

Lokalisation und Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Lungenfibrose in der Maus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Annemarie Aue
aus Fritzlar

Würzburg 2018

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

1. Gutachter:

.....

2. Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Eidesstattliche Erklärung

nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Lokalisation und Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Lungenfibrose in der Maus**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Localization and importance of NO-sensitive guanylyl cyclase in a murine model of lung fibrosis**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den

.....

Annemarie Aue

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die NO/cGMP-Signalkaskade	1
1.2 NO-Synthese	1
1.3 NO-sensitive Guanylyl-Cyclase	4
1.4 Der Respirationstrakt des Menschen	5
1.4.1 Die Lunge der Maus	8
1.5 Interstitielle Lungenerkrankungen	8
1.6 Die idiopathische Lungenfibrose (IPF)	9
1.6.1 Pathogenese der IPF	10
1.6.2 Pathologische Merkmale der IPF	11
1.6.3 Myofibroblasten	12
1.6.4 Perizyten	15
1.7 Molekulare Mechanismen der Lungenfibrose	16
1.7.1 Die Rolle von TGF- β bei der Lungenfibrose	16
1.7.2 Die Rolle der NO/cGMP-Signalkaskade bei der Lungenfibrose	17
1.8 Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in der Maus	17
1.9 Transgene Mausmodelle	18
1.9.1 Globaler Knockout der NO-GC (GCKO)	19
1.9.2 Perizyten-spezifische Knockout-Mäuse der NO-GC	20
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Chemikalien	23
3.1.2 Antikörper für Immunhistochemie	23
3.1.3 Antikörper für Western Blot	24
3.1.4 Puffer und Lösungen	24
3.1.5 Geräte und Software	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Tiere und Präparation	27
3.2.1.1 Haltung und Zucht	27
3.2.1.2 Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und tdTomato-Reporterermäuse	29
3.2.1.3 Genotypisierung	29
3.2.2 Induktion der Lungenfibrose	29
3.2.3 Immunhistochemie	31
3.2.3.1 Präparation der Lungen	31
3.2.3.2 Immunhistochemische Analyse	32

3.2.4	Biochemische Untersuchungen der Lunge	33
3.2.4.1	Kollagen-Assay	33
3.2.5	Western Blot.....	34
3.2.5.1	Herstellung der Lungenhomogenate	34
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
3.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.2.5.4	Blotting.....	35
3.2.6	Statistik.....	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der Lunge.....	37
4.1.1	NO-GC-Expression in der Lunge	37
4.1.2	Deletion der NO-GC	40
4.1.3	Lokalisation der NO-GC in zellspezifischen Reporter-mäusen	43
4.2	Untersuchungen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose	49
4.2.1	Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in WT- und GCKO-Mäusen.....	49
4.2.2	Charakterisierung von Myofibroblasten-Subtypen.....	55
4.2.2.1	Lineage Tracing von Myofibroblasten in der Lungenfibrose.....	58
4.2.2.2	Kollagenproduktion	67
4.2.2.3	Auflösung der Lungenfibrose	67
5.	Diskussion	73
5.1	Das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose	73
5.2	Expression der NO-GC in Lungenperizyten	74
5.3	Beteiligung der NO-GC an der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose.....	76
5.4	Identifikation und Herkunft von Myofibroblasten.....	77
5.4.1	α -SMA als Marker für Myofibroblasten.....	77
5.4.2	Herkunft von Myofibroblasten	79
5.4.3	Differenzierung von zwei Myofibroblasten-Subtypen.....	81
5.4.4	Auflösung der Lungenfibrose	82
6.	Zusammenfassung	84
7.	Summary	85
8.	Literaturverzeichnis	87
9.	Eigene Publikationen	101
10.	Danksagung	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die NO/cGMP-Signalkaskade	3
Abbildung 2	Anatomie und Histologie des Respirationstrakts	7
Abbildung 3	Pathogenese und Pathologie der Lungenfibrose	14
Abbildung 4	Generierung der globalen und Perizyten-spezifischen Knockout-Mäuse	28
Abbildung 5	Generierung von zellspezifischen tdTomato-Reporterermäusen	30
Abbildung 6	Expression der NO-GC in der murinen Lunge.....	38
Abbildung 7	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der Lunge	39
Abbildung 8	Deletion der NO-GC in murinen Lungenperizyten.....	41
Abbildung 9	Promotor-spezifische Deletion der NO-GC in murinen Lungenperizyten.....	42
Abbildung 10	Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Zellen in der gesunden Lunge.....	44
Abbildung 11	Lineage Tracing von SMMHC-positiven Zellen in der gesunden Lunge.....	45
Abbildung 12	Lineage Tracing von NG2-positiven Zellen in der gesunden Lunge	46
Abbildung 13	Lineage Tracing von Tie2- und FoxD1-positiven Zellen in der gesunden Lunge.....	48
Abbildung 14	Bleomycin-induzierte Lungenfibrose der Maus	50
Abbildung 15	Kollageneinlagerung bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose der Maus	51
Abbildung 16	Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt	53
Abbildung 17	Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in An- und Abwesenheit von NO-GC.....	54
Abbildung 18	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der fibrotischen Lunge.....	56
Abbildung 19	Herkunft und Lokalisation von Myofibroblasten-Subtypen.....	57
Abbildung 20	Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten in der Bleomycin-behandelten Lunge.....	59
Abbildung 21	Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten während der Lungenfibrose.....	60
Abbildung 22	Identifizierung von unterschiedlichen Myofibroblasten-Populationen durch Lineage Tracing von Perizyten.....	62
Abbildung 23	Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in PDGFR β /tomato Reporterermäusen während der Lungenfibrose.....	63
Abbildung 24	Lineage Tracing von SMMHC- und NG2-positiven Perizyten während der Lungenfibrose.....	65
Abbildung 25	Lineage Tracing von Tie2-positiven Zellen während der Lungenfibrose.....	66
Abbildung 26	Expression von Fibrozyten Markern in der fibrotischen Lunge.....	68
Abbildung 27	Kollagenproduktion in der Bleomycin-behandelten Lunge.....	69
Abbildung 28	Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt 56 Tage nach Bleomycin-Behandlung.....	71
Abbildung 29	Auflösung fibrotischer Veränderungen der Lunge.....	72
Abbildung 30	Differenzierung von zwei Myofibroblasten-Subtypen.....	78

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	=	α -Glattmuskelaktin
ADP	=	Adenosindiphosphat
AECs	=	Alveolarepithelzellen
Ang	=	Angiopoietin
ARDS	=	akutes Atemnotsyndrom (<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>)
ATP	=	Adenosintri-phosphat
Bleo	=	Bleomycin
BR	=	Bronchiole
BV	=	Blutgefäß (<i>Blood Vain</i>)
cGMP	=	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	=	Kohlenstoffmonoxid
CreER ^{T2}	=	Cre-Rekombinase mit modifizierter Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne
CT	=	Computertomographie
DIC	=	<i>Differential Interference Contrast</i>
EDRF	=	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
eNOS	=	endotheliale NO-Synthase
EMT	=	epitheliale-mesenchymale Transition
EndoMT	=	endotheliale-mesenchymale Transition
EZM	=	Extrazellulärmatrix
Fe ²⁺	=	Eisen
FoxD1	=	<i>Forkhead Box D1</i>
GCKO	=	globaler Knockout der NO-sensitiven Guanylyl-Cyklase
GTP	=	Guanosintri-phosphat
ILDs	=	interstitielle Lungenerkrankungen (<i>Interstitial Lung Diseases</i>)
iNOS	=	induzierbare NO-Synthase
IPF	=	idiopathische Lungenfibrose (<i>Idiopathic Pulmonary Fibrosis</i>)
Mg ²⁺	=	Magnesium
MMPs	=	Matrixmetalloproteasen
NG2	=	<i>Neural/Glial Antigen 2</i>
N ₂	=	Stickstoff
nNOS	=	neuronale NO-Synthase
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
O ₂	=	Sauerstoff
ODQ	=	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
PDEs	=	Phosphodiesterasen
PDGFR β	=	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor β</i>
PKGs	=	Proteinkinasen
Pol	=	Polarisationsfilter
pGC	=	Peptid-aktivierte Guanylyl-Cyclase
SDS-PAGE	=	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMMHC	=	<i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
sGC	=	lösliche Guanylyl-Cyclase
TGF- β	=	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMPs	=	<i>Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteases</i>
TNF- α	=	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
w/v	=	Gewicht pro Volumen
WT	=	Wildtyp-Maus
v/v	=	Volumen pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Die NO/cGMP-Signalkaskade

Die NO/cGMP-Signalkaskade ist an der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse wie der Blutdruckregulation, der Thrombozytenaggregation und -adhäsion, sowie der synaptischen Plastizität beteiligt. Daneben spielt sie aber auch eine Rolle bei pathologischen Prozessen wie der Wundheilung, fibrotischen Veränderungen und bei der Entstehung von Krebserkrankungen (Abbildung 1). Der *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), der vom vaskulären Endothel freigesetzt wird und eine vasodilatatorische (gefäßerweiternde) Wirkung hat, wurde 1980 entdeckt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Erst einige Jahre später wurde gezeigt, dass es sich hierbei um Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Die endogene Produktion des freien Radikals wird von NO-Synthasen (NOS) katalysiert, die in verschiedenen Isoformen vorkommen. Der wichtigste Rezeptor für NO ist die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC). Die Bindung von NO führt zur Synthese des sekundären Botenstoffes cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Das Signalmolekül cGMP wiederum aktiviert verschiedene Effektormoleküle: (1) cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKGs), (2) cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs), (3) cGMP-regulierte Ionenkanäle (Lohmann *et al.*, 1997; Rybalkin *et al.*, 2003). Dadurch kommt es letztlich zur Relaxation der Gefäße (Schultz *et al.*, 1977; Groneberg *et al.*, 2010), Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (Bohme *et al.*, 1974; Haslam *et al.*, 1978; Mellion *et al.*, 1981; Walter und Gambaryan, 2004) und der Modulation der synaptischen Plastizität (Lu *et al.*, 1999). Bei pathologischen Prozessen wie der Fibrose in verschiedenen Organen führt die Stimulation der NO/cGMP-Signalkaskade zu einer verminderten Ausprägung der Erkrankung (Hohenstein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007; Knorr *et al.*, 2008; Masuyama *et al.*, 2009; Mihout *et al.*, 2011; Sandner und Stasch, 2017). Auch in der Lunge scheint NO einen protektiven Effekt bei der Entwicklung der Fibrose zu haben (Noguchi *et al.*, 2014). NO spielt jedoch nicht nur eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie der Lungenfibrose, sondern hat auch in der gesunden Lunge eine wesentliche Bedeutung. So induziert NO beispielsweise die Bronchodilatation und pulmonale Vasodilatation (Ricciardolo *et al.*, 2004; Sugiura und Ichinose, 2011).

1.2 NO-Synthese

NO ist ein gasförmiges Signalmolekül. Die Bildung des freien Radikals wird durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Das Substrat L-Arginin wird in NADP⁺, L-Citrullin und NO umgewandelt. Es gibt drei verschiedene Isoformen der NOS, die alle als Homodimer vorliegen: Zwei konstitutiv exprimierte Isoformen, die neuronale nNOS und die

endotheliale eNOS sowie eine induzierbare iNOS (Forstermann *et al.*, 1994). Die nNOS wird nicht nur in Neuronen des Gehirns exprimiert, sondern auch in nitrergen Neuronen des peripheren Nervensystems (Forstermann und Sessa, 2012), in Epithelzellen (Schmidt und Walter, 1994), glatten Muskelzellen (Loesch und Burnstock, 1995) und der Skelettmuskulatur (Nakane *et al.*, 1993; Forstermann *et al.*, 1994). Demnach ist die nNOS zum einen an der hippokampalen Langzeitpotenzierung (Son *et al.*, 1998; Burette *et al.*, 2002) und synaptischen Plastizität (Lu *et al.*, 1999) im zentralen Nervensystem beteiligt, zum anderen reguliert sie in der Peripherie die Darmperistaltik, die Vasodilatation und die Erektion des Penis (Sanders *et al.*, 1992; Forstermann und Sessa, 2012; Groneberg *et al.*, 2013).

Die Expression der eNOS findet in Endothelzellen und Kardiomyozyten (Balligand *et al.*, 1995) sowie in Neuronen (Kantor *et al.*, 1996) statt. Durch die Ausschüttung der Transmitter Acetylcholin, Endothelin, Serotonin, ADP und ATP wird die Synthese von NO induziert. Die eNOS vermittelt die Regulation der Angiogenese (Han und Stewart, 2006) und Apoptose (Dimmeler und Zeiher, 1999) sowie die Leukozytenadhäsion (Kubes, 1992). Zudem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation, da sie die Dilatation von Blutgefäßen vermittelt (Groneberg *et al.*, 2010).

Die iNOS ist an der unspezifischen Immunantwort beteiligt und wird erst nach Stimulation von Makrophagen und Mikrogliazellen mit Lipopolysacchariden und Zytokinen exprimiert. Somit wird bei pro-inflammatorischen Prozessen die Produktion von NO angeregt (Nathan und Hibbs, 1991; Stuehr *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu den beiden konstitutiv exprimierten NOS, die NO Ca^{2+} -abhängig und in geringen Konzentrationen synthetisieren, produziert die iNOS große Mengen an NO und arbeitet Ca^{2+} -unabhängig.

Im Respirationstrakt wird NO in einer Vielzahl von Zellen produziert (Gaston, 1997). Die Expression der konstitutiv aktiven NOS kann in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden. Die nNOS wird in Ganglien der Trachea und Bronchien exprimiert, die eNOS findet sich in vaskulären Endothelzellen und Alveolarepithelzellen Typ II (Ricciardolo *et al.*, 2004; Sugiura und Ichinose, 2011). Die iNOS dagegen kann unter physiologischen Bedingungen im Respirationstrakt nicht nachgewiesen werden. Wie auch in anderen Geweben wird sie erst nach einer Stimulation mit mikrobiellen Endotoxinen oder proinflammatorischen Zytokinen exprimiert. So konnte in Patienten, die an einer Lungenfibrose leiden, eine erhöhte Expression der NOS und folglich eine höhere NO-Konzentration in der Atemluft beobachtet werden (Saleh *et al.*, 1997; Lakari *et al.*, 2002; Almudever *et al.*, 2013).

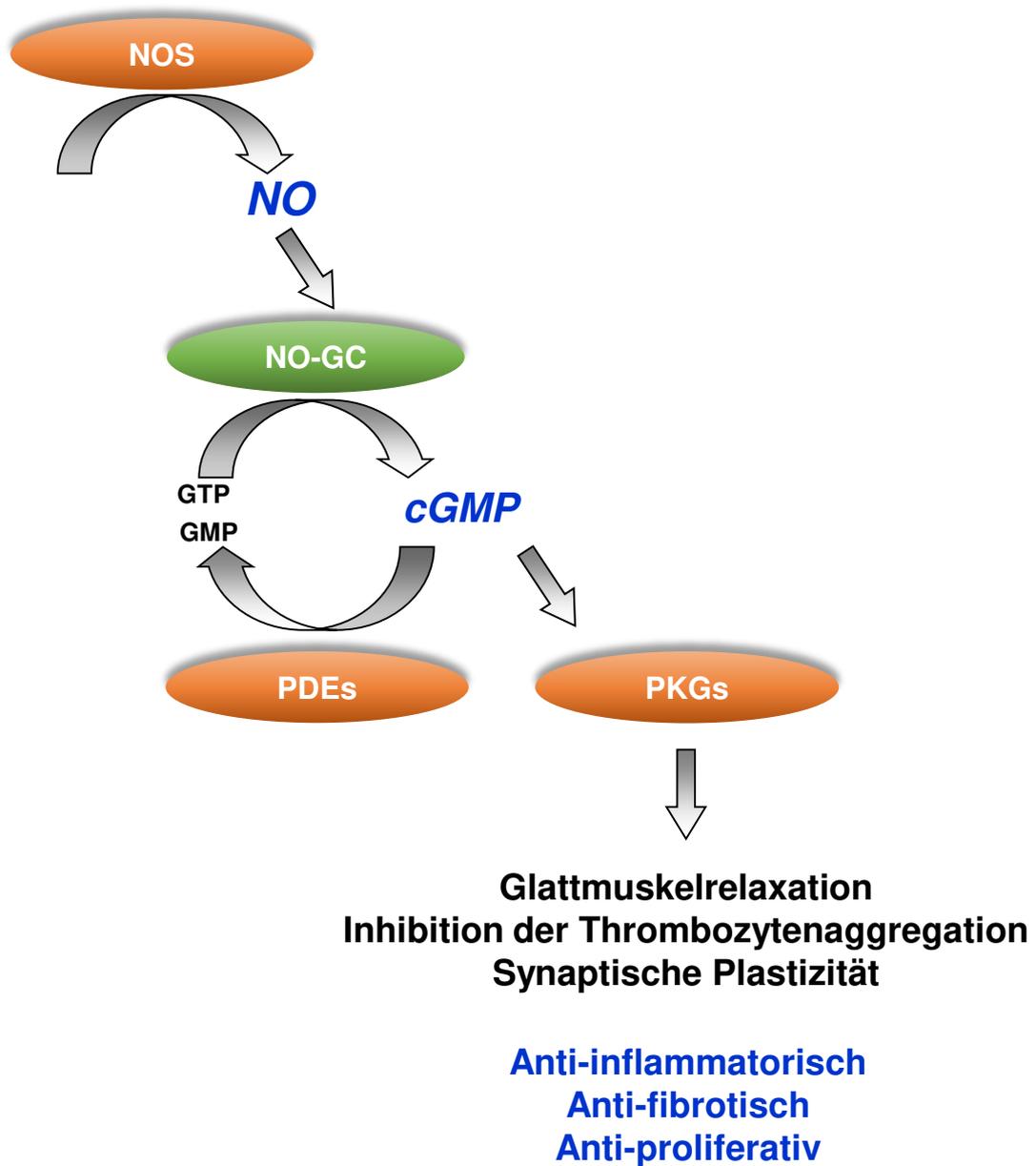


Abbildung 1: Die NO/cGMP-Signalkaskade

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die NO-Synthase (NOS) katalysiert. NO aktiviert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) und führt zur Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Der sekundäre Botenstoff wiederum aktiviert verschiedene Effektormoleküle wie z.B. Proteinkinasen (PKGs) und Phosphodiesterasen (PDEs). PDEs bauen das synthetisierte cGMP wieder ab und beenden somit die Signaltransmission. Die NO/cGMP-Signalkaskade vermittelt verschiedene physiologische Effekte und hat ebenso Einfluss auf viele pathologische Prozesse.

