen Wiederherstellung der Lungenfunktion und beinhalten zumeist zelluläre Veränderungen.

Es ist unklar, wie lange der Prozess der Neoalveolarisierung während des kompensatorischen Lungenwachstums andauert, da bei der Charakterisierung dieses Prozesses in der Maus sehr späte Zeitpunkte (> 20 Tage post-PNX) gewählt wurden [56, 57]. Diese und andere Arbeiten, die morphometrische Analysen während des kompensatorischen Lungenwachstums beinhalteten, deuten darauf hin, dass bereits nach 7 bis 10 Tagen ein Großteil der Neoalveolarisierung bzw. der strukturellen Kompensation stattgefunden hat [103, 367].

Obwohl nach Tag 7 die meisten strukturellen Veränderungen abgeschlossen zu sein scheinen, könnte die erhöhte Proliferation zu einer erneuten Erhöhung des mechanischen Stresses führen. In diesem Fall könnten die proliferierten Zellen die EZM mechanisch belasten, wodurch es an Tag 10 nach PNX erneut zu einer gesteigerten Expression von TnC kommt, um diese Belastung zu lockern. Weiterhin könnte TnC die Myofibroblastenmigration an die Orte der erhöhten mechanischen Spannung begünstigen, welche durch die Expression von Komponenten elastischer Faser (z.B. Elastin, Fibulin 4 an Tag 10-14 post-PNX) die dortigen elastischen Fasern ausbauen und den neuen mechanischen Verhältnissen anpassen, damit sich erneut ein biomechanisches Equilibrium ausbilden kann.

Zur endgültigen Bestätigung dieses hypothetischen Verlaufs des kompensatorischen Lungenwachstums ist eine Vielzahl von weiterführenden Experimenten nötig. Eine detaillierte Messung der Lungenfunktion in pneumonektomierten Wildtyp-Tieren könnte dabei zunächst Aufschluss über die genaue zeitliche Wiederherstellung der Lungenfunktion liefern und ob sie sich erst nach Abschluss der strukturellen Veränderungen bzw. Phase der erhöhten Proliferation nach PNX (> Tag 7) stärker verbessert. Eine darauffolgende detaillierte Lungenfunktionsmessung von pneumonektomierten Knockout- bzw. transgenen Tieren würde bei der Aufklärung funktioneller Fragestellungen weiterhelfen. Eine solche Lungenfunktionsanalyse wie auch spätere Zeitpunkte in den hier durchgeführten stereologischen Knockout-Analysen war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Weiterhin gilt es zu prüfen, welche genauen Effekte Egr1 auf die unterschiedlichen Zelltypen des nach PNX verbliebenen Lungenflügels während des kompensatorischen Lungenwachstums hat und es gilt die exakte Rolle von Tgf β im Zusammenhang mit Egr1 zu ermitteln.

Pneumonektomie-Experimente mit induzierbaren Elastin Knockout-Mäusen, könnten neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von Elastin und der (Neo-) Alveolarisierung bringen.

Die Messung der MMP-Aktivität in pneumonektomierten Timp1^{-/-} Mäusen würde weitere Einblicke in die MMP-abhängigen- und MMP-unabhängigen Funktionen von Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums liefern. Eine weiterführende Untersuchung (vorzugsweise mit einem C57BL/6-Zuchthintergrund) von TnC^{-/-} Mäusen und Zelldifferenzierungsstudien könnten eventuelle (synergistische) Effekte von TnC und Egr1 auf den Differenzierungsstatus von Zellen bestätigen.

Mit absoluter Sicherheit existiert für das kompensatorische Lungenwachstum kein Schlüsselfaktor bzw. ausschlaggebender Mechanismus. Neben Egr1 sind noch weitere Faktoren wie beispielsweise EGF, HGF, IGF und KGF, PDGF α , FGF für das kompensatorische Lungenwachstum von Bedeutung. Alle diese Wachstumsfaktoren konnten bisher mit dem kompensatorischen Lungenwachstum in Verbindung gebracht werden [87, 105]. Anzumerken bleibt, dass auch Egr1 schon mit den meisten hier genannten Faktoren ebenfalls in Verbindung gebracht wurde [208, 210, 213, 326, 328, 361, 368-370]. Dennoch dürfte Egr1 nicht alle davon während des kompensatorischen Lungenwachstums regulieren, da seine Funktionen/Zielgene, wie bereits erwähnt, sehr spezifisch von bestimmten Faktoren (Art des Stimulus, Zelltyp) abhängen.

Es ist aber wahrscheinlich, dass alle beim kompensatorischen Lungenwachstum involvierten Mediatoren sich mit ihren Signalkaskaden an vielen Punkten überschneiden und sich dadurch gegenseitig kompensieren können. Dies würde erklären, dass bisher noch kein Experiment das kompensatorische Lungenwachstum zu 100 % inhibieren konnte [60, 87, 371].

Die hier durchgeführten Analysen zeigen weiter, dass es sich bei dem kompensatorischen Lungenwachstum nicht lediglich um eine Reaktivierung von Mechanismen der Lungenentwicklung handelt. Die strukturellen Parameter von sham-operierten Egr1^{-/-} Kontrollmäusen zeigen, dass Egr1 maximal eine untergeordnete Rolle während der Lungenentwicklung und besonders während der Alveolarisierung zu spielen scheint. Bis auf ein größeres massenspezifisches Lungenvolumen im Vergleich zu Wildtyptieren zeigte dieser Knockout-Stamm keine signifikanten Unterschiede bezüglich der anderen analysierten Parameter. Aufgrund einer Inzuchtdepression standen keine Egr1 Knockout-Tiere mehr für Lungenfunktionsmessungen (oder andere weiterführende Experimente) während dieser Arbeit zur Verfügung.

Die veränderte Lungenfunktion von TnC^{-/-} und Timp1^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren war stets mit einer veränderten alveolaren Oberfläche, Alveolarzahl und/oder Lungenvolumen korreliert. Somit ist bei Egr1^{-/-} Mäusen nur eine geringfügig veränderte Lungenfunktion im Vergleich zu Wildtyptieren zu erwarten. Weiterhin zeigte die postnatale Expressionsanalyse, dass Egr1 zu allen analysierten Zeitpunkten nicht reguliert war (Abbildung 4.15) und es konnte keine Literatur bezüglich einer potentiellen Rolle von Egr1 in der Lungenentwicklung gefunden werden. Eine Studie, die sich mit dem für die Lungenentwicklung eminent wichtigen Transkriptionsfaktor TTF 1 (Thyroid Transkriptionsfaktor) beschäftigte, konnte zeigen, dass ein Knockdown der TTF 1 Expression das kompensatorische Lungenwachstum lediglich etwas verzögert [103].

All dies deutet darauf hin, dass das kompensatorische Lungenwachstum aus einer Kombination von verschiedenen Mechanismen besteht. Dabei kommt es zum Einen zu einer Reaktivierung von bestimmten Entwicklungsmechanismen und zum Anderen erfordert es auch eine Aktivierung von anderen „regenerativen“ Mechanismen, die eventuell sogar spezifisch für das kompensatorische Lungenwachstum sind [87].

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit Hilfe von Knockout-Mäusen der Einfluss von potentiellen Mediatoren (hier: Egr1, TnC, Timp1) des kompensatorischen Lungenwachstums näher beschrieben werden kann.

Weiterhin gibt sie einen ersten Einblick in einen über Egr1 regulierten funktionellen Mechanismus während dieses Kompensationsprozesses. Um aufgezeigte hypothetische Zusammenhänge zu evaluieren und diese ersten Erkenntnisse besser verstehen zu können, wäre eine vergleichende globale Expressionsanalyse mit pneumonektomierten Knockout- (Egr1, TnC, Timp1) Mäusen und Wildtyptieren ein möglicher nächster Schritt.

Gleichzeitig durchgeführte Zellkulturversuche könnten weiterhin Informationen über potentielle Signalkaskaden zur Aktivierung der Expression von Egr1/TnC, aber auch über die Mechanismen zur Regulation der Zielgene von Egr1 (Elastin, Timp1, u.a.) während des kompensatorischen Lungenwachstums liefern.

Da die Egr1-vermittelten Funktionen zellspezifisch sind, würde dies eine Analyse aller Zelltypen des Lungenparenchyms erfordern. Eine folgende Prüfung der *in vitro* gefundenen Zusammenhänge könnte *in vivo* wiederum mit Hilfe von spezifischen Knockout-Mäusen erfolgen. Induzierbare zelltypspezifische transgene/knockout Mäuse oder Mäuse mit mehreren Gendelektionen könnten hierbei detailliertere Erkenntnisse erbringen.

Ähnliche Versuche mit dem Fokus auf TnC könnten nähere Informationen über die Regulation bzw. Aktivierung der Expression von TnC und dessen Funktionen während des kompensatorischen Lungenwachstums liefern. Hierbei gilt es ebenfalls die genauen alternativen Transkripte von TnC zu identifizieren.

Weitere Untersuchungen bezüglich der MMP-Aktivität in pneumonektomierten TnC^{-/-} Mäusen und auch Timp1^{-/-} Mäusen bringen zum Einen Erkenntnisse über die Rolle von MMPs während des kompensatorischen Lungenwachstums und deren Einfluss auf TnC. Weiterhin könnten

durch solche Analysen die MMP-abhängigen und MMP-unabhängigen Funktionen von Timp1 während des kompensatorischen Lungenwachstums identifiziert werden.

Alle hier untersuchten Kandidaten konnten schon mit verschiedenen Lungenkrankheiten in Verbindung gebracht werden. Eine Kombination aus Pneumonektomie innerhalb eines Krankheitsmodelles der Maus (z.B. Zigarettenrauch-induziertes Lungenemphysem, Bleomycin-induzierte Fibrose) mit einer zusätzlichen Gruppe der hier verwendeten Knockout-Tiere könnte helfen das kompensatorische Lungenwachstum besser zu verstehen und eventuell auch neue therapeutische Ziele bei den verwendeten Krankheitsmodellen offenzulegen.

Da der Mechanismus der Neoalveolarisierung während des kompensatorischen Lungenwachstums noch nicht ausreichend geklärt ist, würde ebenfalls eine vergleichende Studie mit Fokus auf den Mechanismus der späten Alveolarisierung nahe liegen. Die Hintergründe der späten Alveolarisierung sind noch größtenteils unklar. Möglicherweise beruht die Rolle von Egr1 während des kompensatorischen Lungenwachstums auf einem Mechanismus der späten Alveolarisierung.

Dies könnte ebenfalls für elastische Fasern bzw. Elastin gelten. Studien über die Veränderung (z.B. Dichte, Durchmesser) der elastischen Fasern während des kompensatorischen Lungenwachstum/späte Alveolarisierung und eine Untersuchung pneumonektomierter induzierbarer Elastin Knockout-Mäuse wären hierbei in Betracht zu ziehen.

Da es sicherlich keinen Schlüsselmechanismus zur potentiellen Manipulation des kompensatorischen Lungenwachstums gibt, sind eine Vielzahl an verschiedensten vergleichenden Analysen auch für eine potentielle Übertragbarkeit auf den Menschen erforderlich. Somit könnten mögliche Schnittpunkte der einzelnen Hauptmediatoren identifiziert werden.