1.3 NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Die Familie der Guanylyl-Cyclasen (GC) wird in zwei verschiedene Klassen unterteilt. Die membrangebundene Form der GC (Russwurm *et al.*, 2001) wird durch die natriuretischen Peptide, Guanylin und Uroguanylin aktiviert (Waldman *et al.*, 1984; Winkquist *et al.*, 1984). Daher wird sie als Peptid-aktivierte GC (pGC) bezeichnet. Es existieren 7 verschiedene Enzyme (GC-A bis GC-G), die alle als membranständige Form nachgewiesen sind. Vor Entdeckung der pGC ging man davon aus, dass die GC nur zytosolisch vorkommt und bezeichnete sie daher als lösliche Guanylyl-Cyclase (soluble guanylyl cyclase; sGC). Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) wird durch die Bindung von NO aktiviert (Schultz *et al.*, 1977; Bohme *et al.*, 1978; Murad *et al.*, 1978) und führt zu einer vermehrten Bildung des intrazellulären Botenstoffs cGMP aus Guanosintriphosphat (GTP).

Die NO-GC ist ein Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt wird. Von der α -Untereinheit gibt es zwei verschiedene Isoformen (α_1 und α_2), von der β -Untereinheit ist lediglich eine Isoform bekannt (β_1). Aus diesen Isoformen werden zwei verschiedene Heterodimere gebildet: $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 2016). Eine enzymatische Aktivität der Homodimere konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Jede Untereinheit besteht aus einer C-terminalen katalytischen Domäne, einem zentralen Teil und einer N-terminalen Häm-bindenden Region, die für die Aktivierung des Enzyms essentiell ist (Friebe und Koesling, 2003). Die enzymatische Aktivität der beiden Heterodimere ist identisch, dennoch sind sie in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlich stark exprimiert. Die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ist das am häufigsten vorkommende Dimer. Die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und ist mit der $\alpha_1\beta_1$ -Isoform an der synaptischen Transmission beteiligt (Burette *et al.*, 2002; Mergia *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017). NO bindet an das reduzierte Eisen (Fe^{2+}) der prosthetischen Häm-Gruppe, wodurch es zur Formation eines NO- Fe^{2+} -Histidin-Komplexes kommt. Magnesium (Mg^{2+}) wird dabei als Co-Faktor benötigt. Anschließend erfolgt die Spaltung der Histidin- Fe^{2+} -Bindung, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Enzyms kommt und die Aktivität der NO-GC um das 200-fache erhöht wird (Ignarro, 1990; Friebe und Koesling, 2003). Neben NO kann die NO-GC auch in geringem Maße durch Kohlenstoffmonoxid (CO) aktiviert werden (Gerzer *et al.*, 1981; Stone und Marletta, 1994).

Die NO-GC lässt sich zudem auch pharmakologisch beeinflussen. Dabei unterscheidet man Stoffe, die das Enzym unabhängig von NO stimulieren oder aktivieren. Stimulatoren wirken Häm-abhängig, Aktivatoren Häm-unabhängig (Evgenov *et al.*, 2006). Der erste Stimulator YC-1 wurde 1998 charakterisiert (Friebe und Koesling, 1998). Es folgte die Entdeckung weiterer Indazol-Derivate wie BAY 41-2272 und BAY 41-8543 (Stasch *et al.*, 2001) und Riociguat (Evgenov *et al.*, 2006; Mittendorf *et al.*, 2009). Sie wirken in geringem Maße als

direkte Stimulatoren der NO-GC hauptsächlich aber über einen synergistischen Mechanismus, indem sie die Sensitivität gegenüber NO erhöhen. Durch die Stabilisierung des Nitrosyl-Häm-Komplexes wird das Enzym in einen hocheffektiven Aktivierungszustand versetzt (Russwurm *et al.*, 2002; Russwurm und Koesling, 2004; Evgenov *et al.*, 2006). Die Aktivatoren wirken über einen anderen molekularen Mechanismus. Sie konkurrieren mit der prosthetischen Häm-Gruppe um die Bindestelle und aktivieren die NO-GC somit NO-unabhängig (Schmidt *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005). Stimulatoren und Aktivatoren erwirken eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und zeigen vasodilatatorische Effekte (Stasch *et al.*, 2002). Daher werden sie zur Therapie der pulmonalen Hypertension und bei akuter Herzschwäche eingesetzt (Stasch *et al.*, 2011). In den vergangenen Jahren konnten zudem anti-fibrotische Effekte nachgewiesen werden, womit sie als neue Therapeutika bei der Behandlung der Haut- und Lungenfibrose eingesetzt werden könnten (Sandner und Stasch, 2017). Neben den aktivierenden und stimulierenden Pharmaka, gibt es auch Inhibitoren der NO-GC, die über eine kompetitive Bindung der Häm-Gruppe die Synthese von cGMP verhindern (Schrammel *et al.*, 1996). Ein potenter Inhibitor ist 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ).

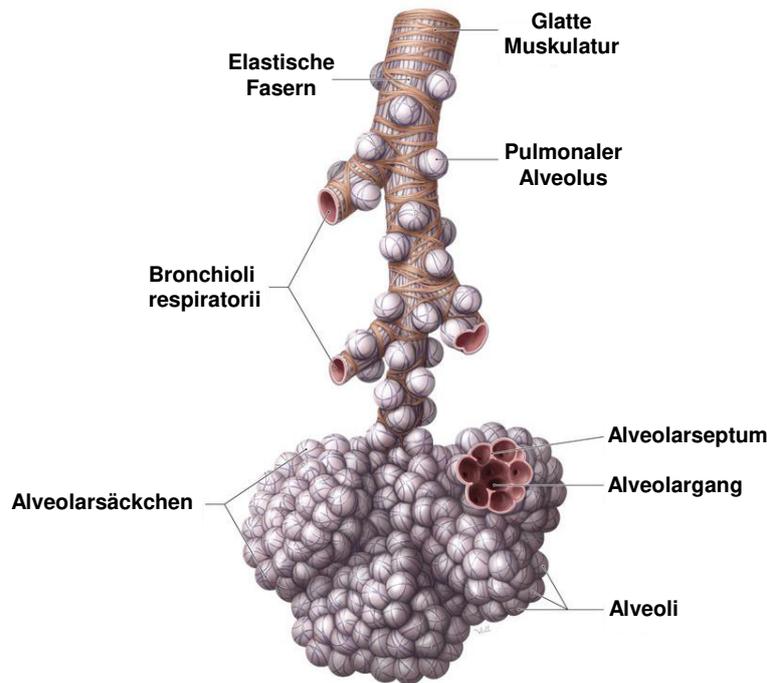
1.4 Der Respirationstrakt des Menschen

Der Respirationstrakt besteht aus der Nase, dem Rachen (*Pharynx*), dem Kehlkopf (*Larynx*), der Luftröhre (*Trachea*) und der Lunge (*Pulmo*). Funktionen sind zum einen die Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts im Blut, die Exkretion, Metabolisierung und Speicherung von Stoffen, aber vor allem der Gasaustausch. Sauerstoffarmes Blut wird aus dem Körperkreislauf in die Lunge transportiert. Die Atemluft besteht zu 79% aus Stickstoff (N₂) und zu 21% aus Sauerstoff (O₂). In den Lungenbläschen, den sogenannten Alveolen (*Alveoli pulmonis*) wird der Sauerstoff aus der eingeatmeten Luft in das Blut aufgenommen, während Kohlenstoffdioxid (CO₂) aus dem Blut an die Ausatemluft abgegeben wird.

Die Lungen befinden sich in der Brusthöhle und werden makroskopisch in Lungenlappen gegliedert. Die rechte Lunge (*Pulmo dexter*) besteht beim Menschen aus drei Lappen (Oberlappen, Mittellappen und Unterlappen), die linke Lunge (*Pulmo sinister*) aus zwei Lappen (oberer, mittlerer und unterer Lappen). Auf funktioneller Ebene lässt sich das Respirationssystem in zwei verschiedene Abschnitte unterteilen. Die Atemwege, die für den Transport der Luft aus und in die Lunge verantwortlich sind und die respiratorische Zone, in der letztlich der Gasaustausch stattfindet. Der luftleitende Abschnitt umfasst die Nasenhöhle, den *Larynx* und die *Trachea*, die beim Menschen aus 15-20 inkompletten C-förmigen Knorpelspangen besteht. Diese sind durch fibroelastische Bänder und glatte Muskulatur (*Musculus trachealis*) untereinander verbunden. Die *Trachea* endet im oberen Brustkorb mit der Gabelung in die beiden Hauptbronchi (*Bifurcatio tracheae*). Aus den

Hauptbronchien gehen jeweils 5 Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) hervor, die sich weiter in Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) aufteilen. In weiteren Verzweigungsschritten bilden sich die mittleren und kleinen Bronchi, die nur noch Knorpelplatten enthalten. Darauf folgen die Bronchioli, die schließlich keinen Knorpel mehr aufweisen. Im Gegensatz dazu steigt in den Luftwegen von proximal zu distal der Anteil der glatten Muskulatur und elastischen Fasern. Die *Bronchioli terminales* bilden den letzten Abschnitt der luftleitenden Atemwege. Sie teilen sich 3-4-mal und bilden die *Bronchioli respiratorii* aus. Diese teilen sich weiter in die Alveolargänge (*Ductus alveolares*), von denen sich die Alveolen ausbilden, in denen der Gasaustausch stattfindet (Abbildung 2A). Der Abschnitt zwischen *Trachea* und den *Bronchioli terminales* wird als anatomischer Totraum bezeichnet, da dort kein Gasaustausch stattfindet.

Die histologische Struktur des Respirationstrakts ist durch funktionelle Unterschiede der oberen und unteren Atemwege bestimmt. In den oberen Atemwegen wird die eingeatmete Luft befeuchtet und Staubteilchen und andere Partikel abgefangen. Das histologische Bild der Bronchien ist in der humanen Lunge durch Becherzellen bestimmt. Diese zwischen normalen Flimmerepithelzellen eingelagerten Drüsen produzieren Muzine, die eine Schutzschicht bilden. Im Verlauf des Bronchialbaumes kommt es zu graduellen histologischen Veränderungen. Die Anzahl der Drüsen in der *Submukosa* verringert sich kontinuierlich bis zu den Segmentbronchien. Das Epithel wird zu einem einfachen Säulenepithel, wohingegen die *Lamina propria* durch eine Vermehrung von elastischen Fasern gekennzeichnet ist. Die Knorpelringe, die in der *Trachea* und den Hauptbronchien vorkommen, werden in den Bronchien zu diskontinuierlichen Platten, die immer dünner werden und seltener auftreten. Bronchiolen haben ein einschichtiges, hoch- bis isoprismatisches (kubisches) Epithel, das Keulenzellen enthält (60-80%). Unterhalb dieser Schicht befinden sich glatte Muskelzellen. Die Anzahl der elastischen Fasern in der *Lamina propria* nimmt weiter zu während Knorpelplatten und Drüsen ganz verschwinden. Somit besteht die Wand der Bronchiolen nur noch aus Mukosa, einer Schicht aus glatten Muskelzellen und der *Lamina propria*. Einige Bündel glatter Muskulatur verlaufen bis in die Wände der Alveolargänge und konzentrieren sich an der Öffnung der Alveolen, die sich von den Alveolargängen ausgehend ausstülpfen. Benachbarte Alveolen sind durch Kohn-Poren miteinander verbunden. Die Funktion dieser Poren ist noch nicht genau aufgeklärt. Sie dienen entweder der gleichmäßigen Belüftung aller Alveolen, der Verteilung des in den Alveolen befindlichen Oberflächenfilms oder fungieren als Pforten für Myofibroblasten. Die Alveolen werden von einem Alveolarepithel ausgekleidet, das aus Pneumozyten, auch Alveolarepithelzellen (AECs) genannt, gebildet wird (Abbildung 2B). AECs Typ I sind flache, langgestreckte Zellen, die direkt am Gasaustausch mit den Kapillaren beteiligt sind und sich über mehrere Alveolen erstrecken. Die kubischen AECs Typ II produzieren und sekretieren

A

modifiziert nach: Schünke, Schulte, Schumacher, PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: Innere Organe, 3. Auflage, 2012

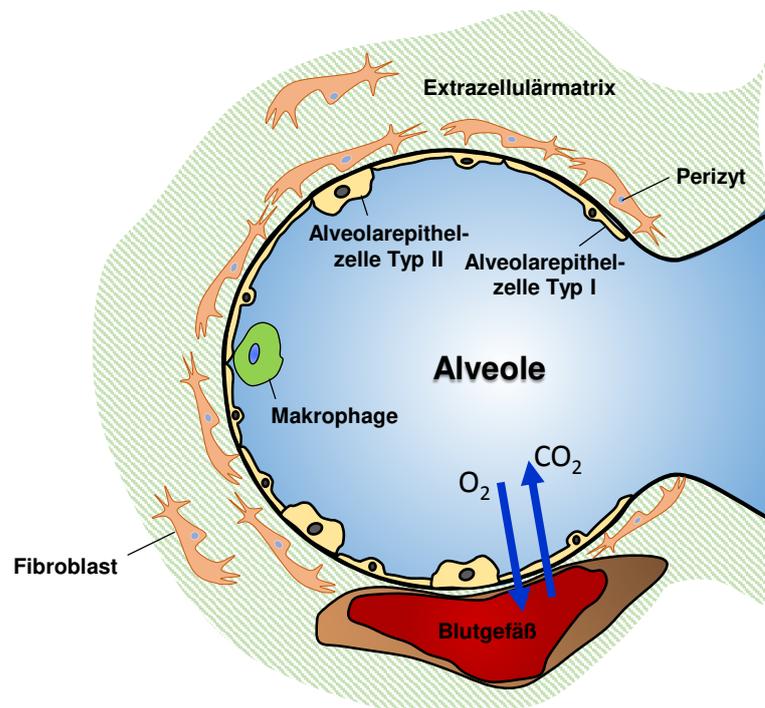
B

Abbildung 2: Anatomie und Histologie des Respirationstrakts

(A) Schematische Darstellung der respiratorischen Zone des Bronchialbaums. Die Bronchioli respiratorii teilen sich in die Alveolargänge von denen sich die Alveolen ausstülpfen. Die Alveolen werden durch ein dünnwandiges Septum voneinander getrennt.

(B) Schematische Darstellung einer Alveole. Alveolen werden von einem Epithel ausgekleidet (Alveolarepithelzellen Typ I und II) und sind von einem Kapillarnetzwerk umgeben, das sich innerhalb von Extrazellulärmatrix (EZM) eingebettet ist. Innerhalb der EZM befinden sich interstitielle Zellen wie Perizyten und Fibroblasten.

eine oberflächenaktive Substanz, den *Surfactant*. Dieser besteht aus Phospholipiden und Proteinen, die die Alveolenoberfläche überziehen. Dadurch wird die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert und diese so vor dem Kollaps geschützt. In den Alveolarräumen befinden sich vereinzelte Alveolarmakrophagen, die Partikel beseitigen, die bis in die respiratorische Zone vorgedrungen sind. Die Alveolen sind von einem dichten Blutgefäßsystem (Kapillarnetzwerk) umgeben, das in ein lockeres Bindegewebe eingebettet ist. Dieses enthält zum einen Zwischenzellsubstanz (Extrazellulärmatrix; EZM), die aus elastischen, retikulären und einigen kollagenen Fasern besteht. Innerhalb dieser Matrix befinden sich Zwischenraumzellen (interstitielle Zellen) wie Fibroblasten, Perizyten, residierenden Makrophagen und Mastzellen. An einigen Stellen fusionieren die Basalmembranen des Alveolarepithels und des Endothels der Kapillaren, um den Gasaustausch zu erleichtern. Diese Alveolarwände, die sich jeweils zwei benachbarte Alveolen teilen, werden als Interalveolarsepten (*Septum interalveolare*) bezeichnet.

1.4.1 Die Lunge der Maus

Die murine Lunge unterscheidet sich in ihrem anatomischen Aufbau von der humanen Lunge. Die rechte Lunge der Maus gliedert sich in vier Lappen (oberer, mittlerer, unterer und akzessorischer Lappen), wohingegen die linke Lunge aus nur einem Lappen besteht. In der Maus haben die intrapulmonalen Bronchien keine Knorpel und submukösen Drüsen mehr in den Wänden, während beim Menschen erst in den Bronchiolen keine Knorpelplatten mehr zu finden sind. Daher ist der Übergang von Bronchien zu Bronchiolen nicht genau definierbar. *Bronchioli respiratorii* sind nur sehr selten ausgebildet oder fehlen meist ganz. Somit gehen die *Bronchioli terminales* direkt in die *Ductus alveolares* über. Keulenzellen, die entsprechend zu Becherzellen der humanen Lunge Muzine produzieren, kommen schon oberhalb der Bronchiolen vor (Treuting *et al.*, 2012).