Das kompensatorische Lungenwachstum ist sehr komplex. Doch ein weiteres Verständnis der Grundlagen dieses Prozesses wird nicht nur neue Perspektiven im Hinblick auf klinische Volumenreduktionsoperationen liefern. Die Mechanismen des kompensatorischen Lungenwachstums könnten der Ursprung von nicht nur neuen, sondern innovativen therapeutischen Ansätzen sein, welche die Aussicht auf eine tatsächliche kurative Behandlung von prominenten Lungenerkrankungen verbessern könnte [372].

6 Zusammenfassung

Unilaterale Pneumonektomie (PNX) und die damit einhergehenden mechanischen Veränderungen führen bei adulten Mäusen zu einem rapiden kompensatorischen Lungenwachstum des verbliebenen Lungenflügels. Im Zuge dieses Kompensationsprozesses kommt es dabei über eine Neubildung von Alveolen und anderen Prozessen zu einer nahezu vollständigen Wiederherstellung des verlorenen gasaustauschenden Gewebes.

Bis heute ist kaum verstanden, welche molekularen Mechanismen dem kompensatorischen Lungenwachstum zu Grunde liegen und ob damit eine Reaktivierung von Prozessen der Lungenentwicklung (Alveolarisierung) verbunden ist.

Elastische Fasern, deren Bildung ein entwicklungsspezifisches Expressionsprogramm erfordert, stellen mit ihrem Hauptbestandteil Elastin eine wichtige Komponente der alveolaren Extrazellulärmatrix dar. Dabei nehmen sie eine zentrale Rolle bei der Alveolarisierung ein. Da es sich bei dem kompensatorischen Lungenwachstum, wie bei der Lungenentwicklung, um einen aktiven Prozess handelt, erfordert die Reorganisation der Extrazellulärmatrix die Anwesenheit Extrazellulärmatrix-modulierender Faktoren wie die des anti-adhäsiven und migrationsfördernden Proteins Tenascin C (TnC) und dem endogenen Matrixmetalloproteinase (MMP)-Inhibitor Timp1.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand einer vergleichenden Expressionsanalyse gezeigt werden, dass es während des kompensatorischen Lungenwachstums und der damit einhergehenden Neoalveolarisierung nicht zu einer Rekapitulation des für die Bildung funktioneller elastischer Fasern erforderlichen koordinierten Genexpressionsprogramms der Entwicklung kommt. Dies deutet darauf hin, dass keine neuen elastischen Fasern während des kompensatorischen Lungenwachstums gebildet werden, oder ein weiterer alternativer Assemblierungsmechanismus existiert.

Weiterhin war die während des kompensatorischen Lungenwachstums induzierte Expression von Elastin von dem Transkriptionsfaktor (Early Growth Response 1“ (Egr1) reguliert, dessen mRNA-Expression voraussichtlich via Mechanotransduktion unmittelbar nach PNX, aber nicht während der postnatalen Alveolarisierung hochreguliert war. Nicht nur als Folge hiervon wiesen pneumonektomierte Egr1^{-/-} Mäuse ein beeinträchtigtes kompensatorisches Lungenwachstum auf.

Eine nähere Charakterisierung des endogenen Matrixmetalloproteinase-Inhibitors Timp1 zeigte, dass dessen Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums sehr stark sowie nahezu dauerhaft hochreguliert war und diese Expression ebenfalls über Egr1

reguliert wurde. Dabei scheint Timp1 MMP-abhängige und MMP-unabhängige Funktionen während des kompensatorischen Lungenwachstums zu vermitteln. Bei pneumonektomierten Timp1^{-/-} Mäusen wurde eine beeinträchtigte Regeneration der alveolaren Oberfläche beobachtet. Weiterhin führte eine Deletion des Gens für Timp1 zu einer veränderten Lungenstruktur und Lungenfunktion.

Für das Extrazellulärmatrix-assoziierte Protein Tenascin C, welches während der Alveolarisierung sehr stark exprimiert wird, konnte ebenfalls eine signifikante Egr1-unabhängige Steigerung der Expression während des kompensatorischen Lungenwachstums festgestellt werden, wobei eine Deletion des Gens für TnC allgemeine Folgen für die Lungenstruktur und die Lungenfunktion hatte. Die stereologische Analyse von pneumonektomierten TnC^{-/-} Mäusen zeigte, dass das kompensatorische Lungenwachstum bei verschiedenen Mausinzuchtstämmen eine zeitlich unterschiedliche Progression aufzuweisen scheint.

Mit der vorgelegten Studie konnte ein erster Einblick in einen funktionellen Mechanismus des kompensatorischen Lungenwachstums gewonnen werden. Eine weitere Erforschung der Egr1 gesteuerten Regulation von Elastin und Timp1 könnte als neue Grundlage innovativer therapeutischer Ansätze für diverse Lungenerkrankungen, welche mit dem Umbau/Verlust von Alveolen einhergehen, dienen.

7 Summary

Unilateral pneumonectomy and for this reason associated mechanical changes lead to a rapid compensatory lung growth in adult mice. In course of this compensational process a nearly complete restoration of the lost respiratory tissue occurs, including neoalveolarization. Currently, still little is known about the molecular mechanisms driving compensatory lung growth and if also a recapitulation of developmental processes (alveolarization) is involved. Elastic fibers with their main component Elastin are an important constituent of the extracellular matrix and the assembly of elastic fibers requires a complicated temporal and spatial expression program which seems to be specific for development. Furthermore, elastic fibers are crucial for alveolarization. As lung development compensatory lung growth is an active process which includes a reorganisation of the extracellular matrix. Therefore extracellular matrix modulating factors like the anti-adhesive/migration promoting protein Tenascin C (TnC) and the endogenous inhibitor of matrix metalloproteinases Timp1 are needed.

By performing a comparative gene expression analysis this study could show that the coordinated developmental gene expression program required for the assembly of functional elastic fibers is not recapitulated during compensatory lung growth indicating that no new elastic fibers are formed or assembly is driven by an alternative mechanism during compensatory lung growth. In addition, in the course of compensatory lung growth induced expression of elastin was regulated by the transcription factor „early growth response 1“ (Egr1) whose mRNA expression is upregulated immediately after PNX but not during postnatal alveolarization presumably via mechanotransduction. As a consequence of this compensatory lung growth was impaired in pneumonectomized Egr1^{-/-} mice. Further characterisation of the matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor Timp1 showed that Timp1 expression which was constantly upregulated during compensatory lung growth was also regulated by Egr1. Presumably Timp1 contributes with its MMP-dependent and MMP-independent functions to compensatory lung growth while an impaired regeneration of alveolar surface area has been observed in pneumonectomized Timp1^{-/-} mice. Deletion of Timp1 gene also leads to an altered lung structure as well as lung function. The extracellular matrix-associated protein TnC which is highly expressed during alveolarization was found to be also significantly upregulated during compensatory lung growth by an independent mechanism apart from Egr1. Lungs of TnC^{-/-} mice demonstrated alterations in structure and function. Stereological analysis of pneumonectomized TnC^{-/-} mice revealed that temporal progression of compensatory lung growth seems to be without regard to a deletion of TnC different in distinct mouse inbred strains.

This study delivers first insights into a functional mechanism of compensatory lung growth. Further research on the shown Egr1 driven regulation of elastin and Timp1 could be a novel

basis for innovative therapeutical strategies leading to a successful induction of (neo)alveolarization in adult mammals.

8 Literaturverzeichnis

1. Kattmann, U., *Wirbeltiere: Evolution, Lebensweisen und Leistungen*. Friedrich Verlag, 1996.
2. Massaro, D. and G.D. Massaro, *Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **282**(3): p. L345-58.
3. Maeda, Y., V. Dave, and J.A. Whitsett, *Transcriptional control of lung morphogenesis*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 219-44.
4. Penzlin, *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Vol. 6. 1996, Jena: Gustav Fischer Verlag.
5. Fritsch, K., *Taschenatlas der Anatomie in 3 Bänden - Innere Organe*. Vol. Band 2. 2003: Thieme.
6. Clauss, W., *Tierphysiologie kompakt*. Vol. 1. 2007, München: Elsevier GmbH, Spektrum Akademische Verlag.
7. Mörke KD, B.E.u.M.W., *Ein Lehrbuch der Anatomie, Physiologie und Entwicklungsgeschichte des Menschen*. Vol. 9. 1976, Heidelberg: Quelle und Meyer.
8. Schnorr, K., *Embryologie der Haustiere*. 2006: Enke Verlag.
9. www.s.ndimg.de.
10. Weibel, E.R., *What makes a good lung?* *Swiss Med Wkly*, 2009. **139**(27-28): p. 375-86.
11. Weibel, E.R., *How to make an alveolus*. *Eur Respir J*, 2008. **31**(3): p. 483-5.
12. Campbell, *Biologie*. Vol. 6. 2003, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
13. Golenhofen, *Physiologie heute*. Vol. 2. 2000, München: Urban & Fischer Verlag.
14. Rock, J.R. and B.L. Hogan, *Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 493-512.
15. Evans, M.J., et al., *Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium*. *Exp Lung Res*, 2001. **27**(5): p. 401-15.
16. Reynolds, S.D., et al., *Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(11): p. 1498-509.
17. Chen, G., et al., *SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(10): p. 2914-24.
18. Evans, C.M., et al., *Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **31**(4): p. 382-94.
19. Williams, O.W., et al., *Airway mucus: From production to secretion*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **34**(5): p. 527-36.
20. Boers, J.E., A.W. Ambergen, and F.B. Thunnissen, *Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 2000-6.
21. Rock, J.R., et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(31): p. 12771-5.
22. Van Lommel, A., *Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development*. *Paediatr Respir Rev*, 2001. **2**(2): p. 171-6.
23. Herzog, E.L., et al., *Knowns and unknowns of the alveolus*. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(7): p. 778-82.
24. Crapo, J.D., et al., *Cell number and cell characteristics of the normal human lung*. *Am Rev Respir Dis*, 1982. **126**(2): p. 332-7.
25. Ma, T., et al., *Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(1): p. 93-100.
26. Danto, S.I., et al., *Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. **12**(5): p. 497-502.