1.5 Interstitielle Lungenerkrankungen

Interstitielle Lungenerkrankungen (*Interstitial Lung Diseases*; ILDs) sind eine heterogene Gruppe verschiedener Erkrankungen, bei denen das Lungeninterstitium und die Alveolen betroffen sind. Sie sind gekennzeichnet durch eine Proliferation von Zellen, interstitielle Inflammation und Fibrose innerhalb der Alveolarwände (Rosas *et al.*, 2014). Der Begriff umfasst mehr als 300 verschiedene Krankheiten, die sich durch eine gleiche Klinik und Pathologie auszeichnen. Aufgrund unterschiedlicher Ursachen und molekularer Mechanismen unterscheiden sie sich jedoch voneinander (Eickelberg und Selman, 2010). Die meisten sind sehr selten und durch hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Es lassen sich zwei Gruppen unterteilen: Die Gruppe mit bekannten Ursachen und die Gruppe mit unbekannter Ursache. Bekannte exogene Ursachen sind inhalative Noxen

(organische oder anorganische Stäube, Gase, Dämpfe, Tabakrauch), Arzneimittel (z.B. Busulfan, Bleomycin, Methotrexat), Herbizide (Paraquat), sowie ionisierende Strahlen. Endogene Ursachen umfassen eine chronische Lungenstauung, Sepsis, ein akutes Atemnotsyndrom (ARDS) und Systemerkrankungen (Kollagenosen, Sarkoidosen). In mehr als 50% der Fälle kann jedoch keine bekannte Ursache identifiziert werden. Diese Gruppe wird unter dem Begriff idiopathische interstitielle „Pneumonien“ zusammengefasst. Da es sich hierbei aber ebenfalls um verschiedene Erkrankungen handelt, die sowohl in der Klinik als auch Pathologie stark voneinander abweichen, war eine weitere Klassifizierung in 7 Untergruppen unabdingbar (American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002). Die idiopathische Lungenfibrose (*Idiopathic Pulmonary Fibrosis*; IPF), eine chronisch, progressive Erkrankung, stellt mit ca. 60% die häufigste und schlimmste Form dieser Untergruppe dar und kommt häufiger bei älteren Menschen vor (Raghu *et al.*, 2011).

1.6 Die idiopathische Lungenfibrose (IPF)

Die Lungenfibrose ist durch eine exzessive Einlagerung von EZM, fortschreitenden Umbau der Lungenarchitektur und Vernarbung (Fibrosierung) charakterisiert. Diese Umbauprozesse erschweren die Diffusion und reduzieren somit den Gasaustausch. Daher wird die Lungenfibrose zu den fatalen, restriktiven Lungenerkrankungen gezählt, bei denen es zu Ventilationsstörungen aufgrund einer verminderten Ausdehnungsfähigkeit der Lunge und einer Verringerung des Lungenvolumens kommt.

Die IPF ist weltweit verbreitet. Erfassungen zur Inzidenz sind schwierig und variieren stark. Insgesamt kann jedoch ein vermehrtes Vorkommen der Erkrankung in den letzten Jahren verzeichnet werden (Raghu *et al.*, 2014; Esposito *et al.*, 2015; Hutchinson *et al.*, 2015; Raghu *et al.*, 2016). Die mediane Überlebenszeit nach der Erstdiagnose liegt bei drei Jahren. Damit weist die IPF eine höhere Letalität als die meisten Krebserkrankungen auf (Wynn, 2011; Vancheri und du Bois, 2013). Das Auftreten dieser chronischen Erkrankung korreliert mit dem Alter. So sind mehr als 0,2% der über 75-jährigen in den USA von einer Lungenfibrose betroffen (Wolters *et al.*, 2014). Zudem erkranken im Vergleich weitaus mehr Männer als Frauen (Gribbin *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2007). Die veränderte Lungenarchitektur und Einlagerung von EZM, z.B. Kollagen, führt zu einer Verdickung der alveolo-kapillären Membran und einer Reduktion der Elastizität der Lunge. Im Verlauf der chronischen Erkrankung wird normales Lungengewebe in fibrotisches, funktionseingeschränktes Gewebe umgewandelt. Dies bedingt zum einen, dass die Fläche für den Gasaustausch verringert wird und zum anderen mehr Atemarbeit aufgewendet werden muss, um eine adäquate Menge Luft in die Lunge zu transportieren. Eines der typischen klinischen Symptome ist daher die Kurzatmigkeit (Dyspnoe), die bei Beginn der Erkrankung nur bei Belastung, später auch im Ruhezustand auftritt. Zudem kann häufig ein

trockener Reizhusten beobachtet werden sowie ein diffuses inspiratorisches Knisterrasseln (*Velcro rales*). Darüber hinaus kommt es zu Diffusionsstörungen mit arterieller Hypoxämie (Sauerstoffmangel im arteriellen Blut) und einer pulmonalen Hypertonie (Lungenhochdruck), die mit fortschreitender Krankheit zur Überlastung der rechten Herzkammer (*Cor pulmonale*; Baenkler *et al.*, 2011) und letztlich zu einer Herzinsuffizienz führt. Als klinisches Erscheinungsbild der Hypoxie präsentieren sich eine verminderte körperliche Belastbarkeit sowie violette oder bläuliche Verfärbungen der Haut, Lippen oder Nägel und Trommelschlagelfinger (Raghu *et al.*, 2011).

Diagnostisch werden Röntgenuntersuchungen oder eine Computertomographie (CT) durchgeführt. Diese Verfahren zeigen eine Schrumpfung der Lunge und im Endstadium die typische Wabenlunge, bei der das normale Lungengewebe vollständig degeneriert und durch dickwandige Zysten ersetzt ist. Bei der Durchführung von Lungenfunktionstests werden meist eine verminderte Total- und Vitalkapazität der Lunge ermittelt sowie eine gesteigerte Atemarbeit und eine verminderte Lungencompliance (Raghu *et al.*, 2011). Dennoch können diese Parameter in frühen Stadien der IPF noch normal sein.

Kennzeichnend für fast alle Formen der Lungenfibrose ist ein langsam progredienter Verlauf, wobei es bisher noch keine passenden therapeutischen Interventionen gibt (Luppi *et al.*, 2012). Zur Behandlung empfohlen werden derzeit lediglich zwei Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (Nintedanib und Pirfenidon), die den Verlauf der Krankheit bei einer leichten oder mittelschweren Lungenfibrose verzögern können und die Lungenfunktionswerte verbessern (Richeldi, 2014; Richeldi *et al.*, 2014; Trawinska *et al.*, 2016; Behr *et al.*, 2017). In fortgeschrittenen Stadien der Lungenfibrose kann allerdings nur noch eine Lungentransplantation als lebensverlängernde Maßnahme durchgeführt werden (Christie *et al.*, 2008). Deshalb ist das Ziel aktueller Forschungen, ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen (Patho-) Mechanismen zu erlangen.

1.6.1 Pathogenese der IPF

Die exakten zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Pathogenese der IPF sind noch unbekannt. Einige idiopathische interstitielle Pneumonien sind das Resultat chronischer Entzündungsprozesse und weisen während des gesamten Verlaufs der Erkrankung eine Inflammation auf (Katzenstein und Myers, 1998; Mason *et al.*, 1999; Selman *et al.*, 2001). Bei der IPF ist jedoch nur eine geringe Inflammation nachzuweisen, die in späteren Stadien der Erkrankung nicht mehr auftritt (Thannickal *et al.*, 2004). Zudem zeigte die Therapie der IPF mit anti-inflammatorischen Agenzien (Kortikosteroide, zytotoxische Agenzien) keine signifikante Wirkung und konnte die Progression der Erkrankung nicht beeinflussen (Gross und Hunninghake, 2001; Demedts *et al.*, 2005; Wynn, 2007). Die derzeit favorisierte Hypothese dagegen beschreibt die IPF vielmehr als

die Folge einer überschießenden Wundheilung und mangelnder Reepithelialisierung nach wiederholter Verletzung des Lungenepithels und Apoptose der AECs (Selman *et al.*, 2001; Ahluwalia *et al.*, 2014). Eine genetische Prädisposition kann ebenfalls eine Rolle spielen (Gross und Hunninghake, 2001). Die Verletzung des alveolären Epithels führt zum Untergang von Epithelzellen oder zu deren Reprogrammierung. Zunächst wird das angeborene Immunsystem aktiviert und eine provisorische Wundmatrix ausgebildet. Die Permeabilität der Blutgefäße wird erhöht und die extravaskuläre Blutgerinnung angetrieben. Durch die von Leukozyten freigesetzten Zytokine werden residente Fibroblasten rekrutiert, die das Lungeninterstitium infiltrieren und proliferieren (Wynn, 2008). Aktivierte Myofibroblasten werden als die Effektorzellen der Wundheilung bezeichnet. Sie sezernieren vermehrt EZM, die das zerstörte Lungenparenchym ersetzt. Läuft dieser Wundheilungsprozess in angemessener Zeit und Stärke ab, kommt es zu einer Neubildung des Lungenepithels, zur Apoptose der Myofibroblasten, zum Abbau der Wundmatrix und zur Wiederherstellung der normalen Lungenarchitektur. Bei einer überschießenden Wundheilungsantwort sind diese Prozesse jedoch fehlreguliert. Die dauerhafte und abnormale Aktivierung von Myofibroblasten induziert die Apoptose der AECs und führt zu einer übermäßigen Produktion von Kollagen, was letztlich in der Entstehung einer IPF resultiert (Wynn, 2008; Ahluwalia *et al.*, 2014).

1.6.2 Pathologische Merkmale der IPF

Die histopathologischen Veränderungen des Lungengewebes sind sehr variabel. Es können verschiedene Fibrosegrade in der gleichen Lunge und sogar dem gleichen Lungenlappen vorkommen (Katzenstein und Myers, 1998; Flaherty *et al.*, 2001; Katzenstein *et al.*, 2002). Dabei liegen fibrotische Herde direkt an der Grenze zu Regionen, die durch eine vermehrte Kollageneinlagerung gekennzeichnet sind und in der Nähe von nicht betroffenen Regionen (Kuhn *et al.*, 1989; Kuhn und McDonald, 1991). Fibrotische Herde sind charakterisiert durch die Akkumulation von Myofibroblasten. Diese Regionen werden als die aktiven fibrotischen Zonen der Lungenfibrose bezeichnet (Gross und Hunninghake, 2001), da eine erhöhte Aktivität und Freisetzung von fibrogenetischen Zytokinen wie dem *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), dem *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) und dem *Platelet-Derived Growth Factor Receptor β* (PDGFRβ) nachzuweisen ist (Selman *et al.*, 2001). Sie zeigen außerdem Basalmembranschäden und verdickte Septen (Fernandez und Eickelberg, 2012). Das Alveolarepithel ist durch apoptotische AECs Typ I und eine Hyperplasie der AECs Typ II gekennzeichnet (Kasper *et al.*, 1995; Kasper und Haroske, 1996). Je mehr fibrotische Areale auftreten, desto aggressiver ist die Form der Fibrose und desto schlechter die Prognose (King *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 2002).

Myofibroblasten, die Effektorzellen der Fibrose, sind für die vermehrte Produktion von EZM (z.B. Kollagen, Fibronectin, Proteoglykane, elastische Fasern) verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen stehen EZM-degradierende Matrixmetalloproteasen (MMPs), mit den *Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases* (TIMPs) im Gleichgewicht und regulieren somit Synthese und Abbau der EZM. Bei der IPF kommt es zu einer vermehrten Expression von verschiedenen MMPs durch Epithelzellen (Garcia-Alvarez *et al.*, 2006; Pardo und Selman, 2006). Eine Fibrose entsteht, wenn die Synthese von EZM durch Myofibroblasten höher ist als die Abbaurate (Wynn, 2008). Somit wird normales Lungengewebe durch funktionsloses Narbengewebe ersetzt.

Im weiteren Verlauf der Krankheit fallen die Alveolen in sich zusammen (Atelektase) und es bilden sich dilatierte, zystenartige Lufträume, die Schleim und inflammatorische Zellen beinhalten und von fibrotischem Narbengewebe umgeben sind (Cavazza *et al.*, 2010). Diese charakteristischen Veränderungen werden als Honigwabern bezeichnet und treten erst im Endstadium der IPF insbesondere in den unteren Lungenlappen auf (Misumi und Lynch, 2006).

1.6.3 Myofibroblasten

Myofibroblasten sind die Schlüsselzellen der normalen Wundheilung und der Gewebefibrose (Hinz und Gabbiani, 2010). Sie exprimieren kontraktile Proteine und synthetisieren EZM-Proteine wie Kollagen (Kuhn *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1994; Tomasek *et al.*, 2002). Diese Zellen zeigen somit phänotypische Merkmale von mesenchymalen Zellen als auch von Glattmuskelzellen. Im normalen Gewebe kommen Myofibroblasten mit Ausnahme von einigen Organen, die kontraktile Kräfte erzeugen, nicht vor. So konnten mesenchymale Zellen mit Merkmalen von Myofibroblasten unter anderem in der uterinen *Submukosa*, der intestinalen *Lamina propria*, in Follikeln von Lymphknoten und Milz sowie den Lungensepten nachgewiesen werden (Tomasek *et al.*, 2002). Die Anzahl dieser Zellen ist jedoch streng limitiert, um die Gewebemöostase aufrecht zu erhalten. Kommt es zu einer Verletzung des Gewebes, bilden sich vermehrt Myofibroblasten an der Verletzungsstelle. Myofibroblasten werden durch die *de novo*-Expression von α -Glattmuskelaktin (α -SMA) charakterisiert und sind für die übermäßige Produktion von Kollagen in fibrotischem Gewebe verantwortlich (Hinz *et al.*, 2012; Wells und Schwabe, 2015).

α -SMA ist jedoch ein inkonsistenter Marker, der nicht von allen Myofibroblasten exprimiert wird (Sun *et al.*, 2016) und nicht alle α -SMA-positiven Myofibroblasten produzieren zum gleichen Zeitpunkt Kollagen. Somit ist sowohl die Expression von α -SMA als auch die Produktion von Kollagen zeitlich variabel (Dulauroy *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016).

Die zelluläre Herkunft von Myofibroblasten ist derzeit noch nicht aufgeklärt. Es werden verschiedene potentielle Ursprungszellen beschrieben (Abbildung 3B). Zum einen können Myofibroblasten aus ansässigen Fibroblasten hervorgehen, die durch eine Verletzung des Gewebes aktiviert werden und infolgedessen Kollagen und Chemokine produzieren (Zhang *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde der Prozess der epithelialen-mesenchymalen oder endothelialen-mesenchymalen Transition (EMT, EndoMT) diskutiert. Demnach könnten sich Epithelzellen und Endothelzellen in Myofibroblasten differenzieren (Kalluri und Neilson, 2003; Montorfano *et al.*, 2014). Ob diese Zellen tatsächlich maßgeblich zum Pool der Myofibroblasten beitragen, ist jedoch umstritten. Rock *et al.* (2011) konnten keine EMT bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nachweisen. Schon vor mehr als 20 Jahren wurden Perizyten als Vorläuferzellen bei der Bleomycin-induzierten Fibrose postuliert. Erst in neueren Studien werden sie als die Hauptquelle von Myofibroblasten bei der Lungenfibrose beschrieben (Fernandez und Eickelberg, 2012; Hung *et al.*, 2013; Rowley und Johnson, 2014). Zudem implizieren einige Studien, dass Lipofibroblasten an der Entstehung der Lungenfibrose und der Bildung von Myofibroblasten beteiligt sein könnten (El Agha *et al.*, 2017). Lipofibroblasten sind Zellen, die vor allem während der Alveologenese in der Lunge vorhanden sind und Lipide enthalten sowie Proteine des Fettstoffwechsels bilden. Ihre Existenz ist in der menschlichen Lunge noch nicht bewiesen (Ahlbrecht und McGowan, 2014). Des Weiteren wird vermutet, dass auch extra-pulmonale Zellen an der Expansion der Myofibroblasten-Population beteiligt sind. Aus dem Knochenmark stammende, zirkulierende Fibrozyten werden bei der Wundheilung und bei fibrotischen Prozessen als Vorläuferzellen von Fibroblasten beschrieben. Diese könnten bei einer Verletzung des Gewebes aus der Blutzirkulation in die Lunge einwandern und somit an der Wundheilung beteiligt sein (Postlethwaite *et al.*, 2004). Zudem wurden diese mesenchymalen Vorläuferzellen bereits in fibrotischen Lungen nachgewiesen, wohingegen sie in gesunden Lungen nicht vorhanden sind (Hashimoto *et al.*, 2004; Andersson-Sjoland *et al.*, 2008).

Im Verlauf der normalen Wundheilung kommt es zu einer verminderten Expression von α -SMA und letztlich zur Apoptose der Myofibroblasten (Desmouliere, 1995). Bei der Lungenfibrose dagegen bleiben die Myofibroblasten TGF- β -vermittelt erhalten. Sie produzieren vermehrt EZM und pro-fibrotische Zytokine. Diese Prozesse münden letztlich in eine Fibrose mit irreversiblen Schäden des Lungengewebes (Hinz *et al.*, 2007).

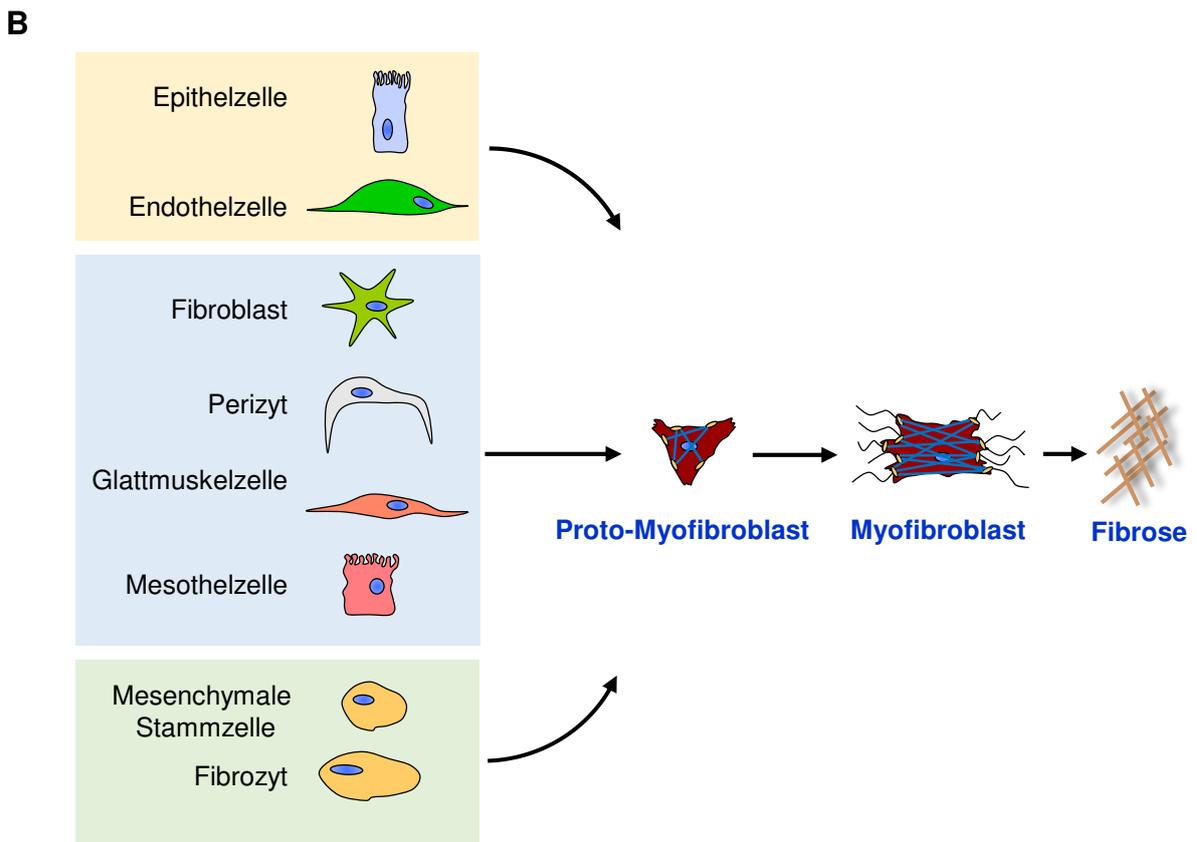
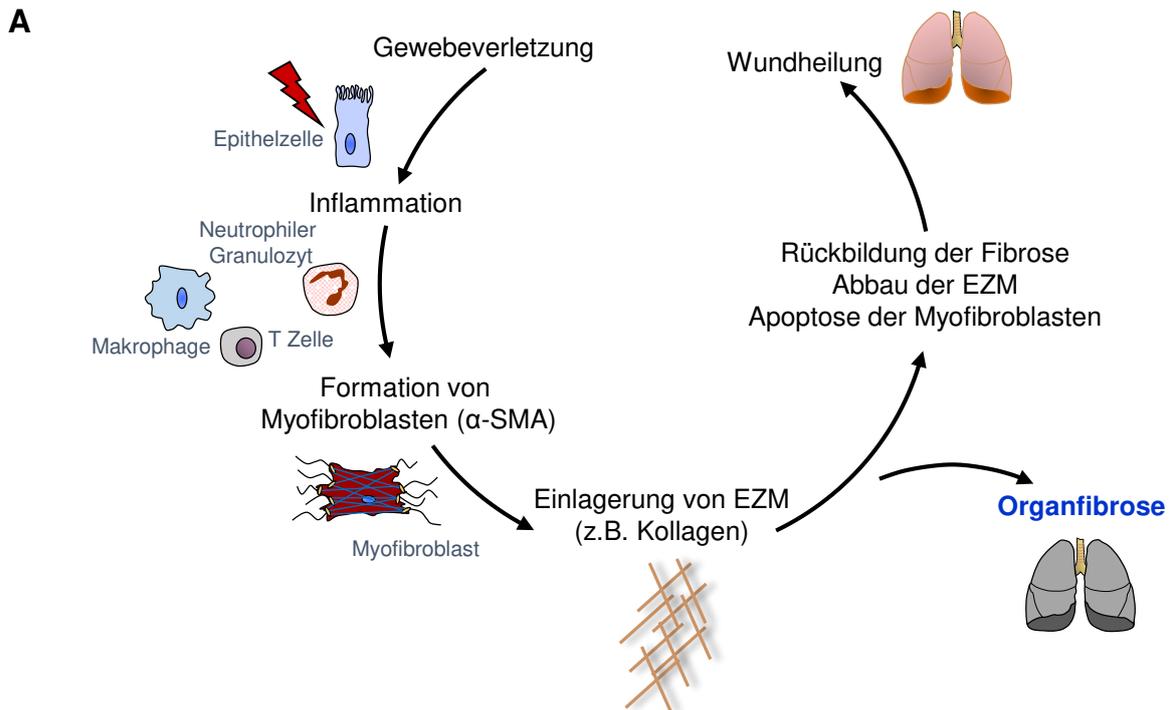


Abbildung 3: Pathogenese und Pathologie der Lungenfibrose

(A) Schematische Darstellung der Entwicklung einer Lungenfibrose, die als Folge einer fehlregulierten oder übermäßigen Wundheilungsreaktion entsteht.

(B) Myofibroblasten sind die Effektorzellen der Fibrose und für die Einlagerung von Extrazellulärmatrix (EZM) verantwortlich. Ihre Herkunft ist noch nicht genau bekannt. Es gibt verschiedenen Vorläuferzellen, die sich in den Myofibroblasten-Phänotyp differenzieren können.

1.6.4 Perizyten

Der französische Physiologe Charles-Benjamin Rouget entdeckte 1873 verästelte, kontraktile Zellen, die sich in der Nähe von kleinen Blutgefäßen befinden (Rouget, 1873). Zunächst wurden sie daher als Rouget-Zellen bezeichnet. 1923 wurde der Name Perizyt eingeführt und zwei Jahre später ihre Existenz im Gefäßbett von Kaulquappen nachgewiesen (Clark und Clark, 1925). Perizyten sind murale Zellen, die das Endothel von Mikrogefäßen wie Blutkapillaren, präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen umkleiden und in jedem Organ vorkommen (Sims, 1986; Diaz-Flores *et al.*, 2009). Sie besitzen einen runden Zellkörper mit einem prominenten Zellkern und wenig Zytoplasma. Von ihrem Zellkörper gehen mehrere zytoplasmatische Ausläufer aus, die sich um die abluminale Oberfläche der Endothelzellen winden. Ein Ausläufer kann dabei mehrere Endothelzellen unvollständig bedecken (Sims, 1986). Die durch Perizyten bedeckte Endothelzellfläche unterscheidet sich stark von Organ zu Organ und liegt zwischen 10 und 50%. Die höchste Perizyten-dichte ist im zentralen Nervensystem (ZNS) und in der Retina zu verzeichnen. Das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen beträgt 1:1. Die Gefäßmuskulatur dagegen weist nur wenige Perizyten auf. Das Verhältnis Perizyt/Endothelzelle liegt hier bei 1:100 (Shepro und Morel, 1993). Perizyten und Endothelzellen teilen sich eine gemeinsame Basalmembran und sind meist nur 20 nm voneinander entfernt (Sims, 1986). Durch Adhäsions-Plaques bestehend aus Fibronectin und *Peg-and-socket*-Invaginationen, die *Tight*-, *Gap*- und *Adherens-Junctions* umfassen, können enge Zell-Zell-Interaktionen ausgebildet werden (Armulik *et al.*, 2005). Die Hauptfunktion dieser muralen Zellen liegt in der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation des Wachstums von Blutgefäßen (Benjamin *et al.*, 1998; Darland *et al.*, 2003; Armulik *et al.*, 2005; Diaz-Flores *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011). Die Expression von kontraktilen Proteinen wie Desmin und α -SMA unterstreicht die Bedeutung der Perizyten bei der Regulation des Blutflusses, indem sie die Konstriktion und Dilatation der Blutgefäße regulieren (Hall *et al.*, 2014).

Der PDGF-B/PDGFR β -Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Perizyten zu neu formierten Gefäßen (Hoch und Soriano, 2003; Betsholtz, 2004). PDGF-B wird von Endothelzellen angiogener Sprossen sezerniert und bindet an PDGFR β , einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der auf der Zelloberfläche von Perizyten exprimiert wird. Dies führt während dem Gefäßwachstum zur Proliferation und Migration der Perizyten. Ferner kommunizieren Perizyten mit dem Endothel über die Angiopietin/Tie2-Rezeptorachse. Angiopietin-1 (Ang-1) ist der wichtigste agonistische Ligand für den Tie2-Rezeptor. Von Perizyten sezerniertes Ang-1 führt zu einer Aktivierung des Rezeptors auf Endothelzellen. Dadurch wird das Überleben dieser Zellen sowie die Befestigung von Perizyten an der gemeinsamen Basalmembran vermittelt. Der Angiopietin/Tie2-Signalweg ist somit

essentiell für die Aufrechterhaltung der Perizyten-Population und gewährleistet die Stabilität der Gefäße (Armulik *et al.*, 2005; Gaengel *et al.*, 2009).

In der Lunge wurden Perizyten zunächst mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen (Weibel, 1974). In der bovinen Lunge ist 25% der Endothelzellfläche von Perizyten ausgekleidet (Epling, 1966; Sims und Westfall, 1983a).

Auf molekularer Ebene ist die Identifikation von Perizyten sehr komplex. Es werden verschiedene molekulare Marker verwendet: α -SMA, Desmin, NG2, PDGFR β , Aminopeptidase A und N, RGS5. Dennoch lässt sich mit keinem dieser Marker die gesamte Perizyten-Population nachweisen, da eine dynamische Expression vorliegt, die je nach Entwicklungsstatus und Organ variiert (Hellstrom *et al.*, 1999; Gerhardt und Betsholtz, 2003; Chan-Ling *et al.*, 2004; Hughes und Chan-Ling, 2004; Bergers und Song, 2005). Deshalb wird zur Identifizierung dieser muralen Zellen nicht nur die Expression von Markern, sondern auch ihre spezifische Morphologie und anatomische Lage berücksichtigt.

1.7 Molekulare Mechanismen der Lungenfibrose

Die molekularen Mechanismen in der Wundheilung und in der Pathophysiologie der Fibrose sind sehr komplex und bislang nur teilweise aufgeklärt. Ein umfassendes Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse ist jedoch essentiell, um bessere Therapiemöglichkeiten zu finden. Ein pro-fibrotisches Schlüsselmolekül ist TGF- β , das an der Entstehung fibroproliferativer Erkrankungen einschließlich der unterschiedlichen Formen der Lungenfibrose beteiligt ist (Green, 2002; Hsu *et al.*, 2007). Ein weiterer beteiligter Signalweg, der jedoch anti-fibrotische Aktivität zeigt, ist die NO/cGMP-Signalkaskade (Noguchi *et al.*, 2014).

1.7.1 Die Rolle von TGF- β bei der Lungenfibrose

Das am besten untersuchte an der Gewebereparatur und Wundheilung beteiligte Zytokin ist TGF- β (Border und Noble, 1994, 1995; al-Khateeb *et al.*, 1997; Border und Noble, 1997). Es nimmt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Fibrose in verschiedenen Organen ein (Border und Ruoslahti, 1992; Clouthier *et al.*, 1997; Sime *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2003; Eddy, 2005). TGF- β wurde erstmals vor mehr als 20 Jahren isoliert (Border und Noble, 1994) und existiert bei Säugetieren in drei verschiedenen Isoformen (TGF- β 1, 2 und 3), von denen TGF- β 1 am häufigsten vorkommt. Das Zytokin wird von verschiedenen Zellen wie Fibroblasten, Thrombozyten, inflammatorischen Zellen, mesenchymalen Zellen und AECs Typ II produziert (Zhang und Phan, 1996; Lasky und Brody, 2000). Bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen sezernieren alveoläre Makrophagen TGF- β , das an der Entwicklung der Fibrose beteiligt ist (Khalil *et al.*, 1996). In Gewebe von Patienten mit IPF konnte eine Expression von TGF- β in aktivierten Fibroblasten und AECs Typ II gezeigt

werden (Pan *et al.*, 2001). TGF- β bindet an Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die aktiviert werden und daraufhin Smad2/3 phosphorylieren. Dieses Smad2/3 Heterodimer transloziert in den Zellkern und reguliert die Transkription von spezifischen Zielgenen (Roberts, 1998). Die TGF- β -Signaltransduktion spielt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen und Myofibroblasten (Border und Noble, 1994). Dabei induziert das Zytokin eine Hochregulierung des kontraktiven Proteins α -SMA und regt somit die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten an (Desmouliere *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003). Außerdem hat TGF- β bei der Fibrose einen direkten Effekt auf die exzessive Produktion und Ablagerung von Kollagen und anderen EZM-Proteinen (Rosenbloom *et al.*, 2010). So wird etwa in Myofibroblasten die Expression von Prokollagen I und III aktiviert (Roberts *et al.*, 2003; Cutroneo *et al.*, 2007). Zusätzlich induziert das profibrotische Zytokin die Apoptose von AECs und soll dazu führen, dass die Zellen den umstrittenen Prozess der EMT durchlaufen und sich somit in Myofibroblasten differenzieren (Hagimoto *et al.*, 2002; Willis *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). TGF- β ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung der Lungenfibrose. Dennoch gibt es bisher keine effiziente und sichere anti-TGF- β -Therapie.

1.7.2 Die Rolle der NO/cGMP-Signalkaskade bei der Lungenfibrose

NO führt über Aktivierung der NO-GC und somit die Produktion von cGMP zu einer Verbesserung fibrotischer Prozesse in Niere, Herz und Leber (Hohenstein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007; Knorr *et al.*, 2008; Masuyama *et al.*, 2009; Mihout *et al.*, 2011; Sandner und Stasch, 2017). Die exogene Gabe von NO bei Triple-NOS-Knockout-Mäusen verhinderte das Fortschreiten der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung (Noguchi *et al.*, 2014). Die pharmakologische Stimulation der NO-GC verringerte die Entwicklung einer Hautfibrose durch Hemmung des TGF- β -Signalweges und reduzierte die Anzahl von Myofibroblasten und die Freisetzung von Kollagen (Beyer *et al.*, 2012; Beyer *et al.*, 2015).

Dennoch ist die Rolle der NO-GC während der Entwicklung einer Lungenfibrose noch nicht bekannt. Obwohl eine starke Expression der NO-GC in der Lunge gezeigt werden konnte und das Enzym schon vor vielen Jahren aus Ratten- und Rinderlungen isoliert wurde (Garbers, 1979; Humbert *et al.*, 1990), konnte der genaue Zelltyp, der die NO-GC exprimiert noch nicht näher beschrieben werden.

1.8 Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in der Maus

Zur Untersuchung der Pathogenese der Lungenfibrose werden verschiedene experimentelle Tiermodelle verwendet. Am besten charakterisiert und am weitesten verbreitet ist die einmalige intratracheale Gabe von Bleomycin zur Induktion der

Lungenfibrose in der Maus (Moeller *et al.*, 2008). Bleomycin ist ein Glykopeptid, das aus dem Bakterium *Streptomyces verticillus* isoliert und erstmals 1966 beschrieben wurde (Umezawa *et al.*, 1966). Es wird als chemotherapeutisches Agens zur Behandlung von verschiedenen Neoplasien eingesetzt und führt zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen in Tumorzellen, die daraufhin durch Apoptose zugrunde gehen (Lown und Sim, 1977). Eine der wesentlichen Nebenwirkungen ist die Lungentoxizität, die bei bis zu 46% der Patienten unter Behandlung auftritt. Daher ist der Einsatz von Bleomycin als anti-neoplastisches Medikament limitiert (Walters und Kleeberger, 2008).

In der Lunge führt Bleomycin zur Zerstörung von AECs und induziert initial eine inflammatorische Antwort (Chaudhary *et al.*, 2006). Die Bleomycin-induzierte Schädigung entwickelt sich im Gegensatz zur Lungenfibrose des Menschen sehr schnell und ist ungefähr 3-4 Wochen nach einmaliger Gabe von Bleomycin durch eine vermehrte Ablagerung von EZM-Proteinen nachzuweisen. Dennoch kann nach 6 Wochen eine spontane Selbstheilung der Lunge beobachtet werden, bei der der normale physiologische Zustand wiederhergestellt wird und nur noch einzelne kleine geschädigte Areale zu finden sind (Chung *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist die humane IPF durch einen chronisch progressiven Verlauf gekennzeichnet und die pathologischen Umbauvorgänge des Lungengewebes sind irreversibel. Demnach lassen sich nicht alle charakteristischen Merkmale der Erkrankung durch die einmalige Gabe von Bleomycin in der Maus nachstellen.

Es gibt zahlreiche Varianten des Bleomycin-induzierten Fibrosemodells, die sich anhand der Applikationsart (intravenös, intraperitoneal, intratracheal oder subkutan), der verabreichten Dosis und der einmaligen oder mehrmaligen Gabe von Bleomycin unterscheiden. In neuesten Studien wurde die repetitive Gabe von Bleomycin erläutert (Degryse *et al.*, 2010; Limjunyawong *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2016). Dabei wird Bleomycin im Abstand von 12-14 Tagen intratracheal 6-8-mal verabreicht. Dadurch lässt sich die Selbstreparatur der Lunge verhindern und die Bleomycin-induzierte Verletzung bleibt erhalten. Dieses Modell eignet sich somit besonders, um die chronischen Aspekte der Lungenfibrose näher zu untersuchen und zu charakterisieren.