27. Orgeig, S., et al., *The anatomy, physics, and physiology of gas exchange surfaces: is there a universal function for pulmonary surfactant in animal respiratory structures?* Integr Comp Biol, 2007. **47**(4): p. 610-27.
28. Kim, C.F., et al., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer.* Cell, 2005. **121**(6): p. 823-35.
29. Isakson, B.E., et al., *Modulation of pulmonary alveolar type II cell phenotype and communication by extracellular matrix and KGF.* Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(4): p. C1291-9.
30. McGowan, S.E. and J.S. Torday, *The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development.* Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 43-62.
31. Pelosi, P., et al., *The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation.* An Acad Bras Cienc, 2007. **79**(2): p. 285-97.
32. Potter, E.L. and C.G. Loosli, *Prenatal development of the human lung.* AMA Am J Dis Child, 1951. **82**(2): p. 226-8.
33. Kimura, J. and G.H. Deutsch, *Key mechanisms of early lung development.* Pediatr Dev Pathol, 2007. **10**(5): p. 335-47.
34. Lawson, K.A., J.J. Meneses, and R.A. Pedersen, *Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer.* Dev Biol, 1986. **115**(2): p. 325-39.
35. Hogan, B.L., *Morphogenesis.* Cell, 1999. **96**(2): p. 225-33.
36. Burri, P.H., *Fetal and postnatal development of the lung.* Annu Rev Physiol, 1984. **46**: p. 617-28.
37. Rawlins, E.L. and B.L.M. Hogan, *Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?* Development, 2006. **133**(13): p. 2455-2465.
38. Roth-Kleiner, M. and M. Post, *Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development.* Pediatr Pulmonol, 2005. **40**(2): p. 113-34.
39. Mund, S.I., M. Stampanoni, and J.C. Schittny, *Developmental alveolarization of the mouse lung.* Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 2108-16.
40. Schittny, J.C., S.I. Mund, and M. Stampanoni, *Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(2): p. L246-54.
41. Burri, P.H., *Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth.* Biol Neonate, 2006. **89**(4): p. 313-22.
42. Amy, R.W., et al., *Postnatal growth of the mouse lung.* J Anat, 1977. **124**(Pt 1): p. 131-51.
43. Burri, P.H., *The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology.* Anat Rec, 1974. **180**(1): p. 77-98.
44. Kauffman, S.L., P.H. Burri, and E.R. Weibel, *The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography.* Anat Rec, 1974. **180**(1): p. 63-76.
45. Burri, P.H., J. Dbaly, and E.R. Weibel, *The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry.* Anat Rec, 1974. **178**(4): p. 711-30.
46. Zeltner, T.B. and P.H. Burri, *The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology.* Respir Physiol, 1987. **67**(3): p. 269-82.
47. Zeltner, T.B., et al., *The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry.* Respir Physiol, 1987. **67**(3): p. 247-67.
48. Emery, J.L. and A. Mithal, *The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood.* Arch Dis Child, 1960. **35**: p. 544-7.
49. Langston, C., et al., *Human lung growth in late gestation and in the neonate.* Am Rev Respir Dis, 1984. **129**(4): p. 607-13.
50. Mariani, T.J., S. Sandefur, and R.A. Pierce, *Elastin in lung development.* Exp Lung Res, 1997. **23**(2): p. 131-45.
51. Wendel, D.P., et al., *Impaired distal airway development in mice lacking elastin.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(3): p. 320-6.
52. Bostrom, H., A. Gritli-Linde, and C. Betsholtz, *PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis.* Dev Dyn, 2002. **223**(1): p. 155-62.

53. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. Cell, 1996. **85**(6): p. 863-73.
54. Massaro, G.D. and D. Massaro, *Postnatal lung growth: evidence that the gas-exchange region grows fastest at the periphery*. Am J Physiol, 1993. **265**(4 Pt 1): p. L319-22.
55. Roth-Kleiner, M., et al., *Neonatal steroids induce a down-regulation of tenascin-C and elastin and cause a deceleration of the first phase and an acceleration of the second phase of lung alveolarization*. Histochem Cell Biol, 2014. **141**(1): p. 75-84.
56. Voswinckel, R., et al., *Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice*. Eur Respir J, 2004. **24**(4): p. 524-32.
57. Fehrenbach, H., et al., *Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice*. Eur Respir J, 2008. **31**(3): p. 515-22.
58. Brown, L.M., S.R. Rannels, and D.E. Rannels, *Implications of post-pneumonectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and disease*. Respir Res, 2001. **2**(6): p. 340-7.
59. Hsia, C.C., *Lessons from a canine model of compensatory lung growth*. Curr Top Dev Biol, 2004. **64**: p. 17-32.
60. Hsia, C.C., *Signals and mechanisms of compensatory lung growth*. J Appl Physiol, 2004. **97**(5): p. 1992-8.
61. Takeda, S., et al., *Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy*. J Appl Physiol (1985), 1999. **86**(4): p. 1301-10.
62. Wandel, G., L.C. Berger, and P.H. Burri, *Morphometric analysis of adult rat lung after bilobectomy*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(6): p. 968-72.
63. Hsia, C.C., et al., *Structural changes underlying compensatory increase of diffusing capacity after left pneumonectomy in adult dogs*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 758-64.
64. Hsia, C.C., et al., *Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 405-12.
65. Arnup, M.E., et al., *Dynamic lung function in dogs with compensatory lung growth*. J Appl Physiol, 1984. **57**(5): p. 1569-76.
66. Cagle, P.T., C. Langston, and W.M. Thurlbeck, *The effect of age on postpneumonectomy growth in rabbits*. Pediatr Pulmonol, 1988. **5**(2): p. 92-5.
67. Langston, C., et al., *Alveolar multiplication in the contralateral lung after unilateral pneumonectomy in the rabbit*. Am Rev Respir Dis, 1977. **115**(1): p. 7-13.
68. Buhain, W.J. and J.S. Brody, *Compensatory growth of the lung following pneumonectomy*. J Appl Physiol, 1973. **35**(6): p. 898-902.
69. Rannels, D.E., D.M. White, and C.A. Watkins, *Rapidity of compensatory lung growth following pneumonectomy in adult rats*. J Appl Physiol, 1979. **46**(2): p. 326-33.
70. Yuan, S., et al., *A role for platelet-derived growth factor-BB in rat postpneumonectomy compensatory lung growth*. Pediatr Res, 2002. **52**(1): p. 25-33.
71. Voswinckel, R., et al., *Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth*. Circ Res, 2003. **93**(4): p. 372-9.
72. Pokall, S., et al., *Compensatory lung growth in NOS3 knockout mice suggests synthase isoform redundancy*. Eur J Pediatr Surg, 2012. **22**(2): p. 148-56.
73. McBride, J.T., *Lung volumes after an increase in lung distension in pneumonectomized ferrets*. J Appl Physiol (1985), 1989. **67**(4): p. 1418-21.
74. McBride, J.T., *Postpneumonectomy airway growth in the ferret*. J Appl Physiol (1985), 1985. **58**(3): p. 1010-4.
75. Kaza, A.K., et al., *Contrasting natures of lung growth after transplantation and lobectomy*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **123**(2): p. 288-94.
76. Fisher, J.M. and J.D. Simnett, *Morphogenetic and proliferative changes in the regenerating lung of the rat*. Anat Rec, 1973. **176**(4): p. 389-95.
77. Kuboi, S., et al., *DNA synthesis and related enzymes altered in compensatory lung growth in rats*. Scand J Clin Lab Invest, 1992. **52**(7): p. 707-15.
78. Brody, J.S., *Time course of and stimuli to compensatory growth of the lung after pneumonectomy*. J Clin Invest, 1975. **56**(4): p. 897-904.

79. Brody, J.S., R. Burki, and N. Kaplan, *Deoxyribonucleic acid synthesis in lung cells during compensatory lung growth after pneumectomy*. Am Rev Respir Dis, 1978. **117**(2): p. 307-16.
80. Chen, L., et al., *Dynamic regulation of platelet-derived growth factor receptor alpha expression in alveolar fibroblasts during realveolarization*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(4): p. 517-27.
81. Hoffman, A.M., et al., *Matrix modulation of compensatory lung regrowth and progenitor cell proliferation in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **298**(2): p. L158-68.
82. Greville, H.W., et al., *Mechanism of reduced maximum expiratory flow in dogs with compensatory lung growth*. J Appl Physiol, 1986. **60**(2): p. 441-8.
83. Rannels, D.E., L.R. Burkhart, and C.A. Watkins, *Effect of age on the accumulation of lung protein following unilateral pneumectomy in rats*. Growth, 1984. **48**(3): p. 297-308.
84. Paxson, J.A., et al., *Age-dependent decline in mouse lung regeneration with loss of lung fibroblast clonogenicity and increased myofibroblastic differentiation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23232.
85. Thurlbeck, W.M., W. Galaugher, and J. Mathers, *Adaptive response to pneumectomy in puppies*. Thorax, 1981. **36**(6): p. 424-7.
86. Gilbert, K.A. and D.E. Rannels, *From Limbs to Lungs: A New Perspective on Compensatory Lung Growth*. News Physiol Sci, 1999. **14**: p. 260-267.
87. ATS, *Mechanisms and limits of induced postnatal lung growth*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(3): p. 319-43.
88. Laros, C.D. and C.J. Westermann, *Dilatation, compensatory growth, or both after pneumectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **93**(4): p. 570-6.
89. Nakajima, C., et al., *Longitudinal follow-up of pulmonary function after lobectomy in childhood - factors affecting lung growth*. Pediatr Surg Int, 1998. **13**(5-6): p. 341-5.
90. Butler, J.P., et al., *Evidence for adult lung growth in humans*. N Engl J Med, 2012. **367**(3): p. 244-7.
91. Hsia, C.C., M. Ramanathan, and A.S. Estrera, *Recruitment of diffusing capacity with exercise in patients after pneumectomy*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(4 Pt 1): p. 811-6.
92. Gilbert, K.A. and D.E. Rannels, *Increased lung inflation induces gene expression after pneumectomy*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L21-9.
93. Gibney, B.C., et al., *Mechanostructural adaptations preceding postpneumectomy lung growth*. Exp Lung Res, 2012. **38**(8): p. 396-405.
94. Olson, L.E. and E.A. Hoffman, *Lung volumes and distribution of regional air content determined by cine X-ray CT of pneumectomized rabbits*. J Appl Physiol (1985), 1994. **76**(4): p. 1774-85.
95. Hsia, C.C., et al., *Preventing mediastinal shift after pneumectomy impairs regenerative alveolar tissue growth*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(5): p. L1279-87.
96. Wu, E.Y., et al., *Preventing mediastinal shift after pneumectomy does not abolish physiological compensation*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(1): p. 182-91.
97. McBride, J.T., et al., *Role of pulmonary blood flow in postpneumectomy lung growth*. J Appl Physiol (1985), 1992. **73**(6): p. 2448-51.
98. Koh, D.W., et al., *Postpneumectomy lung growth: a model of reinitiation of tropoelastin and type I collagen production in a normal pattern in adult rat lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **15**(5): p. 611-23.
99. Brody, J.S., et al., *Lung lysyl oxidase and elastin synthesis during compensatory lung growth*. Chest, 1976. **69**(2 Suppl): p. 271-2.
100. Wolff, J.C., et al., *Comparative gene expression profiling of post-natal and post-pneumectomy lung growth*. Eur Respir J, 2010. **35**(3): p. 655-66.
101. Paxson, J.A., et al., *Global gene expression patterns in the post-pneumectomy lung of adult mice*. Respir Res, 2009. **10**: p. 92.