1.9 Transgene Mausmodelle

Gentechnisch veränderte Mäuse stellen ein wichtiges Werkzeug dar, um die explizite Funktion der Enzyme innerhalb eines Organismus zu verstehen. Dadurch lassen sich neue Erkenntnisse hinsichtlich pathophysiologischer Mechanismen und der beteiligten Signalwege erlangen. Generell werden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Gene können durch Verwendung embryonaler Stammzell-Technik in das Genom eingeführt werden. Die gezielte Deletion eines Gens dagegen führt zu dessen Inaktivierung. Die Maus

als Modellorganismus bietet einige wichtige Vorteile. Da das Genom zu 99% mit dem des Menschen übereinstimmt und auch die Anordnung der Gene zu 96% identisch ist, ist die Maus einer der wichtigsten Modellorganismen in der biomedizinischen Forschung (Capecchi, 1994; Houdebine, 2007). Weitere Vorteile sind die Kultivierbarkeit muriner embryonaler Stammzellen (Capecchi, 1994) sowie die einfache Manipulierbarkeit der Gene. Aufgrund des geringen Körpergewichts der Maus ist der benötigte Raum für die Haltung gering und die Kosten für Futter niedrig. Von Vorteil ist zudem eine hohe Reproduktionsrate und somit eine kurze Generationszeit. Um die pathophysiologische Rolle der NO/cGMP-Signalkaskade bei der Lungenfibrose zu erforschen und die NO-GC in Perizyten-Subtypen zu detektieren wurden verschiedene Knockout-Mäuse der NO-GC generiert. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

1.9.1 Globaler Knockout der NO-GC (GCKO)

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Mauslinie generiert, bei der die β_1 -Untereinheit der NO-GC global deletiert ist. Dadurch ist das Enzym in allen Zellen des Organismus nicht mehr exprimiert. Hierfür wurde das Cre-lox-P-System verwendet, ein Rekombinations-System, mit dem DNA-Sequenzen gezielt entfernt oder rekombiniert werden können. Dazu wurden vor und hinter Exon 10 der β_1 -Untereinheit zwei loxP-Stellen positioniert. Diese Basensequenz fungiert als Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase (Cre). Die homozygot geflochten Mäuse (β_1 -flox/flox) werden mit Mäusen verpaart, die die Cre ubiquitär exprimieren. In der Folge bindet das Enzym an die loxP-Stellen und schneidet Exon 10 heraus. Der globale KO der NO-GC (GCKO) zeigt verschiedene pathophysiologische Veränderungen, wie Wachstumsretardierung und eine verminderte Lebenserwartung. 80% der Tiere sterben bereits innerhalb der ersten zwei Tage. Die überlebenden Tiere versterben innerhalb von 3-5 Wochen nach dem Absetzen vom Muttertier und dem damit verbundenen Wechsel zur Festnahrung, da sie eine stark verminderte gastrointestinale Motilität aufweisen (Friebe *et al.*, 2007). Deshalb erhalten die GCKO-Tiere eine ballaststoffarme Diät sowie einen Protonenpumpenhemmer (Omeprazol) und Natriumbikarbonat, womit die Überlebensrate deutlich steigt (Friebe *et al.*, 2007).

Das Ausschalten der NO-GC führt auch zu makroskopischen Veränderungen. Das *Caecum* ist stark vergrößert und die Gallenblase erweitert. Im kardiovaskulären System der GCKO-Tiere kommt es zu einer Erhöhung des systolischen Blutdruckes um 30 mmHg im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren. So konnte etwa gezeigt werden, dass in Aorten-Ringen die NO-vermittelte Relaxation komplett ausbleibt. In Thrombozyten von GCKO-Mäusen hemmt NO weder die Thrombin-induzierten Aggregation noch die ADP-induzierte Adhäsion oder den Thrombin-induzierten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Das

resultiert in einer stark reduzierten Blutungszeit und lässt darauf schließen, dass die NO-GC der einzige Rezeptor für NO in murinen Thrombozyten ist (Dangel *et al.*, 2010).

1.9.2 Perizyten-spezifische Knockout-Mäuse der NO-GC

In dieser Arbeit werden verschiedene Perizyten-spezifische Mauslinien eingesetzt. Bei den Perizyten handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation. Es gibt verschiedene Subtypen, die je nach Alter, Entwicklungszustand und Pathophysiologie unterschiedliche Funktionen übernehmen. Zudem exprimieren sie je nach Gewebe und Zeitpunkt unterschiedliche Marker (Hellstrom *et al.*, 1999; Gerhardt und Betsholtz, 2003; Chan-Ling *et al.*, 2004; Hughes und Chan-Ling, 2004; Bergers und Song, 2005). Ein häufig verwendeter Perizytenmarker ist PDGFR β .

Mäuse mit gefloxtem Exon 10 der β_1 -Untereinheit (β_1 -flox/flox) wurden mit PDGFR β -CreER^{T2}-Mäusen (Chen *et al.*, 2016) gekreuzt. Diese exprimieren CreER^{T2}, ein Fusionsprotein der Cre mit einer mutierten Form des humanen Estrogenrezeptors, unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors. Nach Bindung des synthetischen Estrogenrezeptor-Liganden Tamoxifen kann das zytoplasmatische Fusionsprotein in den Zellkern translozieren und dort die loxP-Stellen binden und schneiden. Somit wird die NO-GC nur in Zellen deletiert, in denen der PDGFR β -Promotor zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe aktiv ist. Tamoxifen wird an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert (1 mg intraperitoneal). 50 Tage später ist die NO-GC-Expression nicht mehr nachweisbar (Groneberg *et al.*, 2010). Unter Verwendung des gleichen Prinzips wurden zwei weitere Tamoxifen-induzierbare Mausmodelle generiert: der SMMHC-GCKO und der NG2-GCKO. Bei diesen Linien wird die Cre jeweils unter Kontrolle des *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*- (SMMHC) Promotors und des *Neural/Glial Antigen 2*- (NG2) Promotors exprimiert. Die NO-GC wird in zwei verschiedenen Perizyten-Subtypen deletiert. SMMHC-GCKO-Mäuse zeigen zudem einen Ausschnitt der NO-GC in glatten Muskelzellen.

2. Zielsetzung

Die NO/cGMP-Signalkaskade reguliert verschiedene physiologische Prozesse. Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthasen (NOS) generiert und bindet an den Rezeptor, die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC). Die aktivierte NO-GC katalysiert die Synthese des sekundären Botenstoffes cGMP. cGMP wiederum aktiviert Effektormoleküle, die die Wirkung des Signalmoleküls vermitteln. In der Lunge bewirkt es eine Bronchodilatation und Vasodilatation. Ebenso hat der Signalweg eine Bedeutung bei pathologischen Veränderungen wie der Organfibrose. Die Expression der NO-GC in der Lunge ist schon länger bekannt. Dennoch ist die exakte Lokalisation noch nicht erforscht. Daher sollte zunächst der spezifische NO-GC-exprimierende Zelltyp in der Lunge identifiziert werden:

- Nachweis der NO-GC-Expression in der Lunge mittels Immunhistochemie
- Deletion der NO-GC in der Lunge

Die Lungenfibrose ist eine chronisch progressive Erkrankung, deren zugrundeliegende Mechanismen noch weitgehend ungeklärt sind. Die Stimulation der NO/cGMP-Signalkaskade führt zu einer Verbesserung der Fibrose in verschiedenen Organen. Die NO-GC kann durch Interaktion mit dem TGF- β -Signalweg fibrotische Prozesse in der Lunge beeinflussen. Exogene Gabe von NO hemmt die Entwicklung der Lungenfibrose. Somit wird ein protektiver Effekt der NO/cGMP-Signalkaskade angenommen. Um die Rolle der NO-GC während fibrotischer Prozesse in der Lunge zu analysieren, wurden Untersuchungen an globalen NO-GC Knockout-Tieren (GCKO) sowie Perizyten-spezifischen Knockout-Tieren (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) durchgeführt. Durch Induktion einer Lungenfibrose mittels Bleomycin, sollten im zweiten Teil dieser Arbeit folgende Punkte näher untersucht werden:

- Analyse der fibrotischen Regionen in An- und Abwesenheit der NO-GC mittels Immunhistochemie
- Messung des Kollagengehalts und Trockengewichts der Lunge in An- und Abwesenheit der NO-GC

Als Effektorzellen der Lungenfibrose werden Myofibroblasten genannt. Diese Zellen sind für die exzessive Produktion von EZM verantwortlich. In neueren Studien werden neben Fibroblasten, Epithelzellen und weiteren Zelltypen vor allem Perizyten als Vorläuferzellen erwähnt. Daher sollten in diesem Teil der Arbeit unter Verwendung von Perizyten-spezifischen tdTomato Reportertermäusen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Charakterisierung von Myofibroblasten bei der Lungenfibrose mittels Immunhistochemie
- Differenzierung von Myofibroblasten-Subtypen durch die Expression von NO-GC
- Untersuchung des Schicksals von Perizyten bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose mittels Lineage Tracing
- Untersuchung des Schicksals von Myofibroblasten nach Auflösung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose mittels Lineage Tracing

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bleomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford-Reagenz (5-fach)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Appllichem, Darmstadt
Chloramin T Trihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Miglyol 812	Apotheke des Uniklinikums
Natriumacetat wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxyd	ChemSolute, Renningen
NDS	Biowest, Nuaille (F)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Perchlorsäure 60%	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese 30	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	ChemSolute, Renningen
SDS	Appllichem, Darmstadt
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trans-4-Hydroxy-L-prolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Zintronensäure-Monohydrat	ChemSolute, Renningen

3.1.2 Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β_1 -NO-GC, Kaninchen	1:800	eigene Herstellung
α -SMA FITC, Maus (Klon 1A4)	1:500	Sigma-Aldrich, München
CD31, Ratte	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
CD34 APC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
CD45 APC	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
col1 α 1, Kaninchen	1:500	Abcam, Cambridge (UK)
DAPI	1:1000	Appllichem, Heidelberg
Desmin, Ziege	1:200	Antibodies-online GmbH, Aachen
PDGFR β , Ziege	1:200	R&D Systems, Minneapolis (USA)

Alexa 594 anti-Ziege IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 647 anti-Ziege IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 488 anti-Kaninchen IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 555 anti-Kaninchen IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 488 anti-Ratte IgG	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β_1 -NO-GC Kaninchen	1:1000	eigene Herstellung
GAPDH	1:1000	Cell Signaling, Danvers (USA)
Histon H3	1:2000	Abcam, Cambridge (UK)
Kaninchen anti-Ziege IgG	1:100000	Jackson Laboratories, Newmarket (UK)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Genotypisierung

Alkalischer Lysepuffer

NaOH	1 M
KCl	50 μ M
pH 8,0	

Neutralisationspuffer

Tris/HCl	0,1 M
----------	-------

Immunhistochemie

PBS (10x Stocklösung)

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
ad 1000 ml H ₂ O dest	

Mowiol

Mowiol	12,0 g
H ₂ O	30 ml
0,2 M Tris pH 8.5	60 ml
Glycerol	30,0 g
DABCO	2,5%

PFA (4%ige Lösung)

PBS 1x	100 ml
Paraformaldehyd	40 g
NaOH (1N)	
HCl	

800 ml PBS wurden auf 60 °C erwärmt und 40 g Paraformaldehyd unter Zugabe von NaOH gelöst. Das Volumen wurde auf 1000 ml aufgefüllt und der pH auf 6,9 eingestellt.

Hydroxyprolin-Assay

HCl	6 M
------------	-----

Trans-4-Hydroxy-L-proline	1 mg/ml
----------------------------------	---------

Acetat-Citrat Puffer pH 6

Citronensäure	50 g
Natriumacetat (wasserfrei)	72 g
Natriumhydroxid	34 g
Essigsäure (96%ig)	12 ml
Ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Für den Gebrauch:	
Acetat-Citrat Puffer	50 ml
Aqua dest.	10 ml
1-Propanol	15 ml

Chloramin T Reagenz

Chloramin-T Trihydrat	1,41 g
H ₂ O dest.	10 ml
1-Propanol	10 ml
Acetat-Citrat Puffer	80 ml

Ehrlich's Reagenz

4-Dimethylaminobenzyldehyd	1,5 g
1-Propanol	6 ml
Perchlorsäure (60%ig)	2,6 ml
Ad 10 ml 1-Propanol	

Homogenisierungspuffer**TEA-Puffer**

NaCl	50 mM
TEA/HCl	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	2 mM

Proteaseinhibitoren

Benzamidin	1 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin	1 µM
Leupeptin	50 µM

Gelelektrophorese und Western Blot**Sammelgelpuffer pH 6,8**

SDS	0,4% (s/v)
Tris/OH	0,5 mM

Ponceau-S Reagenz

Trichloressigsäure	10% (w/v)
Tris/OH	0,2% (w/v)

Trenngelpuffer pH 8,8

SDS	0,4% (s/v)
Tris/OH	1,5 mM

Sammelgel (4%)

Acrylamid	0,4 ml
Aqua dest.	1,05 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml
TEMED	1,8 µl
APS (10%)	36 µl

Laufpuffer

Glycin	192 mM
Tris/OH	25 mM
SDS	0,1% (w/v)

Trenngel (12%)

Acrylamid	3 ml
Aqua dest.	2,58 ml
Sammelgelpuffer	1,88 ml
TEMED	7,5 µl
APS (10%)	75 µl

Probenpuffer nach Laemmli

Tris/OH	62,5 mM
Glycerin	10% (v/v)
β-Mercaptoethanol	5% (w/v)
SDS	1% (w/v)
Bromphenolblau	0,005% (w/v)

Transferpuffer

Glycin	192 mM
Tris/OH	25 mM
SDS	0,2% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

Waschpuffer (TBS-T)

NaCl	150 mM
Tris/OH	10 mM
Tween 20	0,1% (w/v)

3.1.5 Geräte und Software

Gerät	Produktbezeichnung	Hersteller
Binokular	SZ51	Olympus
CCD-Kamera	FluorChemSP	Alpha Innotech
Heizblock	TMix	Analytik Jena AG
Konfokalmikroskop	TCS SP5	Leica Microsystems
Konfokalmikroskop	TCS SP8	Leica Microsystems
Kryotom	CM3050	Leica Microsystems
Mikroplatten-Reader	Wallac 1420 Victor ²	Perkin Elmer
Mikrozentrifuge	Heraeus Biofuge Fresco	Kendro
Mini-Gelkammern	Mini-PROTEAN Tetra Cells	Bio-Rad
Nitrozellulosemembran	Whatman Protran BA 85	GE Health Care
Vakuumentrifuge	Speed Vac Concentrator	Bachofer Labora- toriumsgeräte
Software		Hersteller
Image J		Wayne Rasband (https://imagej.nih.gov/ij/)
LAS AF Lite		Leica Microsystems
Microsoft Excel 2013		Microsoft Windows
Microsoft PowerPoint 2013		Microsoft Windows
GraphPad Prism Software		GraphPad Software Inc.

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere und Präparation

3.2.1.1 Haltung und Zucht

Die verwendeten Mauslinien (GCKO, PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) wurden von Prof. Dr. Andreas Friebe zur Verfügung gestellt. In Abbildung 4 ist das entsprechende Kreuzungsschema veranschaulicht.

Die Mäuse wurden in genormten Makrolon-Typ-II-Käfigen (max. 4 adulte Tiere) oder Makrolon-Typ-II-long-Käfigen (max. 6 adulte Tiere) entsprechend allgemeiner Standards gehalten. Holzspäne wurde als Einstreu verwendet und Wasser und Futter *ad libitum* gereicht. GCKO-Mäuse zeigten einen gastrointestinalen Phänotyp und wurden daher mit einer ballaststoffarmen Diät (Altromin 1013) und einem Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol und Bikarbonat) gefüttert. Alle anderen Mauslinien erhielten eine Nager-Standarddiät (Altromin 1320).

Für die Zucht der Mauslinien wurden je zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygoten Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) verpaart. Die Nachkommen wurden 18 bis 21 Tage nach der Geburt von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

Für die Versuche zur Analyse einer induzierten Lungenfibrose wurden adulte Mäuse im Alter von 13-15 Wochen verwendet. Dabei wurden Tiere beider Geschlechter zu gleichen Anteilen eingesetzt. Eine Ausnahme stellt die SMMHC-GCKO-Linie dar. Das SMMHC-Cre-Transgen liegt auf dem Y-Chromosom, sodass nur männliche Nachkommen für die Versuche verwendet werden konnten.

Als Kontrollen für die GCKO-Mäuse wurden reine WT-Geschwister-Tiere und für die zellspezifischen induzierbaren Knockout-Mäuse heterozygote, Cre-exprimierende Geschwister-Tiere eingesetzt. Da kein Unterschied zwischen diesen Linien eruiert werden konnte, wurden für die Versuche sowohl heterozygote als auch reine WT-Tiere als Kontrollgruppe verwendet.

Weiterhin wurden zellspezifische tdTomato-Reporter-Mäuse generiert. Dazu wurde der Mausstamm Ai14 von Jackson verwendet, der ein rotes Fluoreszenzprotein exprimiert. Dem tdTomato-Gen vorgeschaltet befindet sich eine mit loxP-Stellen flankierte STOP-Kassette, die die Transkription des Gens verhindert. Die Kreuzung mit einer Mauslinie, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreER^{T2}) unter dem PDGFR β -Promotor, dem SMMHC-Promotor oder dem NG2-Promotor exprimieren resultiert in der Deletion der STOP-Kassette und führt zur Expression des tdTomato-Gens. Somit lässt sich eine spezifische Zellpopulation und die daraus entstehenden Nachkommen markieren, bei denen zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe der jeweilige Promotor aktiv war.