102. Landesberg, L.J., et al., *Upregulation of transcription factors in lung in the early phase of postpneumonectomy lung growth*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(5): p. L1138-49.
103. Takahashi, Y., et al., *Thyroid transcription factor-1 influences the early phase of compensatory lung growth in adult mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(12): p. 1397-406.
104. Rannels, D.E., H.W. Karl, and R.A. Bennett, *Control of compensatory lung growth by adrenal hormones*. Am J Physiol, 1987. **253**(4 Pt 1): p. E343-8.
105. Fernández L.G., I.J.M., Jones D.R., Laubach V.E., *Compensatory Lung Growth After Pneumonectomy, Topics in Thoracic Surgery*, ed. Cardoso. 2012: InTech.
106. Takahashi, Y., et al., *Airway administration of dexamethasone, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, and isobutylmethylxanthine facilitates compensatory lung growth in adult mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(3): p. L453-61.
107. Jackson, S.R., et al., *Partial pneumonectomy of telomerase null mice carrying shortened telomeres initiates cell growth arrest resulting in a limited compensatory growth response*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(6): p. L898-909.
108. Brellier, F., R.P. Tucker, and R. Chiquet-Ehrismann, *Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics*. Scand J Med Sci Sports, 2009. **19**(4): p. 511-9.
109. Montes, G.S., *Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems*. Cell Biol Int, 1996. **20**(1): p. 15-27.
110. Yurchenco, P.D. and J.C. Schittny, *Molecular architecture of basement membranes*. FASEB J, 1990. **4**(6): p. 1577-90.
111. Souza-Fernandes, A.B., P. Pelosi, and P.R. Rocco, *Bench-to-bedside review: the role of glycosaminoglycans in respiratory disease*. Crit Care, 2006. **10**(6): p. 237.
112. Papavasiliou, G., S. Sokic, and M. Turturro, *Synthetic PEG Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for Tissue Engineering Applications*. Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life.
113. Katsumi, A., et al., *Integrins in mechanotransduction*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12001-4.
114. Brown, N.H., *Extracellular Matrix in Development: Insights from Mechanisms Conserved between Invertebrates and Vertebrates*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(12).
115. Chirco, R., et al., *Novel functions of TIMPs in cell signaling*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 99-113.
116. Elkington, P.T. and J.S. Friedland, *Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology*. Thorax, 2006. **61**(3): p. 259-66.
117. Suki, B. and J.H. Bates, *Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 33-43.
118. Kim, H.Y. and C.M. Nelson, *Extracellular matrix and cytoskeletal dynamics during branching morphogenesis*. Organogenesis, 2012. **8**(2): p. 56-64.
119. Bruce, M.C. and C.E. Honaker, *Transcriptional regulation of tropoelastin expression in rat lung fibroblasts: changes with age and hyperoxia*. Am J Physiol, 1998. **274**(6 Pt 1): p. L940-50.
120. Pierce, R.A., T.J. Mariani, and R.M. Senior, *Elastin in lung development and disease*. Ciba Found Symp, 1995. **192**: p. 199-212; discussion 212-4.
121. Powell, J.T. and P.L. Whitney, *Postnatal development of rat lung. Changes in lung lectin, elastin, acetylcholinesterase and other enzymes*. Biochem J, 1980. **188**(1): p. 1-8.
122. Hill, C.H., R. Mecham, and B. Starcher, *Fibrillin-2 defects impair elastic fiber assembly in a homocysteinemic chick model*. J Nutr, 2002. **132**(8): p. 2143-50.
123. McLaughlin, P.J., et al., *Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1700-9.
124. Bruce, M.C., et al., *Risk factors for the degradation of lung elastic fibers in the ventilated neonate. Implications for impaired lung development in bronchopulmonary dysplasia*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(1): p. 204-12.

125. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *New insights into elastic fiber assembly*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2007. **81**(4): p. 229-40.
126. Shifren, A. and R.P. Mecham, *The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(5): p. 428-33.
127. Kelleher, C.M., S.E. McLean, and R.P. Mecham, *Vascular extracellular matrix and aortic development*. Curr Top Dev Biol, 2004. **62**: p. 153-88.
128. Shifren, A., et al., *Elastin protein levels are a vital modifier affecting normal lung development and susceptibility to emphysema*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(3): p. L778-87.
129. Kozel, B.A., et al., *Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters*. J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 87-96.
130. Broekelmann, T.J., et al., *Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40939-47.
131. El-Hallous, E., et al., *Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8935-46.
132. Kiely, C.M., M.J. Sherratt, and C.A. Shuttleworth, *Elastic fibres*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2817-28.
133. Shapiro, S.D., et al., *Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon*. J Clin Invest, 1991. **87**(5): p. 1828-34.
134. Bode, W. and K. Maskos, *Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases*. Biol Chem, 2003. **384**(6): p. 863-72.
135. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
136. Nagase, H., A.J. Barrett, and J.F. Woessner, Jr., *Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases*. Matrix Suppl, 1992. **1**: p. 421-4.
137. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
138. Bode, W., et al., *Structural properties of matrix metalloproteinases*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(4): p. 639-52.
139. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
140. Springman, E.B., et al., *Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 364-8.
141. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
142. Lagente, V., et al., *Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(10): p. 1521-30.
143. Coussens, L.M., et al., *Models for gain-of-function and loss-of-function of MMPs. Transgenic and gene targeted mice*. Methods Mol Biol, 2001. **151**: p. 149-79.
144. Zhao, L., et al., *Identification of P311 as a potential gene regulating alveolar generation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(1): p. 48-54.
145. Kheradmand, F., K. Rishi, and Z. Werb, *Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 4): p. 839-48.
146. Hosford, G.E., X. Fang, and D.M. Olson, *Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization*. Pediatr Res, 2004. **56**(1): p. 26-34.

147. Snoek-van Beurden, P.A. and J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Biotechniques, 2005. **38**(1): p. 73-83.
148. Murphy, G., *Tissue inhibitors of metalloproteinases*. Genome Biol, 2011. **12**(11): p. 233.
149. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1362-78.
150. Baker, A.H., D.R. Edwards, and G. Murphy, *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 19): p. 3719-27.
151. Gomez, D.E., et al., *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol, 1997. **74**(2): p. 111-22.
152. Stetler-Stevenson, W.G., *Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities*. Sci Signal, 2008. **1**(27): p. re6.
153. Moore, C.S. and S.J. Crocker, *An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology*. Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 12-6.
154. Leco, K.J., et al., *Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3)*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 817-29.
155. Tucker, R.P., et al., *Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage*. BMC Evol Biol, 2006. **6**: p. 60.
156. Tucker, R.P. and R. Chiquet-Ehrismann, *The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(5): p. 888-92.
157. Jones, F.S. and P.L. Jones, *The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling*. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 235-59.
158. Matsumoto, K., et al., *The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C*. J Cell Biol, 1994. **125**(2): p. 483-93.
159. Geffrotin, C., et al., *Distinct tissue distribution in pigs of tenascin-X and tenascin-C transcripts*. Eur J Biochem, 1995. **231**(1): p. 83-92.
160. Chiquet-Ehrismann, R., et al., *Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis*. Cell, 1986. **47**(1): p. 131-9.
161. Bourdon, M.A., et al., *Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody*. Cancer Res, 1983. **43**(6): p. 2796-805.
162. Chiquet, M. and D.M. Fambrough, *Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis*. J Cell Biol, 1984. **98**(6): p. 1926-36.
163. Chiquet, M. and D.M. Fambrough, *Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits*. J Cell Biol, 1984. **98**(6): p. 1937-46.
164. Erickson, H.P. and J.L. Inglesias, *A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations*. Nature, 1984. **311**(5983): p. 267-9.
165. Grumet, M., et al., *Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 8075-9.
166. Kruse, J., et al., *The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family*. Nature, 1985. **316**(6024): p. 146-8.
167. Rettig, W.J., et al., *Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways*. J Cell Sci, 1994. **107** (Pt 2): p. 487-97.
168. Chiquet-Ehrismann, R. and M. Chiquet, *Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 488-99.
169. Young, S.L., L.Y. Chang, and H.P. Erickson, *Tenascin-C in rat lung: distribution, ontogeny and role in branching morphogenesis*. Dev Biol, 1994. **161**(2): p. 615-25.
170. Roth-Kleiner, M., E. Hirsch, and J.C. Schittny, *Fetal lungs of tenascin-C-deficient mice grow well, but branch poorly in organ culture*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(3): p. 360-6.

171. Ohta, M., et al., *Suppression of hematopoietic activity in tenascin-C-deficient mice*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4074-83.
172. Nakao, N., et al., *Tenascin-C promotes healing of Habu-snake venom-induced glomerulonephritis: studies in knockout congenic mice and in culture*. Am J Pathol, 1998. **152**(5): p. 1237-45.
173. Trebault, A., E.K. Chan, and K.S. Midwood, *Regulation of fibroblast migration by tenascin-C*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 695-7.
174. Joester, A. and A. Faissner, *Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17144-51.
175. Siri, A., et al., *Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8650-4.
176. Fischer, D., et al., *Cell-adhesive responses to tenascin-C splice variants involve formation of fascin microspikes*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(10): p. 2055-75.
177. Chiquet-Ehrismann, R., et al., *Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues*. Cell Regul, 1991. **2**(11): p. 927-38.
178. Orend, G., *Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 1066-83.
179. Calvo, A., et al., *Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis*. Oncogene, 2008. **27**(40): p. 5373-84.
180. Chiquet, M., et al., *From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(5): p. 911-20.
181. Geiger, B. and A. Bershadsky, *Assembly and mechanosensory function of focal contacts*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 584-92.
182. Zaidel-Bar, R., et al., *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 22): p. 4605-13.
183. Bershadsky, A., M. Kozlov, and B. Geiger, *Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 472-81.
184. Ingber, D.E., *Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 7): p. 1157-73.
185. Pelham, R.J., Jr. and Y.L. Wang, *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate*. Biol Bull, 1998. **194**(3): p. 348-9; discussion 349-50.
186. Lele, T.P., et al., *Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells*. J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 187-94.
187. Sawada, Y., et al., *Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas*. Cell, 2006. **127**(5): p. 1015-26.
188. Tamada, M., M.P. Sheetz, and Y. Sawada, *Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 709-18.
189. Flecknoe, S.J., et al., *Regulation of alveolar epithelial cell phenotypes in fetal sheep: roles of cortisol and lung expansion*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(6): p. L1207-14.
190. Harding, R. and S.B. Hooper, *Regulation of lung expansion and lung growth before birth*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(1): p. 209-24.
191. Wirtz, H.R. and L.G. Dobbs, *Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1266-9.
192. Liu, M., A.K. Tanswell, and M. Post, *Mechanical force-induced signal transduction in lung cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 1): p. L667-83.
193. Milbrandt, J., *A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor*. Science, 1987. **238**(4828): p. 797-9.
194. Lemaire, P., et al., *Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4691-5.