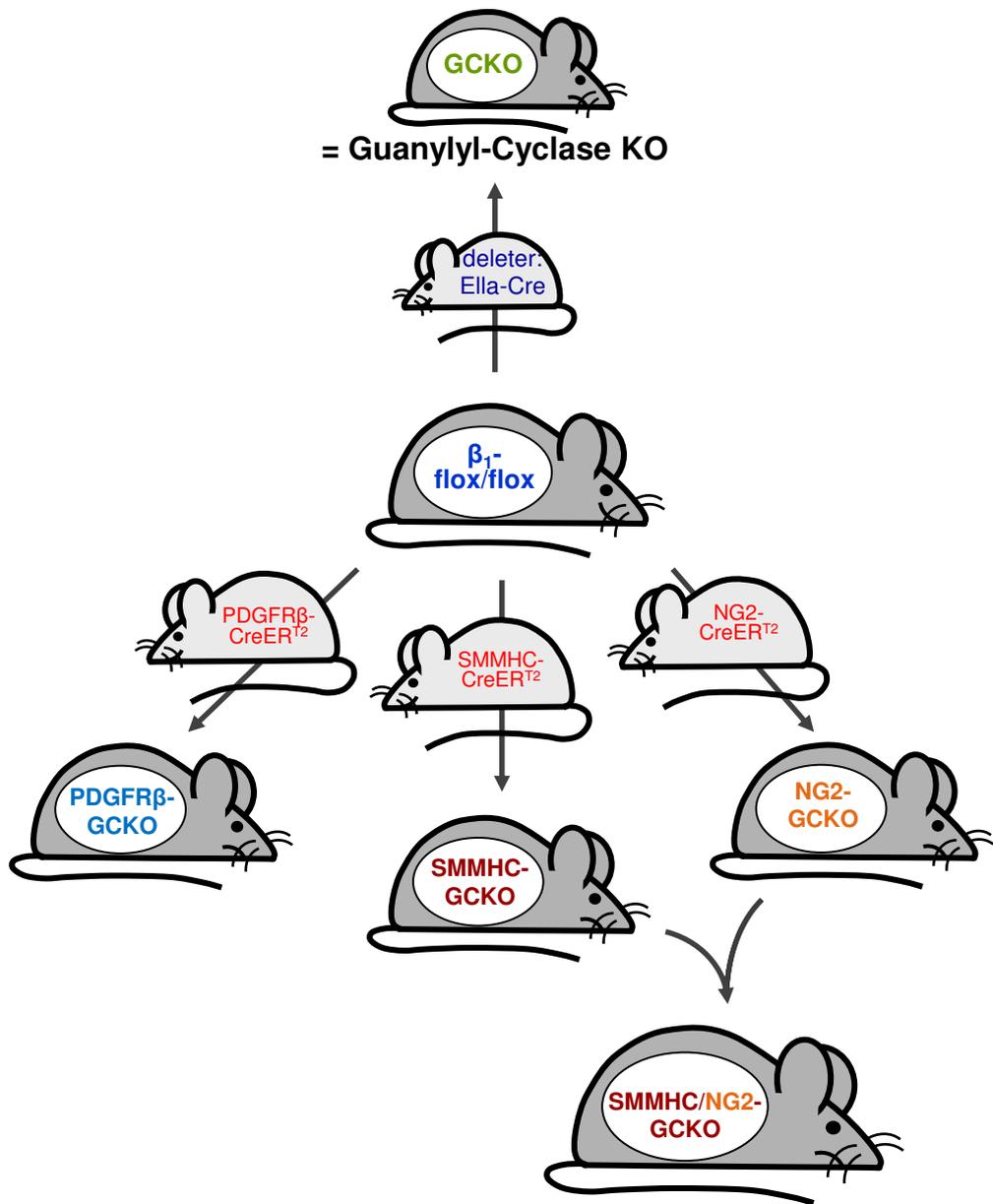


Abbildung 4: Generierung der globalen und Perizyten-spezifischen Knockout-Mäuse

Durch die Kreuzung von Mäusen mit gefloxtem Exon 10 der β_1 -Untereinheit der NO-GC (β_1 -flox/flox) mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimieren (Ella-Cre) entstanden globale Knockout-Mäuse (GCKO). Zur Generierung von Perizyten-spezifischen Knockout-Mäusen (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO und NG2-GCKO) wurden die β_1 -flox/flox-Mäuse mit Mäusen verpaart, bei denen die Cre unter Kontrolle des jeweiligen Promotors exprimiert wird (PDGFR β -CreER^{T2}, SMMHC-CreER^{T2} und NG2-CreER^{T2}). Um einen Doppel-Knockout zu erhalten wurden SMMHC-GCKO-Mäuse mit NG2-GCKO-Mäusen verpaart.

Neben den induzierbaren Reporter-mäusen (PDGFR β /tomato, SMMHC/tomato, NG2/tomato) wurden zwei nicht induzierbare Linien generiert. Bei der Tie2/tomato-Linie wurden tdTomato-Reporter-mäuse mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase konstitutiv unter dem Tie2-Promotor exprimieren. Für die Generierung der FoxD1 (*Forkhead Box D1*)/tomato-Linie wurden Reporter-mäuse mit einer Cre-Linie gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des FoxD1-Promotors exprimieren, der nur pränatal zwischen E12 und E15 aktiv ist. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 5 dargestellt.

3.2.1.2 Induktion der zellspezifischen Knockout-Tiere und tdTomato-Reporter-mäuse

Um die Cre-vermittelte Rekombination in den zellspezifischen Knockout-Tieren (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) und tdTomato-Reporter-mäusen (PDGFR β /tomato, SMMHC/tomato, NG2/tomato) zu induzieren, wurden 6 bis 8 Wochen alte Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen mit Tamoxifen (1 mg i.p.; gelöst in Miglyol 812) behandelt. Die Knockout-Tiere wurden erstmalig 50 Tage nach der letzten Injektion eingesetzt, da ab diesem Zeitpunkt ein vollständiger Verlust der NO-GC und ihrer physiologischen Funktion nachgewiesen werden konnte (Groneberg *et al.*, 2010).

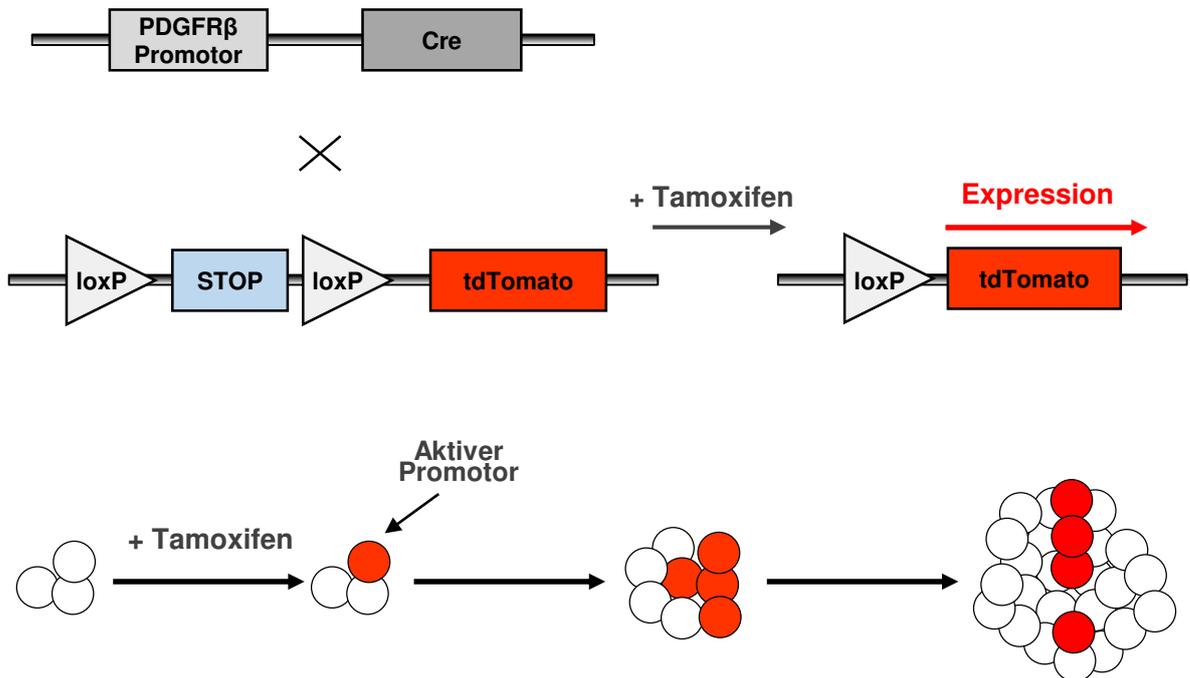
3.2.1.3 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps wurden Mäuse im Alter von 21 Tagen verwendet und entnommenes Gewebe von Ohrstanzen mittels der HotSHOT Methode lysiert (Truett *et al.*, 2000). Unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurden definierte DNA-Sequenzen gezielt vervielfältigt (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988a; Saiki *et al.*, 1988b). Diese konnten anhand ihrer unterschiedlichen negativen Ladung und Größe durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Zum Färben der Nucleinsäuren im Agarosegel wurde der Fluoreszenzfarbstoff GelRed (1:50.000) eingesetzt, der in die Basen der DNA interkaliert. Um die Banden sichtbar zu machen, wurde der interkalierte Farbstoff mit UV-Licht eines UV-Transilluminators angeregt und das emittierte Signal mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

3.2.2 Induktion der Lungenfibrose

Bei den zellspezifischen Knockout-Tieren (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) wurde die Deletion der NO-GC wie oben beschrieben im Alter von 6-8 Wochen durch Tamoxifen-Injektion induziert. Da eine vollständige Deletion nach 50 Tagen nachgewiesen werden konnte, wurden Tiere im Alter von 13-15 Wochen mit Bleomycin behandelt.

A



B

Reporter-Linie	Cre-Linie	Spezifität
tdTomato	PDGFRβ-CreERT ²	Perizyten/ Glattmuskelzellen
tdTomato	SMMHC-CreERT ²	Perizyten/ Glattmuskelzellen
tdTomato	NG2-CreERT ²	Perizyten
tdTomato	Tie2-CreER	Endothel
tdTomato	Foxd1-CreER	Mesenchymale Vorläuferzellen

Abbildung 5: Generierung von zellspezifischen tdTomato-Reporterermäusen

Dem tdTomato-Gen vorgeschaltet befindet sich eine mit loxP-Stellen flankierte STOP-Kassette, die die Transkription des Gens verhindert. Die Kreuzung mit einer Mauslinie, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreERT²) unter dem PDGFRβ-Promotor exprimiert resultiert in der Deletion der STOP-Kassette und führt zur Expression des tdTomato-Gens. Es lässt sich eine spezifische Zellpopulation und die daraus entstehenden Nachkommen markieren, bei denen zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe der Promotor aktiv war (A).

Übersicht über die generierten, zellspezifischen tdTomato-Reporterermäuse (B).

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verwendeten Mauslinien zu erreichen, wurden die globalen Knockout-Tiere und tdTomato-Reporter-Mäuse ebenfalls im gleichen Alter eingesetzt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Bleomycin-behandelte Gruppe und eine Kontrollgruppe, die das gleiche Volumen 0,9%ige Natriumchloridlösung (NaCl) erhält. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet, da keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu erwarten waren und sich auch im Verlauf der Versuche nicht zeigten. Zunächst wurden die Tiere gewogen, um die Dosierung von Bleomycin an das Körpergewicht anzupassen. Pro Maus sollte eine Dosis von 2,0 U/kg Körpergewicht in 2x100 µl 0,9% NaCl appliziert werden (Kono *et al.*, 2007; Bauman *et al.*, 2010; Degryse *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011; Gharib *et al.*, 2014). Die Mäuse wurden in drei Gewichtsgruppen von 18-22 g, 23-27 g, 28-32 g eingeordnet. Als Ausgangswert wurden jeweils 20, 25 und 30 g festgelegt und anhand dessen die zu verabreichende Bleomycin-Dosis errechnet.

Für die intratracheale Instillation von Bleomycin oder 0,9% NaCl (Kontroll-Vehikel) wurde die Maus unter Inhalationsnarkose mit Isofluran gesetzt. Anschließend wurde sie mit den Schneidezähnen auf einem horizontalen Draht fixiert und die Zunge mit einer stumpfen Klemme herausgezogen. Eventuell in der Mundhöhle verbliebene Nahrungsreste wurden entfernt, um eine Aspirationspneumonie zu verhindern. Nach dem Abflachen der Narkose wurden 100 µl Bleomycin-Lösung oder 0,9% NaCl in die Mundhöhle pipettiert und die Nase vollständig mit einer Klemme verschlossen, sodass eine vollständige Aspiration der Lösung über die *Trachea* erfolgen konnte. Nach erfolgreicher Instillation, die durch Bläschenbildung an den Nasenlöchern zu erkennen war, wurde eine weitere Applikation von 100 µl Lösung durchgeführt.

Die folgenden 21 beziehungsweise 56 Tage fand eine tägliche Kontrolle des Körpergewichts statt und die Tiere wurden auf Verhalten und Aussehen überprüft. An Tag 21 oder Tag 56 nach Bleomycin-Gabe wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Lunge wurde anschließend für histologische und molekularbiologische Analysen asserviert.

3.2.3 Immunhistochemie

3.2.3.1 Präparation der Lungen

Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert, durch zervikale Dislokation getötet und gewogen. Das Abdomen wurde geöffnet und die Maus durch Punktion der Bauchorta entblutet. Anschließend konnte der Thorax eröffnet und die Lunge einschließlich der Trachea freigelegt werden. Die Lunge wurde über die rechte Herzkammer mit 0,9%iger NaCl-Lösung blutleer gespült und mit 4% PFA vorfixiert. Unter der Trachea wurde ein Bindfaden hindurchgeführt und zunächst eine lockere Ligatur in Höhe des Ringknorpels (*Cartilago*

cricoidea) angelegt. Durch einen kleinen Schnitt zwischen Schildknorpel (*Cartilago thyroidea*) und Ringknorpel (*Cartilago cricoidea*) wurde eine 20 G Braunüle ohne Mandrin in die Trachea eingeführt. Über diese erfolgte die Hauptfixierung der Lunge mit 4% PFA bei einem Druck von 24 cm Wassersäule über dem Herzniveau. Nach vollständiger Füllung aller Lungenlappen, wurde die Spülkanüle aus der Trachea entfernt und die Ligatur fest zusammengezogen. Im Anschluss konnte die Lunge freipräpariert und einschließlich der *Trachea* und dem Herzen aus der Brusthöhle herausgetrennt werden. Es folgte eine Nachfixierung in 4% PFA für 20-30 Minuten in einem 50 ml Röhrchen.

3.2.3.2 Immunhistochemische Analyse

Für immunhistochemische Untersuchungen wurde die Lunge, wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben, präpariert und mit 4% PFA fixiert. Die einzelnen Lungenlappen wurden für die Herstellung von Kryoschnitten über Nacht (18-22 h) in 20% Saccharose bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Zum Anfertigen der Kryoschnitte (10 µm) wurde ein Kryotom benutzt. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten an der Luft getrocknet und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Es folgte die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (siehe Abschnitt 3.1.2) über Nacht bei 4°C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Es wurden jeweils zwei bis drei Primärantikörper aus verschiedenen Spezies miteinander kombiniert. Für den Nachweis von in Kaninchen hergestellten Primärantikörpern wurden in Eseln hergestellte Alexa 488- oder 555-konjugierte anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet. In Ratten hergestellte Primärantikörper wurden mit einem in Eseln hergestellten Alexa 488-konjugierten anti-Ratten IgG Antikörper und in Ziege hergestellte Antikörper mit einem Alexa 647-konjugierten anti-Ziege IgG Antikörper nachgewiesen. Die Kryoschnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert, wahlweise mit DAPI für 7 Minuten inkubiert und dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Mowiol eingedeckelt. Die Detektion erfolgte mit einem Konfokalmikroskop (SP5/SP8, Leica). Teilweise konnte eine Eigenfluoreszenz des Lungeninterstitiums und der Alveolarmakrophagen bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm und einer geringen Laserleistung beobachtet werden. Alle anderen verwendeten Anregungslaser des Konfokalmikroskops führten zu keiner Eigenfluoreszenz der Lunge. Antikörper-spezifische Färbungen ließen sich bereits bei geringer Laserleistung identifizieren. Um die Struktur des Lungengewebes sichtbar zu machen, wurde Interferenzkontrast- (*Differential Interference Contrast*, DIC) und Polarisationsmikroskopie (Pol) verwendet. Im Durchlichtbild erscheint die Probe durch Bildkontraste plastisch. Somit werden Unterschiede in der Dichte von Strukturen sichtbar gemacht.

3.2.4 Biochemische Untersuchungen der Lunge

Zwischen den Epithelien benachbarter Alveolen befindet sich die Alveolarwand, ein dünnes Bindegewebsseptum, das aus einem Netzwerk retikulärer, elastischer und einiger kollagener Fasern aufgebaut ist. Die Dehnung und Retraktion der Lunge wird vor allem durch die elastischen Fasern ermöglicht. Bei der Lungenfibrose kommt es aufgrund abnormaler Wundheilungsprozesse zu einer vermehrten Bildung von Kollagen (Fibrosierung). Dieses lagert sich zwischen den Alveolen ab und führt zu einer fortschreitenden Vernarbung und Versteifung der Lunge. Somit lassen sich durch die Messung des Kollagengehalts sowie die Bestimmung des Trockengewichts fibrotische Veränderungen der Lunge nachweisen.

3.2.4.1 Kollagen-Assay

Die Quantifizierung des Kollagengehalts in Lungengewebe wurde mittels einer von Woessner (1961) etablierten und durch Stegemann und Stalder (1967) modifizierten Methode durchgeführt. Dabei wird die Menge an Hydroxyprolin in Gewebehydrolysaten bestimmt. Kollagen ist eines der wenigen Proteine in Vertebraten, das die α -Aminosäure Hydroxyprolin zu einem hohen Anteil von 13,5% enthält. Der Hydroxyprolingehalt in Elastin, einem weiteren Bindegewebsprotein, liegt bei lediglich 1,8% und kann somit für die Bestimmung des Kollagengehalts vernachlässigt werden. Bei dem hier verwendeten Assay handelt es sich um eine kolorimetrische Methode. Die Konzentration von Hydroxyprolin in einer unbekanntem Gewebeprobe wird in flüssiger Phase durch Vergleichsmessung einer Standardkurve mit bekannten Mengen von Hydroxyprolin ermittelt. Durch Säurehydrolyse der Polypeptidketten des Kollagens wird das Peptid-gebundene Hydroxyprolin freigesetzt. Die schrittweise Oxidation von Hydroxyprolin zu Pyrrol erfolgt durch Chloramin T. Pyrrol formt mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd ein Chromophor, das für mindestens eine Stunde stabil ist. Die Absorption wird mittels eines Photometers gemessen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 565 nm. Der Hydroxyprolingehalt der Proben, lässt sich anhand der Standardkurve ermitteln.

Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Lunge wurde über die linke Herzkammer circa dreimal mit 0,9% NaCl blutleer gespült. Für die Messung des Kollagengehalts wurde der linke Lungenlappen exzidiert und bei 80°C getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts folgte die Hydrolyse des Gewebes mit 6 M HCl (100 μ l pro 1 mg) bei 115 °C für 18-24 Stunden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit Gummidichtung. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für zwei Minuten wurden 200 μ l des Überstands in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch vollständiges Trocknen des Hydrolysates in einer Vakuumzentrifuge unter Zufuhr von Wärme erfolgte das Entfernen von überschüssiger Salzsäure. Das Pellet wurde in 200 μ l Wasser

resuspendiert und 1:40 in einem Volumen von 200 µl Wasser verdünnt. Es wurden jeweils Triplikate der Proben angefertigt. Zur Herstellung einer Standardreihe aus einer Trans-4-Hydroxy-L-Prolin-Stocklösung (1 mg/ml in Wasser) wurden 8 Konzentrationen mit einem Volumen von 200 µl in Duplikaten angesetzt (von 0,4-50 µg/ml). Die Gewebeproben und Standards wurden mit 100 µl Chloramin T Reagenz für 20 Minuten bei Raumtemperatur und offenem Deckel inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Ehrlich's Reagenz hinzu pipettiert und das Gemisch sorgfältig geschüttelt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Inkubation erfolgte bei 60 °C für 15 Minuten. Nach Abkühlen der Proben wurden jeweils 150 µl in eine Mikrotiterplatte transferiert. Die Absorption konnte photometrisch bei 560 nm bestimmt werden. Der Hydroxyprolinegehalt wurde anhand der Standardreihe bestimmt und daraus der Kollagengehalt der Lungen pro mg Trockengewicht errechnet. Für die statistische Auswertung wurde der Kollagengehalt unter Berücksichtigung des Trockengewichts der Lunge und des Endgewichts der Maus ermittelt. Der Kollagengehalt aller Bleomycin-behandelten und unbehandelten Genotypen wurde im Vergleich zum unbehandelten WT errechnet und dargestellt.

3.2.5 Western Blot

3.2.5.1 Herstellung der Lungenhomogenate

Lungen wurde wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben freipräpariert und zunächst über die rechte Herzkammer mit 0,9% NaCl bis zur Blutfreiheit gespült. Anschließend wurden die Lungen entnommen und gegebenenfalls bei -20 °C asserviert.

Eingefrorene Lungen wurden auf Eis angetaut und gewogen. Für die Homogenisierung wurden 70-90 mg Gewebe eingesetzt. Unter Verwendung der 5x Menge Homogenisierungspuffer wurde das Gewebe in einem vorgekühlten Glas/Glas-Homogenisator mit einem drehzahlvariablen Rührwerk (30 Hübe, 500 U/min) homogenisiert. Nicht-lösliche Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C entfernt. Die Lungenhomogenate wurden anschließend mit 4x Laemmli versetzt, bei 95 °C 5 Minuten denaturiert und konnten bei -20 °C bis zur Durchführung der Gelelektrophorese aufbewahrt werden.

3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (Bradford, 1976) ist eine kolorimetrische Methode, bei der der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* in saurer Lösung Komplexe mit Proteinen bildet. Durch die Komplexbildung findet eine Verschiebung des Absorptionsspektrums von 470 nm auf 595 nm statt. Lungenhomogenate wurden 1:200 mit 1x PBS verdünnt. Jeweils 20 µl der Proben und des Standards (0-0,1 mg/ml Rinderserumalbumin) wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl

Bradford-Reagenz und Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 590 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Unter Verwendung der mit Rinderserumalbumin erstellten Eichgeraden konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

3.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der verwendeten diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden die Lungenhomogenate mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Das darin enthaltene Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol führt zur Spaltung der Disulfidbrücken, die die Tertiärstruktur von Proteinen stabilisieren. Das denaturierende Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die hydrophoben Aminosäurereste der in ihre Primärstruktur zerlegten Proteine, die dadurch mit einer negativen Ladung versehen werden. Die Herstellung eines 7,5%iges SDS-Polyacrylamid Gels erfolgte in 1,5 mm dicken Mini-Gelkammern. Die versetzten Proteine wurden parallel mit einem Protein-Größenstandard aufgetragen und anschließend in einem elektrischen Feld für circa eine Stunde mit einer Stromstärke von 45 mA aufgetrennt.

3.2.5.4 Blotting

Zur Visualisierung und spezifischen Identifikation der Proteine werden diese nach der von Towbin et al. (1979) entwickelten Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde in Elektrophorese-Transfer-Modulen in Mini-Gelkammern für eine Stunde bei 320 mA und konstanter Kühlung durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 3 Minuten mit Ponceau-S bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die temporäre Färbung aller Proteine konnte ein erfolgreicher Proteintransfer überprüft werden. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS-T wurde diese mit RotiBlock für 30 Minuten geblockt, um freie Proteinbindestellen abzusättigen und somit eine Bindung von unspezifischen Antikörpern zu vermeiden. Entsprechend der nachzuweisenden Proteine, wurde die Membran in mehrere Stücke geschnitten. Diese wurden in spezifischen primären Antikörper-Lösungen (in 3% Ovalbumin (w/v) in TBS-T) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem Immunglobulin-spezifischen Sekundärantikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (in 3% Ovalbumin (w/v) in TBS-T), für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Unter Verwendung des *SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrates* von Thermo Scientific wurde die freigesetzte Chemilumineszenz mit einer gekühlten 16-bits CCD-Kamera detektiert.

3.2.6 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, wobei n die Anzahl der verwendeten Tiere bezeichnet. Die statistische Analyse der Daten wurde mithilfe der Software GraphPadPrism 5.0 durchgeführt. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen wurde der zweiseitige Mann-Whitney-U Test verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der Lunge

4.1.1 NO-GC-Expression in der Lunge

Die NO-GC wird sehr stark in der Lunge im Vergleich zu anderen Geweben exprimiert. Daher wurde das Enzym erstmals aus Ratten- und Rinderlungen isoliert (Garbers, 1979; Humbert *et al.*, 1990). Die genaue Lokalisation der NO-GC in der Lunge ist jedoch noch nicht bekannt. Um den NO-GC-exprimierenden Zelltyp zu identifizieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 6). Dazu wurde Lungengewebe von WT-Tieren mit dem spezifischen Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC (rot) und jeweils gegen die beiden häufig verwendeten Perizytenmarker Desmin und PDGFR β (jeweils grün) gefärbt. Abbildung 6A zeigt die Kolokalisation des Desmin- und NO-GC-Signals in interstitiellen Zellen des Lungenparenchyms. Zudem war die NO-GC-Immunfluoreszenz in allen PDGFR β -positiven Zellen des Lungenparenchyms zu sehen (siehe Abbildung 6C). Bei stärkerer Vergrößerung dieser Desmin/NO-GC-positiven und PDGFR β /NO-GC-positiven Zellen war der multipolare Aufbau mit mehreren zellulären Ausläufern zu erkennen (siehe Abbildung 6B und 6D). Ebenso wurde Lungengewebe von WT-Tieren mit Antikörpern gegen CD31 und α -SMA inkubiert. Dadurch ließen sich jeweils Endothelzellen und Glattmuskelzellen des Lungenparenchyms anfärben (Abbildung 7). Die NO-GC-Immunfluoreszenz konnte in unmittelbarer Nähe zu CD31-positiven Zellen detektiert werden. Eine Gelbfärbung und somit Kolokalisation der Signale konnte nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 7A). Vielmehr winden sich die NO-GC-exprimierenden Zellen mit ihren zellulären Ausläufern um das CD31-positive Endothel. Zudem trat eine Kolokalisation des NO-GC-Signals mit dem α -SMA-Signal auf, was auf eine Expression der NO-GC in Glattmuskelzellen von Blutgefäßen der Lunge hindeutet. Diese war jedoch deutlich geringer als in den umliegenden NO-GC-positiven Zellen. α -SMA-positive Zellen konnten ausschließlich in der Wand von Gefäßen detektiert werden und nicht in anderen Zellen des Lungenparenchyms (siehe Abbildung 7B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die NO-GC hauptsächlich in Lungenperizyten exprimiert wird. Diese konnten anhand ihrer Form, Lokalisation und Expression von zwei verschiedenen Perizytenmarkern identifiziert werden.

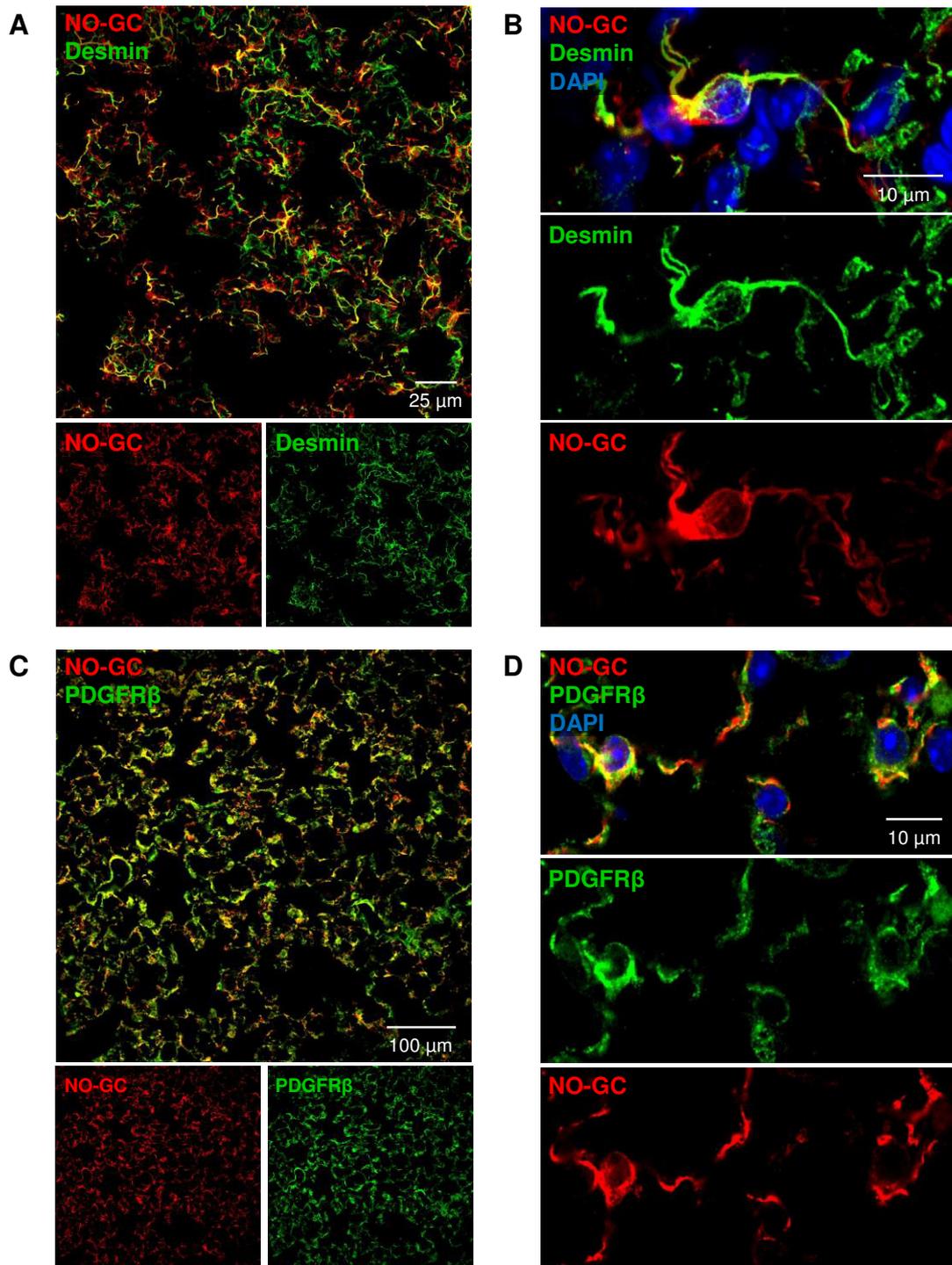
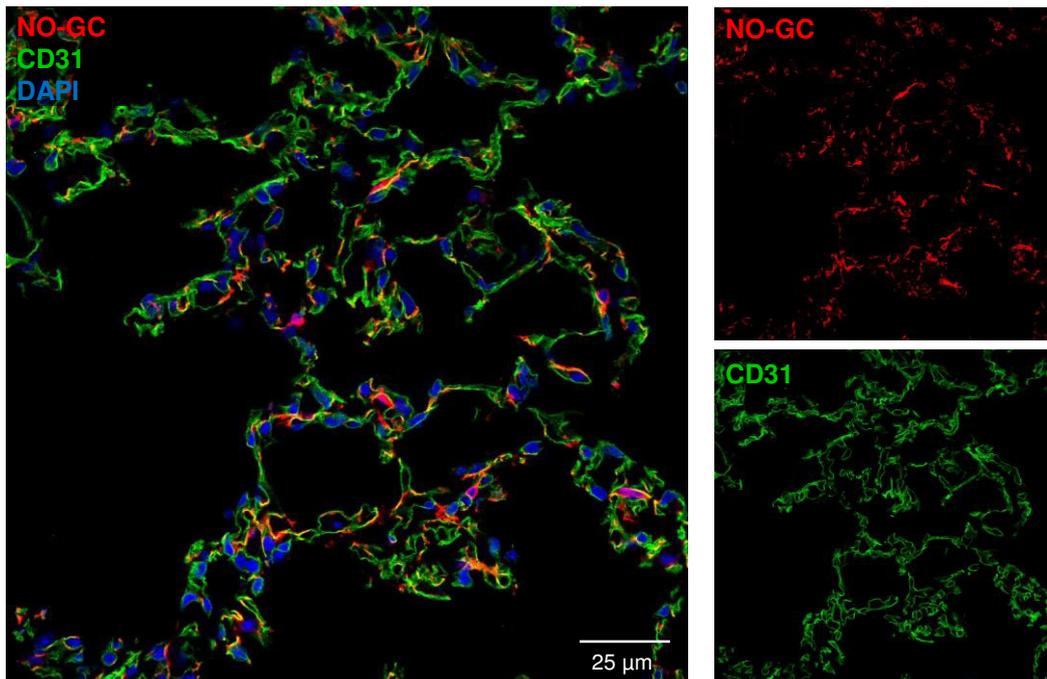


Abbildung 6: Expression der NO-GC in der murinen Lunge

Es wurden Doppelfärbungen von Lungenschnitte eines WT-Tieres unter Verwendung von Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC (rot) und Desmin oder PDGFR β (grün) durchgeführt. Gelbe Signale in den Überlagerungsbildern zeigen eine Kolokalisation der NO-GC mit den Perizytenmarken Desmin (A) und PDGFR β (C). In detaillierten Aufnahmen (B und D) sind gelbe Färbungen bei Kolokalisation der beiden Antikörper sowie die fingerartigen Fortsätze der Zellen zu erkennen. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