195. Christy, B.A., L.F. Lau, and D. Nathans, *A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 7857-61.
196. Lim, R.W., B.C. Varnum, and H.R. Herschman, *Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant*. Oncogene, 1987. **1**(3): p. 263-70.
197. Sukhatme, V.P., et al., *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization*. Cell, 1988. **53**(1): p. 37-43.
198. Pavletich, N.P. and C.O. Pabo, *Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å*. Science, 1991. **252**(5007): p. 809-17.
199. Russo, M.W., B.R. Sevetson, and J. Milbrandt, *Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6873-7.
200. Kirsch, K.H., Y. Korradi, and J.P. Johnson, *Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas*. Oncogene, 1996. **12**(5): p. 963-71.
201. Svaren, J., et al., *NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3545-53.
202. Chavrier, P., et al., *A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells*. EMBO J, 1988. **7**(1): p. 29-35.
203. Christy, B. and D. Nathans, *DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8737-41.
204. Gashler, A. and V.P. Sukhatme, *Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1995. **50**: p. 191-224.
205. Silverman, E.S., et al., *cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1)*. Biochem J, 1998. **336** (Pt 1): p. 183-9.
206. Swirnoff, A.H., et al., *Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 512-24.
207. Yan, S.F., et al., *Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15030-40.
208. Nishi, H., K.H. Nishi, and A.C. Johnson, *Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 827-34.
209. Hallahan, D.E., et al., *C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30303-9.
210. Khachigian, L.M., A.J. Williams, and T. Collins, *Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27679-86.
211. Kramer, B., et al., *Characterization of an Krox-24/Egr-1-responsive element in the human tumor necrosis factor promoter*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1219**(2): p. 413-21.
212. Thigpen, A.E., et al., *Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma*. J Urol, 1996. **155**(3): p. 975-81.
213. Krones-Herzig, A., et al., *Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5133-43.
214. Skerka, C., E.L. Decker, and P.F. Zipfel, *A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22500-6.
215. Silins, G., et al., *Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(2): p. 413-8.
216. Mechtcheriakova, D., et al., *Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3811-23.
217. Beckmann, A.M. and P.A. Wilce, *Egr transcription factors in the nervous system*. Neurochem Int, 1997. **31**(4): p. 477-510; discussion 517-6.

218. Lee, S.L., et al., *Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1)*. Science, 1996. **273**(5279): p. 1219-21.
219. Topilko, P., et al., *Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(1): p. 107-22.
220. Jones, M.W., et al., *A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories*. Nat Neurosci, 2001. **4**(3): p. 289-96.
221. Liao, Y., et al., *Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43107-16.
222. Ning, W., et al., *Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14895-900.
223. Chen, Z.H., et al., *Identifying targets for COPD treatment through gene expression analyses*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2008. **3**(3): p. 359-70.
224. Reynolds, P.R., M.G. Cosio, and J.R. Hoidal, *Cigarette smoke-induced Egr-1 upregulates proinflammatory cytokines in pulmonary epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(3): p. 314-9.
225. Ngiam, N., M. Post, and B.P. Kavanagh, *Early growth response factor-1 in acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(5): p. L1089-91.
226. Yan, S.F., et al., *Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1355-61.
227. Copland, I.B. and M. Post, *Stretch-activated signaling pathways responsible for early response gene expression in fetal lung epithelial cells*. J Cell Physiol, 2007. **210**(1): p. 133-43.
228. Schäfer, C., *Nobelpreis Medizin 2007*. Der Unfallchirurg, 2007. **110**: p. 1082-1084.
229. Hall, B., A. Limate, and A.B. Kulkarni, *Overview: generation of gene knockout mice*. Curr Protoc Cell Biol, 2009. **Chapter 19**: p. Unit 19 12 19 12 1-17.
230. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
231. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
232. Lederberg, J., *Gene Recombination and Linked Segregations in Escherichia Coli*. Genetics, 1947. **32**(5): p. 505-25.
233. Mortensen, R., *Overview of gene targeting by homologous recombination*. Curr Protoc Neurosci, 2007. **Chapter 4**: p. Unit 4 29.
234. Capecchi, M.R., *Targeted gene replacement*. Sci Am, 1994. **270**(3): p. 52-9.
235. Forsberg, E., et al., *Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6594-9.
236. Thiesse, J., et al., *Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(6): p. 1960-8.
237. Schäfer, T., *Untersuchung zur Proliferation verschiedener Zelltypen während postnataler und Post-Pneumektomie-Alveolarisierung in der C57Bl6/J – Maus in Max-Planck Institut für Herz- und Lungenforschung*. 2010: Bad Nauheim.
238. Scherle, W., *A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology*. Mikroskopie, 1970. **26**(1): p. 57-60.
239. Bolender, R.P., D.M. Hyde, and R.T. Dehoff, *Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell, and molecular biology*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 1): p. L521-48.
240. Cruz-Orive, L.M. and E.R. Weibel, *Recent stereological methods for cell biology: a brief survey*. Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 1): p. L148-56.
241. Gundersen, H.J. and R. Osterby, *Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'*. J Microsc, 1981. **121**(Pt 1): p. 65-73.
242. Hsia, C.C., et al., *An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure*. Am J Respir Crit Care Med. **181**(4): p. 394-418.

243. Mayhew, T.M., *The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs*. Exp Physiol, 1991. **76**(5): p. 639-65.
244. Boyce, R.W., et al., *Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number*. Toxicol Pathol. **38**(7): p. 1011-25.
245. C.V. Howard, M.R., *Unbiased Stereology - Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 2 ed. 2005: BIOS Scientific Publishers.
246. West, M.J., *New stereological methods for counting neurons*. Neurobiol Aging, 1993. **14**(4): p. 275-85.
247. Sterio, D.C., *The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector*. J Microsc, 1984. **134**(Pt 2): p. 127-36.
248. WICKSELL, S.D., *THE CORPUSCLE PROBLEM. A MATHEMATICAL STUDY OF A BIOMETRIC PROBLEM*. Biometrika, 1925. **17**(1-2): p. 84-99.
249. Gundersen, H.J., et al., *The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis*. APMIS, 1988. **96**(10): p. 857-81.
250. Mühlhardt, C., *Der Experimentator "Molekularbiologie/ Genomics"*. 2006: Elsevier GmbH.
251. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
252. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
253. Werner Luttmann, K.B., Michael Küpper, Daniel Myrtek, *Der Experimentator Immunologie*. Vol. 3. 2009: Spektrum akademischer Verlag.
254. Ramirez, F., *Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction*. Matrix Biol, 2000. **19**(6): p. 455-6.
255. Willet, K.E., et al., *Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep*. Pediatr Res, 1999. **45**(5 Pt 1): p. 615-25.
256. McGowan, S., et al., *Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(2): p. 162-7.
257. Lau, M., et al., *Long-term failure of alveologenesis after an early short-term exposure to a PDGF-receptor antagonist*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(4): p. L534-47.
258. Mariani, T.J., J.J. Reed, and S.D. Shapiro, *Expression Profiling of the Developing Mouse Lung*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2002. **26**(5): p. 541-548.
259. Talhouk, R.S., M.J. Bissell, and Z. Werb, *Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution*. J Cell Biol, 1992. **118**(5): p. 1271-82.
260. Talhouk, R.S., et al., *Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture*. Development, 1991. **112**(2): p. 439-49.
261. Hedin, U., J. Holm, and G.K. Hansson, *Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype*. Am J Pathol, 1991. **139**(3): p. 649-56.
262. Gomis-Ruth, F.X., et al., *Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 77-81.
263. Stula, M., et al., *Influence of sustained mechanical stress on Egr-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells*. Mol Cell Biochem, 2000. **210**(1-2): p. 101-8.
264. Morawietz, H., et al., *Rapid Induction and Translocation of Egr-1 in Response to Mechanical Strain in Vascular Smooth Muscle Cells*. Circulation Research, 1999. **84**(6): p. 678-687.
265. Wu, X., et al., *Mechano-Sensitive Transcriptional Factor Egr-1 Regulates Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Expression and Contributes to Neointima Formation in Vein Grafts*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009. **30**(3): p. 471-476.

266. Kuang, P.P., et al., *Activation of elastin transcription by transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(4): p. L944-52.
267. Massaro, G.D., et al., *Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(2): p. L305-9.
268. Kaza, A.K., et al., *Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. I120-4.
269. Kaza, A.K., et al., *Epidermal growth factor receptor up-regulation is associated with lung growth after lobectomy*. Ann Thorac Surg, 2001. **72**(2): p. 380-5.
270. McMurtry, I.F., *Introduction: pre- and postnatal lung development, maturation, and plasticity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(3): p. L341-4.
271. Sakamaki, Y., et al., *Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 525-33.
272. Krause, A., et al., *Overexpression of sonic Hedgehog in the lung mimics the effect of lung injury and compensatory lung growth on pulmonary Sca-1 and CD34 positive cells*. Mol Ther, 2010. **18**(2): p. 404-12.
273. Ritz-Timme, S., I. Laumeier, and M.J. Collins, *Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin*. Br J Dermatol, 2003. **149**(5): p. 951-9.
274. Bland, R.D., et al., *Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment*. Biol Neonate, 2003. **84**(1): p. 101-2.
275. Hsia, C.C. and R.L. Johnson, Jr., *Further examination of alveolar septal adaptation to left pneumonectomy in the adult lung*. Respir Physiol Neurobiol, 2006. **151**(2-3): p. 167-77.
276. Callewaert, B., et al., *New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations*. Hum Mutat, 2011. **32**(4): p. 445-55.
277. Sugitani, H., et al., *Alternative splicing and tissue-specific elastin misassembly act as biological modifiers of human elastin gene frameshift mutations associated with dominant cutis laxa*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 22055-67.
278. Sato, F., et al., *The characteristics of elastic fiber assembled with recombinant tropoelastin isoform*. Clin Biochem, 2006. **39**(7): p. 746-53.
279. Robb, B.W., et al., *Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3595-605.
280. Kajikawa, K., et al., *An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid*. J Electron Microsc (Tokyo), 1975. **24**(4): p. 287-9.
281. McLean, S.E., Mecham, B.H., Kelleher, C.M., Mariani, T.J., and Mecham, R.P., *Extracellular Matrix Gene Expression in Developing Mouse Aorta*. Extracellular Matrices and Development, Advances in Developmental Biology 15:82-128, 2005.
282. Masumoto, K., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during normal human pulmonary development*. Histopathology, 2005. **47**(4): p. 410-9.
283. Lemke, R.P., et al., *Expression and activity of matrix metallo proteinases 2 and 9 and their inhibitors in rat lungs during the perinatal period and in diaphragmatic hernia*. Exp Lung Res, 2003. **29**(4): p. 261-76.
284. Buckley, S. and D. Warburton, *Dynamics of metalloproteinase-2 and -9, TGF-beta, and uPA activities during normoxic vs. hyperoxic alveolarization*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L747-54.
285. Fukuda, Y., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L555-61.
286. Fukuda, Y., V.J. Ferrans, and R.G. Crystal, *The development of alveolar septa in fetal sheep lung. An ultrastructural and immunohistochemical study*. Am J Anat, 1983. **167**(4): p. 405-39.
287. Churg, A., M. Cosio, and J.L. Wright, *Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(4): p. L612-31.

288. Russell, R.E., et al., *Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L867-73.
289. Russell, R.E., et al., *Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 602-9.
290. Vernooy, J.H., et al., *Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD*. Chest, 2004. **126**(6): p. 1802-10.
291. Betsuyaku, T., et al., *Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 525-35.
292. Warburton, D., et al., *Do lung remodeling, repair, and regeneration recapitulate respiratory ontogeny?* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S59-62.
293. Jones, P.L., et al., *Altered hemodynamics controls matrix metalloproteinase activity and tenascin-C expression in neonatal pig lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(1): p. L26-35.
294. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
295. Danan, C., et al., *Gelatinase activities in the airways of premature infants and development of bronchopulmonary dysplasia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L1086-93.
296. Jakkula, M., et al., *Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L600-7.
297. Manoury, B., et al., *TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin in mouse lung*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006. **19**(3): p. 471-87.
298. Kim, K.H., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(3): p. 271-9.
299. Ikonomidis, J.S., et al., *Effects of deletion of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 gene on the progression of murine thoracic aortic aneurysms*. Circulation, 2004. **110**(11 Suppl 1): p. II268-73.
300. Eskandari, M.K., et al., *Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice*. J Surg Res, 2005. **123**(2): p. 289-93.
301. Sands, M.F., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 modulates allergic lung inflammation in murine asthma*. Clin Immunol, 2009. **130**(2): p. 186-98.
302. Greville, H.W., et al., *Mechanism of reduced maximum expiratory flow in dogs with compensatory lung growth*. J Appl Physiol (1985), 1986. **60**(2): p. 441-8.
303. Stevenson, T.J., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates matrix metalloproteinase activity during newt limb regeneration*. Dev Dyn, 2006. **235**(3): p. 606-16.
304. Nolan, A., et al., *MMP-2 and TIMP-1 predict healing of WTC-lung injury in New York City firefighters*. Respir Res, 2014. **15**: p. 5.
305. Taube, M.E., et al., *TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein*. Oncogene, 2006. **25**(21): p. 3041-8.
306. Bertaux, B., et al., *Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(4): p. 679-85.
307. Hayakawa, T., et al., *Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum*. FEBS Lett, 1992. **298**(1): p. 29-32.
308. Guedez, L., et al., *In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 2002-10.
309. Li, G., R. Fridman, and H.R. Kim, *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6267-75.
310. Imanaka-Yoshida, K., et al., *Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction*. Lab Invest, 2001. **81**(7): p. 1015-24.

311. Imanaka-Yoshida, K., et al., *Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis*. J Pathol, 2002. **197**(3): p. 388-94.
312. Fassler, R., et al., *Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice*. Exp Cell Res, 1996. **222**(1): p. 111-6.
313. Chiquet, M., et al., *How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?* Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 73-80.
314. Festing, M.F., et al., *Revised nomenclature for strain 129 mice*. Mamm Genome, 1999. **10**(8): p. 836.
315. Festing, M.F. and G.L. Wolff, *Re: Inbred strains of laboratory animals: superior to outbred mice?* J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(22): p. 1715-6.
316. Festing, M.F., *Inbred mice in research*. Nature, 1969. **221**(5182): p. 716.
317. Morris, A., et al., *Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **327**(3): p. 851-62.
318. Hackstein, H., et al., *Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains*. Respir Res, 2012. **13**: p. 94.
319. Wilson, K.R., et al., *Defect in early lung defence against Pseudomonas aeruginosa in DBA/2 mice is associated with acute inflammatory lung injury and reduced bactericidal activity in naive macrophages*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 4): p. 968-79.
320. Nadziejko, C., et al., *Susceptibility to pulmonary hypertension in inbred strains of mice exposed to cigarette smoke*. J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(5): p. 1780-5.
321. Brass, D.M., S.Y. Tsai, and A.R. Brody, *Primary lung fibroblasts from the 129 mouse strain exhibit reduced growth factor responsiveness in vitro*. Exp Lung Res, 2001. **27**(8): p. 639-53.
322. Catterton, W.Z., et al., *Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits*. Pediatr Res, 1979. **13**(2): p. 104-8.
323. Kaza, A.K., et al., *Epidermal growth factor augments postpneumectomy lung growth*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **120**(5): p. 916-21.
324. Miettinen, P.J., et al., *Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor*. Dev Biol, 1997. **186**(2): p. 224-36.
325. Sibililia, M. and E.F. Wagner, *Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor*. Science, 1995. **269**(5221): p. 234-8.
326. DeLigio, J.T. and D.A. Zorio, *Early growth response 1 (EGR1): a gene with as many names as biological functions*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(20): p. 1889-92.
327. Adamson, E.D. and D. Mercola, *Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival*. Tumour Biol, 2002. **23**(2): p. 93-102.
328. Pagel, J.I. and E. Deindl, *Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades*. Indian J Biochem Biophys, 2011. **48**(4): p. 226-35.
329. Eto, K., V. Kaur, and M.K. Thomas, *Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 5973-83.
330. Hasan, R.N. and A.I. Schafer, *Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF-kappaB*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 42-50.
331. Chu, L., et al., *Activation of Egr-1 in human lung epithelial cells exposed to silica through MAPKs signaling pathways*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68943.
332. Haber, B.A., et al., *Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1319-26.
333. Mueller, L., et al., *The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow*. J Hepatol, 2002. **37**(5): p. 606-12.
334. Peng, Y., et al., *Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4513-20.
335. Cressman, D.E., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1379-83.

336. Lee, F.Y., et al., *Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver*. *Hepatology*, 1999. **29**(3): p. 677-87.
337. Rudnick, D.A., D.H. Perlmutter, and L.J. Muglia, *Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8885-90.
338. Talarmin, H., et al., *The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(9): p. 6003-11.
339. Morawietz, H., et al., *Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1999. **84**(6): p. 678-87.
340. Tremblay, L., et al., *Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(5): p. 944-52.
341. Vlahakis, N.E., et al., *Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L167-73.
342. Altemeier, W.A., et al., *Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(3): p. L533-42.
343. Taniguchi, L.U., et al., *Cytoskeleton and mechanotransduction in the pathophysiology of ventilator-induced lung injury*. *J Bras Pneumol*, 2010. **36**(3): p. 363-71.
344. Kumar, A. and A.M. Boriek, *Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy*. *FASEB J*, 2003. **17**(3): p. 386-96.
345. Tsai-Morris, C.H., X.M. Cao, and V.P. Sukhatme, *5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(18): p. 8835-46.
346. Schwachtgen, J.L., et al., *Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(11): p. 2540-9.
347. Yang, Y., et al., *Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(11): p. 1321-30.
348. Pacini, L., et al., *Altered calcium regulation in isolated cardiomyocytes from Egr-1 knock-out mice*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013. **91**(12): p. 1135-42.
349. Yan, S.F., et al., *Protein kinase C-beta and oxygen deprivation. A novel Egr-1-dependent pathway for fibrin deposition in hypoxemic vasculature*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 11921-8.
350. Cramer, T., et al., *Gastrin transactivates the chromogranin A gene through MEK-1/ERK- and PKC-dependent phosphorylation of Sp1 and CREB*. *Cell Signal*, 2008. **20**(1): p. 60-72.
351. Aicher, W.K., et al., *Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(2): p. 348-59.
352. Hinz, B., *Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis*. *Curr Rheumatol Rep*, 2009. **11**(2): p. 120-6.
353. Gutierrez, J.A. and H.A. Perr, *Mechanical stretch modulates TGF-beta1 and alpha1(I) collagen expression in fetal human intestinal smooth muscle cells*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(5 Pt 1): p. G1074-80.
354. Tong, Z., et al., *Dynamic Vibration Cooperates with Connective Tissue Growth Factor to Modulate Stem Cell Behaviors*. *Tissue Eng Part A*, 2014.
355. Lambert Ch, A., B.V. Nusgens, and M. Lapiere Ch, *Mechano-sensing and mechano-reaction of soft connective tissue cells*. *Adv Space Res*, 1998. **21**(8-9): p. 1081-91.

356. Hernandez, M.R., et al., *Hydrostatic pressure stimulates synthesis of elastin in cultured optic nerve head astrocytes*. *Glia*, 2000. **32**(2): p. 122-36.
357. Comper, W.D., *Extracellular Matrix*. Vol. 2. 1996: Harwood-Academic Publishers.
358. Marigo, V., et al., *Identification of a TGF-beta responsive element in the human elastin promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(2): p. 1049-56.
359. Bashir, M.M., et al., *Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(15): p. 8887-91.
360. Khachigian, L.M. and T. Collins, *Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium*. *Circ Res*, 1997. **81**(4): p. 457-61.
361. Silverman, E.S. and T. Collins, *Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(3): p. 665-70.
362. Bryant, M., et al., *Tissue repair with a therapeutic transcription factor*. *Hum Gene Ther*, 2000. **11**(15): p. 2143-58.
363. Guerquin, M.J., et al., *Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3564-76.
364. Lee, C.G., et al., *Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis*. *J Exp Med*, 2004. **200**(3): p. 377-89.
365. Lee, Y.S., et al., *Adenoviral-mediated delivery of early growth response factor-1 gene increases tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia*. *Mol Ther*, 2005. **12**(2): p. 328-36.
366. Chiquet-Ehrismann, R., *Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix*. *Curr Opin Cell Biol*, 1991. **3**(5): p. 800-4.
367. Suga, A., et al., *Significant role of bone marrow-derived cells in compensatory regenerative lung growth*. *J Surg Res*, 2012. **183**(1): p. 84-90.
368. Zimmerman, S.M. and S.K. Kim, *The GATA transcription factor/MTA-1 homolog egr-1 promotes longevity and stress resistance in Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2014. **13**(2): p. 329-39.
369. Alagappan, D., et al., *Egr-1 is a critical regulator of EGF-receptor-mediated expansion of subventricular zone neural stem cells and progenitors during recovery from hypoxia-hypoglycemia*. *ASN Neuro*, 2013. **5**(3): p. 183-93.
370. Fausto, N., A.D. Laird, and E.M. Webber, *Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration*. *FASEB J*, 1995. **9**(15): p. 1527-36.
371. Ravikumar, P., et al., *Defining a Stimuli-Response Relationship in Compensatory Lung Growth Following Major Resection*. *J Appl Physiol (1985)*, 2014.
372. Bruder, H.A., *Forschung führt nicht nur zu neuen Erkenntnissen, sondern auch zur Festigung alter Irrtümer*. 1996, Frieling Verlag Berlin.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: schematische Darstellung der Lunge	16
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der fünf Phasen der Lungenentwicklung und ihre zeitliche Abfolge bei Mensch und Maus.....	21
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der klassischen Alveolarisierung und der späten Alveolarisierung	24
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Einflusses der physiologischen Reserve und des kompensatorischen Lungenwachstums auf die Diffusionskapazität der Lunge.	27
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Extrazellulärmatrix und deren Verbindung mit der Zellmembran.....	32
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Komponenten elastischer Fasern und Helferproteine für deren Assemblierung	35
Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des Narkosesystems.....	67
Abbildung 3.2 Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für molekularbiologische Expressionsanalysen an Wildtypmäusen	69
Abbildung 3.3: Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für stereologische Analysen an Wildtyp- und Egr1 bzw. TnC Knockout-Mäusen.....	70
Abbildung 3.4: Untersuchungsgruppen und Untersuchungszeitpunkte für stereologische Analysen an Wildtyp- und Timp1 Knockout-Mäusen.....	71
Abbildung 3.5: Prozessierung der Lungen für stereologische Analysen	78
Abbildung 3.6: geometrische Testfelder zur Analyse struktureller Parameter.....	80
Abbildung 3.7: projizierte Testlinien zur Bestimmung der alveolaren Oberfläche	82
Abbildung 3.8: Zählrahmen, physikalischer Disector und Beispiel	84
Abbildung 3.9: mechanischer Stimulator für Zellkulturexperimente mit eingesetzter Zellkulturplatte mit flexiblem Boden	100
Abbildung 4.1: mRNA-Expression von Elastin und Fibrillin 1 in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen	107
Abbildung 4.2: mRNA-Expression von ausgewählten Assemblierungsfaktoren elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen.....	109
Abbildung 4.3: Aktivität von MMP 9 und MMP 2 während des kompensatorischen Lungenwachstums.....	112

Abbildung 4.4: mRNA-Expression von MMP 9, Timp1 und TnC in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen	113
Abbildung 4.5: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten Timp1 Knockout- und Wildtypmäusen	115
Abbildung 4.6: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/sham-operierten Timp1 ^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen	117
Abbildung 4.7: Messung der Lungenfunktion bei Timp1 ^{-/-} und Wildtyptieren	118
Abbildung 4.8: Einfluss eines Verlustes bzw. Stimulation auf die Zellzahl von primären Fibroblasten und SAEC-Zellen.....	120
Abbildung 4.9: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten TnC ^{-/-} und Wildtypmäusen.....	121
Abbildung 4.10: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/ sham-operierten TnC ^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen	123
Abbildung 4.11: Messung der Lungenfunktion bei TnC ^{-/-} und Wildtyptieren	125
Abbildung 4.12: Einfluss mechanischer Dehnung auf die mRNA-Expression in primären Fibroblasten.....	127
Abbildung 4.13: mRNA-Expression von Egr1 bei frühen Phasen nach dem operativen Eingriff in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen	128
Abbildung 4.14: mRNA-Expression von Egr1 in Lungenhomogenat von pneumonektomierten/sham-operierten Mäusen.....	129
Abbildung 4.15: mRNA-Expression von Egr1 und TnC bei frühen Phasen der Alveolarisierung in Lungenhomogenat von postnatalen Mäusen	130
Abbildung 4.16: Einfluss mechanischer Dehnung auf die mRNA-Expression in primären Egr1 ^{-/-} Fibroblasten.....	131
Abbildung 4.17: mRNA-Expression von Elastin in Tgfβ-stimulierten primären Wildtyp- und Egr1 ^{-/-} Fibroblasten.....	132
Abbildung 4.18: Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse von Bestandteilen elastischer Fasern in Egr1 ^{-/-} und Wildtypmäusen	133
Abbildung 4.19: Vergleichende mRNA-Expressionsanalyse von TnC und Timp1 in Egr1 ^{-/-} und Wildtypmäusen.....	134
Abbildung 4.20: Analyse des Lungenvolumens und der alveolaren Oberfläche bei pneumonektomierten/sham-operierten Egr1 ^{-/-} Mäusen und Wildtypmäusen	136

Abbildung 4.21: Analyse der alveolaren Anzahl und der alveolaren Septendicke bei pneumonektomierten/sham-operierten Egr1 ^{-/-} und Wildtypmäusen.....	138
Abbildung 11.1: mRNA-Expression von Assemblierungsfaktoren und weiterer Bestandteile elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen.....	194
Abbildung 11.2: mRNA-Expression der Enzyme für die Verknüpfung elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen.....	195
Abbildung 11.3: Gelbild einer Genotypisierung der Egr1 ko Mauslinie.....	197
Abbildung 11.4: Gelbild einer Genotypisierung der Timp1 knockout Mauslinie	197
Abbildung 11.5: Gelbild einer Genotypisierung der TnC knockout Mauslinie.....	198

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: . Faktoren und deren Korrelation mit dem kompensatorischen Lungenwachstums	30
Tabelle 2.2: Mitglieder der MMP Familie	37
Tabelle 3.1: verwendete Laborgeräte	48
Tabelle 3.2: verwendete Chemikalien	52
Tabelle 3.3: verwendete Laborbedarfsartikel	53
Tabelle 3.4: verwendete Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka	55
Tabelle 3.5: verwendete Medien, Lösungen, Zelllinien und Medienzusätze für Zellkulturuntersuchungen	58
Tabelle 3.6: verwendete Kits und Standards für molekularbiologische Untersuchungen	59
Tabelle 3.7: Sequenzen der verwendeten Primer für Analysen muriner mRNA	59
Tabelle 3.8: Sequenzen der Primer für Genotypisierungen	62
Tabelle 3.9: verwendete Versuchstiere	63
Tabelle 3.10: mögliche Genotypen nach der Verpaarung eines heterozygoten Egr1 ko-Weibchens (Egr1 ^{+/-}) mit einem heterozygoten Egr1 ko-Männchen	65
Tabelle 3.11: mögliche Genotypen nach der Verpaarung eines heterozygoten Timp1 ko-Weibchen (XX ^{Timp1-}) mit einem hemizygoten Timp1 ko-Männchen	65
Tabelle 3.12: Abfolge der respiratorischen Manöver zur Lungenfunktionsmessung	73
Tabelle 3.13: Färbeprotokoll der Elastika-Färbung an Mauslungengewebe	79
Tabelle 3.14: Ansetzen der Resorcin-Fuchsin-Färbelösung	79
Tabelle 3.15: Puffer und Lösungen für die Isolation von Mauslungen	85
Tabelle 3.16: Reaktionsansatz für eine reverse Transkription	87
Tabelle 3.17: Zyklen-Protokoll einer Reverse Transkription	87
Tabelle 3.18: Puffer und Lösungen für die Isolation von DNA	89
Tabelle 3.19: Reaktionsansatz für eine Egr1 Knockout-Genotypisierungs-PCR	89
Tabelle 3.20: Zyklen-Protokoll einer Egr1 Knockout-Genotypisierungs-PCR	90
Tabelle 3.21: Anzahl/ Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp	90
Tabelle 3.22: Reaktionsansatz für eine Timp1 Knockout-Genotypisierungs-PCR	91
Tabelle 3.23: Zyklen-Protokoll einer Timp1 Knockout-Genotypisierungs-PCR	91
Tabelle 3.24: Anzahl/ Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp	91
Tabelle 3.25: Reaktionsansatz für eine TnC Genotypisierungs-PCR Wildtyp-Ansatz	92
Tabelle 3.26: Zyklen-Protokoll einer TnC Knockout/Wildtyp Genotypisierungs-PCR	92
Tabelle 3.27: Anzahl/ Größe der erwarteten Banden und der entsprechende Genotyp	93
Tabelle 3.28: Reaktionsansatz einer qRT-PCR	95
Tabelle 3.29: Zyklenprotokoll einer qRT-PCR	95

Tabelle 3.30: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	97
Tabelle 3.31: Zusammensetzung der Gele für Zymographie	102
Tabelle 3.32: Puffer und Lösungen für Zymographie	103

11 Anhang

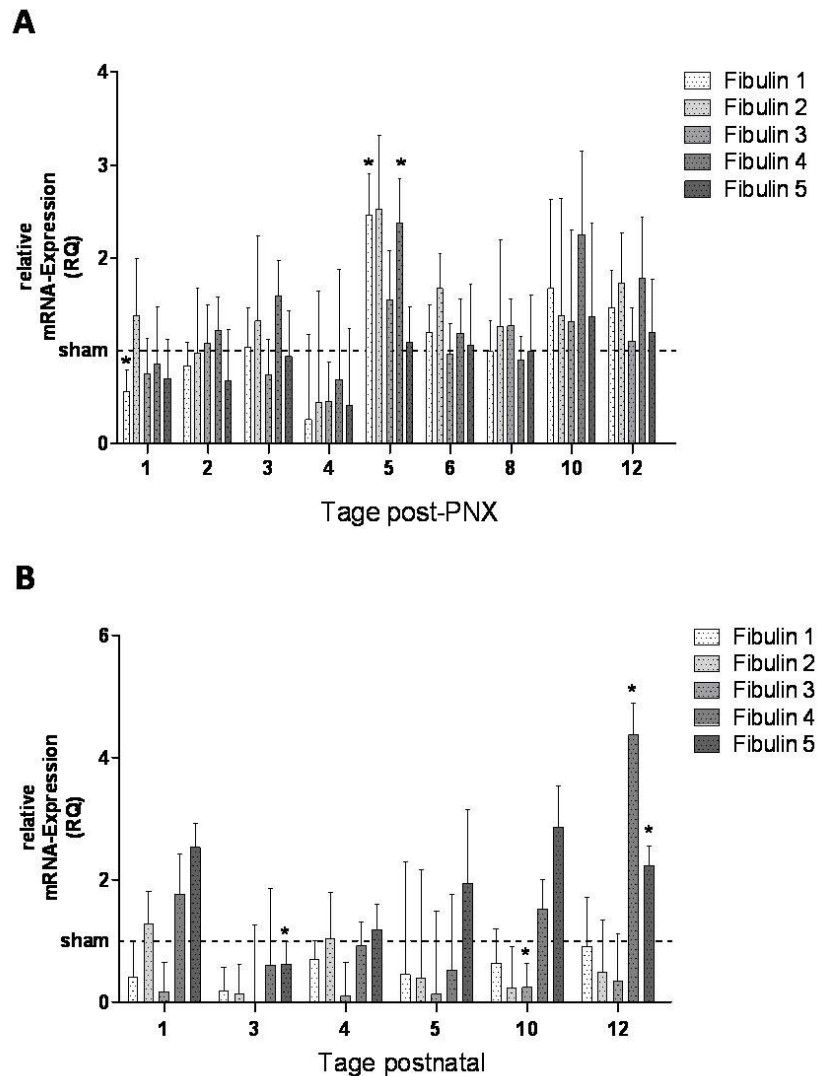


Abbildung 11.1: mRNA-Expression von Assemblierungsfaktoren und weiterer Bestandteile elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen

A) Die rechte Lunge wurde aus Mäusen an Tag postnatal 1, 3, 4, 5, 8, 10 und 12 isoliert und die mRNA Expression von Fibulin 1-5 via qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente Lungenhomogenat aus den rechten Lungen adulter Mäuse (10 Wochen). PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (postnatal/ adult) wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in adulten Tieren (adult: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. adulte Tiere).

B) Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1-6, 10 und 12 nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. die rechte Lunge isoliert und die mRNA Expression von Fibulin 1-5 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/ sham) wurden 4-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere).

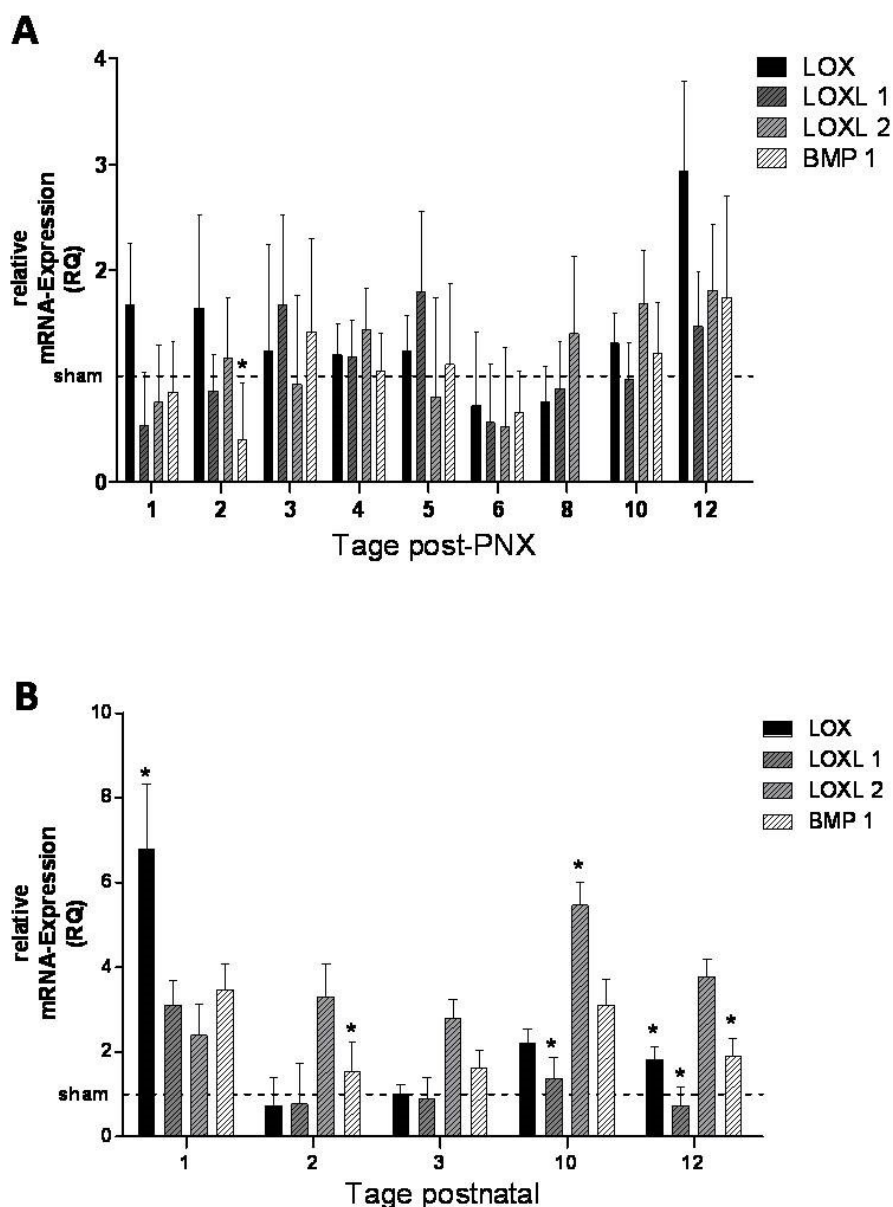


Abbildung 11.2: mRNA-Expression der Enzyme für die Verknüpfung elastischer Fasern in Lungenhomogenat von postnatalen/ adulten Mäusen und pneumonektomierten/ sham-operierten Mäusen

A) Die rechte Lunge wurde aus Mäusen an Tag postnatal 1, 2, 3, 10 und 12 isoliert und die mRNA Expression von LOX, LOXL 1, LOXL 2 und deren Aktivator BMP 1 via qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente Lungenhomogenat aus den rechten Lungen adulter Mäuse (10 Wochen). PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (postnatal/ adult) wurden 3-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die entsprechende mRNA-Menge in adulten Tieren (adult: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. adulte Tiere).

B) Adulte Mäuse (10 Wochen) wurden pneumonektomiert oder als Kontrolle sham-operiert. 1-6, 8, 10 und 12 nach dem Eingriff wurde die verbliebene bzw. die rechte Lunge isoliert und die mRNA Expression von LOX, LOXL 1, LOXL 2 und deren Aktivator BMP 1 via qRT-PCR bestimmt. PBGD diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe (PNX/ sham) wurden 4-5 Tiere analysiert. Abgebildet sind die MW + SD der relativen mRNA-Menge der analysierten Gene (RQ; relative Quantität) in Bezug auf die

*entsprechende mRNA-Menge in sham-operierten Tieren (sham: RQ = 1; *: $p < 0,05$ vs. sham-operierte Tiere)*

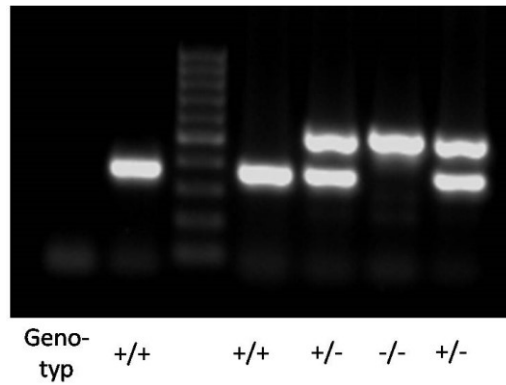


Abbildung 11.3: Gelbild einer Genotypisierung der Egr1 ko Mauslinie

Nach der spezifischen Genotypisierungs-PCR konnte anhand der Anwesenheit eines DNA-Fragmentes bestimmter Größe, der Genotyp der Tiere bestimmt werden: Wildtyp (+/+) = DNA Fragmente mit einer Größe von 360 bp; heterozygote Deletion des Gens für Egr1 (+/-) = DNA Fragmente mit einer Größe von 360 bp und 520 bp; homozygote Deletion des Gens für Egr1 (-/-) = DNA Fragmente mit einer Größe von 360 bp.

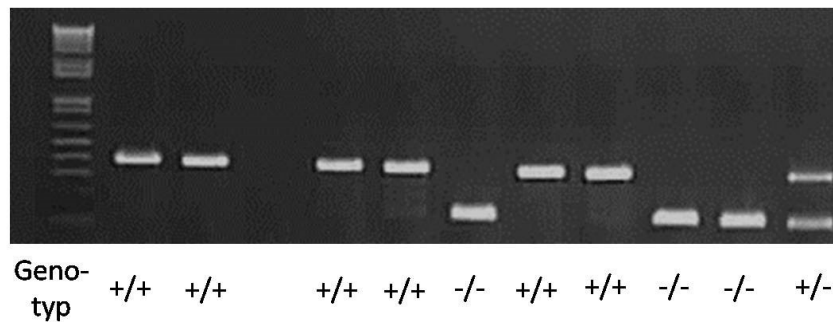


Abbildung 11.4: Gelbild einer Genotypisierung der Timp1 knockout Mauslinie

Nach der spezifischen Genotypisierungs-PCR konnte anhand der Anwesenheit DNA-Fragmente bestimmter Größe der Genotyp der Tiere bestimmt werden: Wildtyp (+/+) = DNA Fragmente mit einer Größe von 393 bp; heterozygote Deletion des Gens für Timp1 (+/-) = DNA Fragmente mit einer Größe von 393 bp und 200 bp; homozygote/hemizygoten Deletion des Gens für Timp1 (-/-) = DNA Fragmente mit einer Größe von 200 bp.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Peter Michael Rauschkolb, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, _____

Peter Rauschkolb

13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und auf diese Weise mit an dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Herr Prof. Werner Seeger danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Robert Voswinckel und Herrn Dr. Rory E. Morty für ihre Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Ideen und Anregungen sowie deren Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan für die Unterstützung als Betreuer aus der Biologie.

Ein ganz besonderer Dank gilt Uta Eule, Diana Fuchs, Dr. Kirsten Murmann, Dr. Wiebke Janssen und Dr. Jens-Christian Wolff PhD für die vielen Gespräche, hilfreichen Anregungen sowie für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Dieser Dank gilt auch allen weiteren Kollegen der AG Seeger/Voswinckel/Morty.

Ferner möchte ich mich bei Jeanine D'Armiento, M.D., PhD., Piotr Sklepkiwicz und der gesamten D'Armiento workgroup für die Betreuung während meines Laboraufenthalts in New York bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegern des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Nochmals Dr. Alexandra Pichl, Dr. Wiebke Janssen und Dr. Kirsten Murmann für die vielen wertvollen Ratschläge beim Schreiben meiner Arbeit sowie Kosta Maglaras für das Korrekturlesen.

Mein größter Dank, für den es keine Worte gibt, gilt Dr. Alexandra Pichl, meiner Familie und Freunden für ihre liebevolle und fortwährende Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht haben, sowie für das Verständnis während dieser Zeit.

14 Lebenslauf

15 wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen

“17 β -estradiol replacement reverses age-related lung disease in estrogen deficient C57BL/6J mice”

Endocrinology. 2014 Feb; 155(2):441-8. doi: 10.1210/en.2013-1345. Epub 2013 Nov 25

“Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes”

Biochem Pharmacol, 2010 Mar 1; 79 (5): 722-32

“Effects of nitroglycerin- or pentaerythryl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts – evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects”

Physiological Genomics, 2009 Jul 9; 38 (2):176-185.

Auszeichnungen

MBML Student Examination Travel Award 2010

MBML Student Examination Travel Award 2011

MBML Travel Award 2012

“Young Investigator Award” DGIM 2013 - Pneumologie

MLC Travel Award 2013

DZL Poster Award 2013

erfolgreicher Abschluss des internationalen Graduiertenprogramms

“Molecular Biology and Medicine of the Lung” (MBML)

erfolgreicher Abschluss des internationalen Graduiertenprogramms

“International Max Planck Research School” (IMPRS)

Kongressbeiträge

Experimental Biology 2013, Boston (USA)

Poster

“Influence of Early Growth Response 1 (Egr1) & Tenascin C (Tnc) on compensatory lung growth”

Rauschkolb P.; Wolff JC.; Seeger W.; Voswinckel R.

Munich Lung Conference 2013 International DZL Symposium (Deutschland)

Poster

“Influence of Early Growth Response 1 (Egr1) & Tenascin C (Tnc) on compensatory lung growth”

Rauschkolb P.; Wolff JC.; Seeger W.; Voswinckel R.; Morty R.E.

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2013, Wiesbaden (Deutschland)

Präsentation & Poster

“Einfluss von Early Growth Response 1 (Egr1) & Tenascin C (TnC) auf das kompensatorische Lungenwachstum

Rauschkolb P.; Wolff JC.; Seeger W.; Voswinckel R.

MBML Retreat 2012, Rauschholzhausen, Deutschland

Präsentation

“Molecular mediators during compensatory lung growth”

American Thoracic Society International Conference 2012, San Francisco (USA)

Poster Discussion

“Influence of Early Growth Response 1 (Egr1) & Tenascin C (Tnc) on compensatory lung growth”

Rauschkolb P.; Wolff JC.; Seeger W.; Voswinckel R.

ECCPS Symposium 2011, Bad Nauheim (Deutschland)

Poster

“Elastic fiber assembly and mechanotransduction in lung growth/regeneration”

P. Rauschkolb; W. Seeger; R. Voswinckel

MBML Retreat 2011, Rauschholzhausen, Deutschland

Präsentation

“Elastic fiber assembly and initiation of compensatory lung growth ”

ECCPS Symposium 2010, Bad Nauheim (Deutschland)

Poster

“Elastic fiber assembly and mechanotransduction in lung growth/regeneration”

P. Rauschkolb; N. Weissmann; W. Seeger; R. Voswinckel

Poster

„Role of Wnt signaling in pulmonary regression and regeneration: epithelial tissue repair and endothelial angiogenesis”

M. Lehmann, P. Rauschkolb, F. T. Schneider, K. H. Plate, S. Liebner, R. Voswinckel