A



B

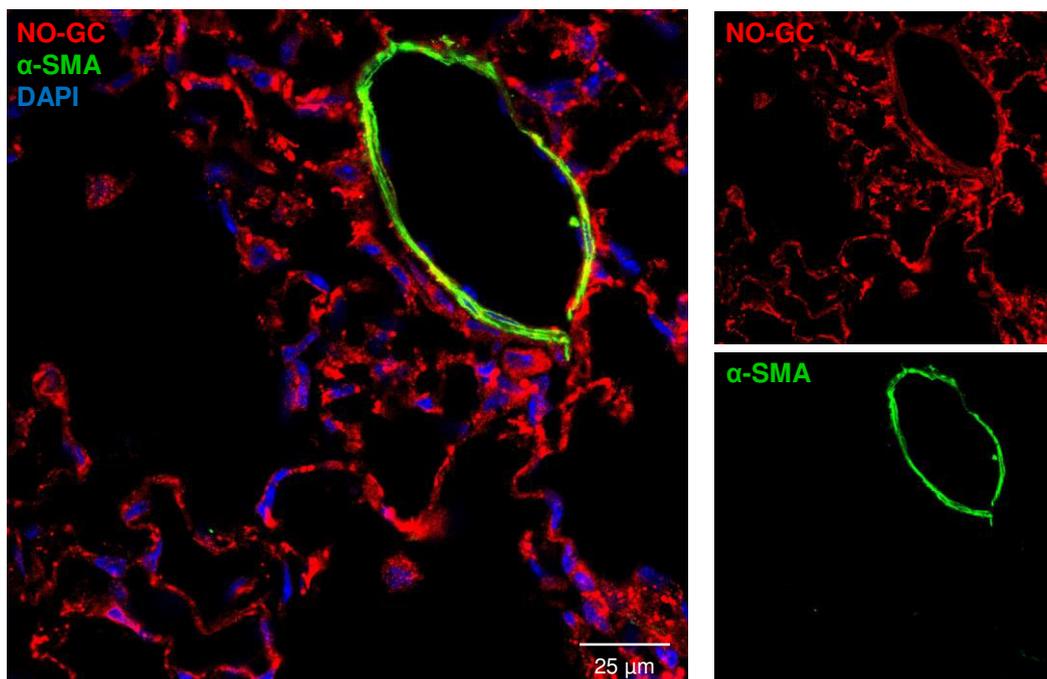


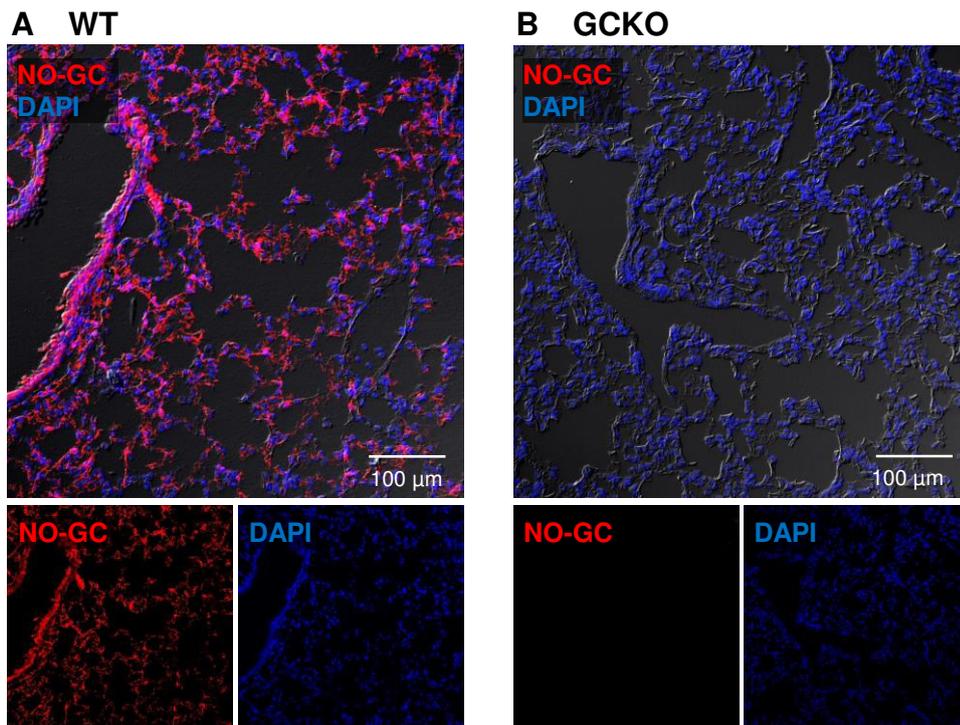
Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der Lunge

Es wurden Doppelfärbungen von Lungenschnitten eines WT-Tieres unter Verwendung von Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC (rot) und CD31 oder α -SMA (grün) durchgeführt. Im Überlagerungsbild sind Signale für die NO-GC und CD31 in unmittelbarer Nähe. Eine Gelbfärbung und somit Kolo-kalisation der beiden Antikörper ist nicht zu erkennen (A). Das Überlagerungsbild zeigt eine Gelbfärbung und somit Kolo-kalisation von NO-GC und α -SMA in der Wand eines Blutgefäßes (B). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

4.1.2 Deletion der NO-GC

Um die immunhistochemischen Aussagen bezüglich der exklusiven Expression der NO-GC in Lungenperizyten zu überprüfen, wurden globale und Perizyten-spezifische KO-Mäuse der NO-GC verwendet. Zunächst wurde die Lunge von Mäusen untersucht, in denen die NO-GC global nicht mehr exprimiert ist (GCKO-Mäuse). Wie zu erwarten war im Gegensatz zu WT-Tieren die NO-GC-spezifische Färbung von Zellen innerhalb des Lungenparenchyms von GCKO-Tieren vollständig verschwunden (Abbildung 8A und 8B). Somit konnte die Spezifität des NO-GC-Antikörpers nachgewiesen werden. Um die histologischen Beobachtungen zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen mit Lungengewebe von WT- und GCKO-Tieren durchgeführt. Die NO-GC wurde mit dem spezifischen Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit sichtbar gemacht. Bei der WT-Lunge konnte eine Proteinbande bei circa 70 kDa detektiert werden, die im GCKO nicht mehr auftrat (Abbildung 8C). Western Blot-Daten bestätigten somit die vollständige Deletion der NO-GC in Lungengewebe von GCKO-Tieren.

Um die identifizierten NO-GC-exprimierenden Perizyten zu differenzieren, wurden verschiedene zellspezifische Cre-Linien verwendet. Die PDGFR β -CreER^{T2}-Linie ermöglicht eine induzierbare, Cre-vermittelte Gendeletion in präkapillären Glattmuskelzellen und kapillären Perizyten (Chen *et al.*, 2016). Interessanterweise führte die Induktion der PDGFR β -spezifischen Cre wie in Lungengewebe der GCKO-Tiere zu einem vollständigen Verlust der NO-GC-Expression (PDGFR β -GCKO; Abbildung 9A). Dies deutete auf eine Expression der NO-GC in allen PDGFR β -positiven Perizyten hin (siehe Abbildung 8C). Zudem war die Expression der NO-GC auch in Blutgefäßen und Bronchiolen nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 9A). Dementsprechend wird die PDGFR β -spezifische Cre-Rekombinase neben Perizyten auch in anderen muralen Zellen wie zum Beispiel Glattmuskelzellen induziert. In der SMMHC-GCKO-Lunge wurden weniger NO-GC-Signale detektiert als in der WT-Lunge. In Glattmuskelzellen war, wie zu erwarten, kein Signal mehr zu sehen (Abbildung 9B). Somit konnte eine Deletion der NO-GC in Glattmuskelzellen und zum größten Teil in Perizyten nachgewiesen werden. In Lungengewebe aus NG2-GCKO-Tieren konnte ein NO-GC-Fluoreszenzsignal detektiert werden, das dem von WT-Tieren in Ausmaß und Intensität gleicht (Abbildung 9C). Lungen aus Doppel-GCKO-Tieren (SMMHC + NG2) dagegen wiesen keine NO-GC-Fluoreszenz auf. Folglich zeigte erst der Doppel-GCKO eine vollständige Deletion der NO-GC, wie sie auch im PDGFR β -GCKO zu beobachten war (Abbildung 9D). Die Ergebnisse der globalen und Perizyten-spezifischen KO-Mäuse bestätigen, dass die NO-GC in zwei unterschiedlichen Perizyten-Subtypen exprimiert wird: In PDGFR β /SMMHC-positiven Perizyten und in PDGFR β /NG2-positiven Perizyten. Diese stellen nur eine kleine Untergruppe der Perizyten-Population in der Lunge dar.



C

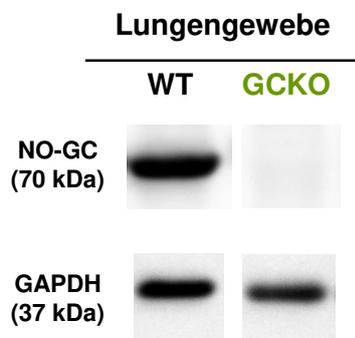
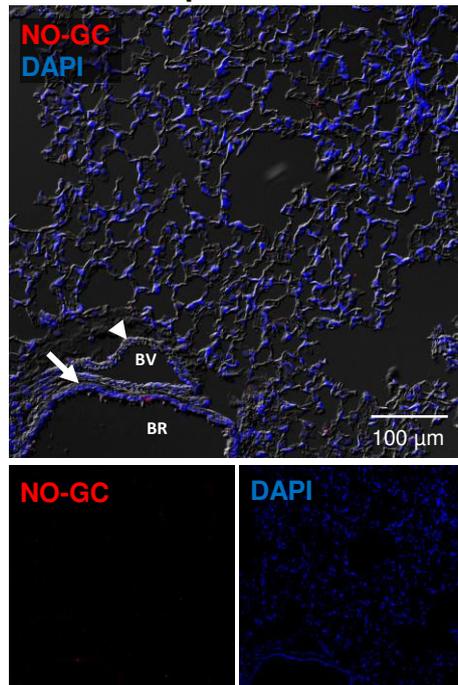


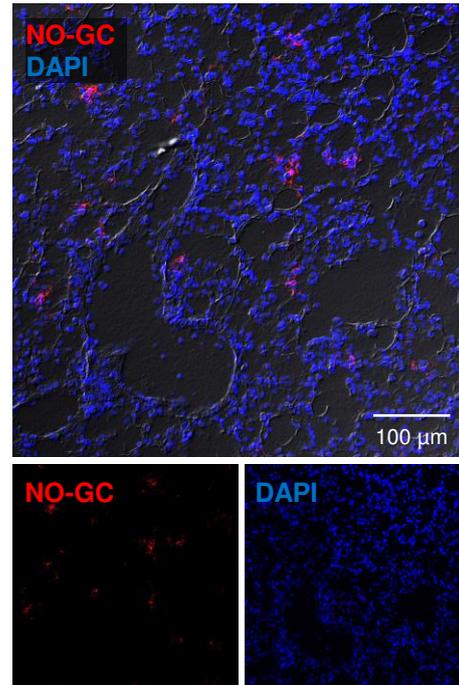
Abbildung 8: Deletion der NO-GC in murinem Lungengewebe

Lungenschnitte von WT- und GCKO-Tieren wurden mit dem spezifischen Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit der NO-GC gefärbt. In der WT-Lunge sind NO-GC-positive Zellen (rot) in der Alveolarwand und in SMC der Bronchien und Blutgefäße zu sehen (A). In der GCKO-Lunge fehlen die NO-GC-Signale (B). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). Western Blot-Analyse von Lungenhomogenaten aus WT- und GCKO-Tieren. Die Expression der NO-GC wurde mit dem spezifischen Antikörper gegen die β_1 -Untereinheit detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt (C).

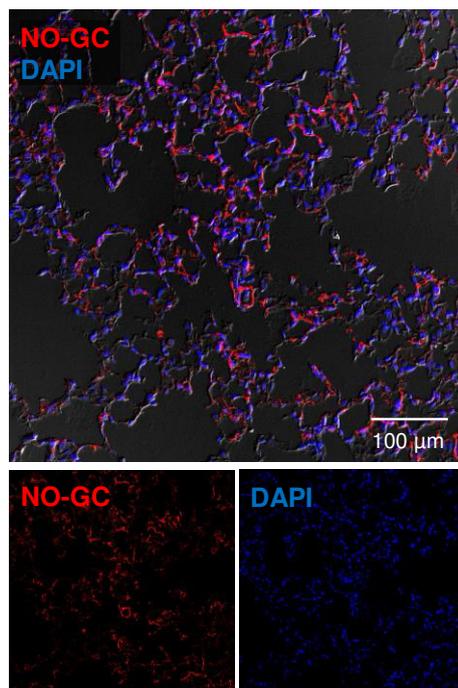
A PDGFR β -GCKO



B SMMHC-GCKO



C NG2-GCKO



D SMMHC/NG2-GCKO

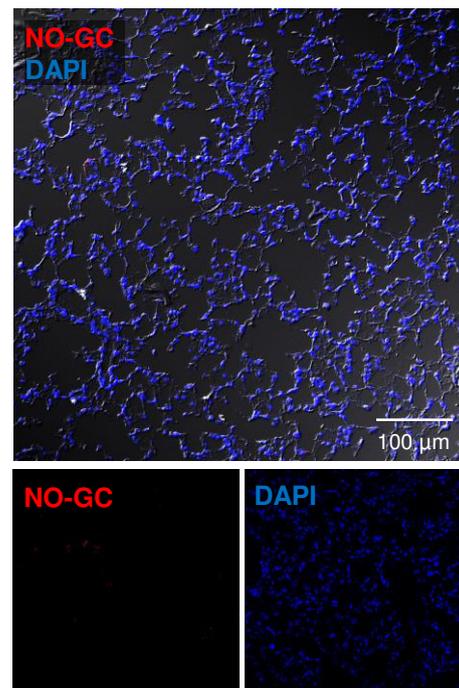


Abbildung 9: Promotor-spezifische Deletion der NO-GC in murinen Lungenperizyten

Deletion der NO-GC unter Verwendung der Tamoxifen-induzierbaren PDGFR β -CreER^{T2}, führt zu einem Verlust der NO-GC-Färbung in Perizyten und SMC in Blutgefäßen (Pfeilspitzen) und Atemwegen (A; Pfeil). Deletion der NO-GC unter Verwendung der Tamoxifen-induzierbaren SMMHC-CreER^{T2} zeigt keinen vollständigen Verlust der NO-GC (B). Deletion der NO-GC unter Verwendung der Tamoxifen-induzierbaren NG2-CreER^{T2} führt zu einem geringen Verlust des NO-GC-Signals (C). Der SMMHC/NG2-GCKO zeigt einen vollständigen Verlust der NO-GC (D). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). BR = Bronchiole; BV = Blutgefäß.

4.1.3 Lokalisation der NO-GC in zellspezifischen Reporterermäusen

Perizyten stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar (Armulik *et al.*, 2011). Es gibt verschiedenen Subtypen, die sich in der Expression von Markern je nach Entwicklungsstatus und Organ unterscheiden. Häufig verwendete Marker sind PDGFR β , NG2, Desmin und α -SMA (Diaz-Flores *et al.*, 2009). Um nachzuweisen, ob eine Expression dieser Gene stattfindet, wurden zellspezifische Reporterermäuse untersucht. In dieser Arbeit wurden ausschließlich tdTomato-Reporterermäuse verwendet. Die Expression von tdTomato (im Folgenden tomato abgekürzt) wurde durch die Gabe von Tamoxifen induziert.

PDGFR β /tomato-Mäuse

Die generierten Reporterermäuse wurden 36 Tage nach der letzten Injektion von Tamoxifen euthanasiert, Lungen entnommen und fixiert (Abbildung 10A). Zellen, die tomato unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors exprimieren (rot), waren gleichmäßig im Lungenparenchym verteilt. Es zeigte sich ein intensives Fluoreszenzsignal in den Zellkernen, wohingegen die zellulären Ausläufer schwächer angefärbt waren. Die Inkubation mit Antikörpern gegen PDGFR β und die NO-GC (beide grün) zeigte jeweils eine Kolokalisation im Überlagerungsbild (Abbildung 10B und 10C). Da die Fluoreszenzfärbung der Antikörper im Gegensatz zum tomato-Signal vor allem im Zytoplasma und den Zellausläufern auftrat, war keine typische Gelbfärbung erkennbar, die üblicherweise eine Kolokalisation von Proteinen anzeigt.

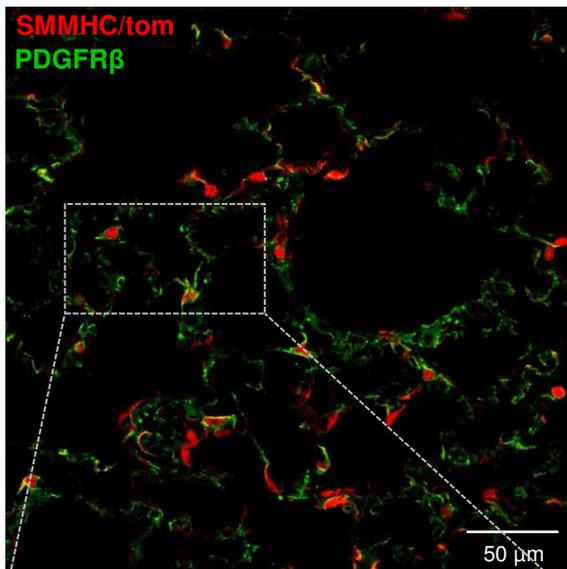
SMMHC/tomato-Mäuse

SMMHC/tomato-Mäuse exprimieren nach Induktion der Cre-Rekombinase tomato (rot) in den Glattmuskelzellen der Blutgefäße und in Zellen des Lungenparenchyms (Abbildung 11). Auch hier war eine Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes im Zellkern zu sehen. Die tomato-exprimierenden Zellen waren ebenfalls gleichmäßig im Lungenparenchym verteilt und in gleicher Anzahl vorzufinden wie in Lungengewebe von PDGFR β /tomato-Mäusen. Um die Zellen näher zu charakterisieren, wurden Färbungen mit Antikörpern gegen PDGFR β (siehe Abbildung 11A, grün) und NO-GC (siehe Abbildung 11B, grün) durchgeführt. Durch die Inkubationen mit diesen Antikörpern konnte jeweils eine Kolokalisation der beiden Proteine mit dem tomato-Signal gezeigt werden.

NG2/tomato-Mäuse

In Lungengewebe von NG2/tomato-Mäusen konnte eine Expression des Fluoreszenzfarbstoffes (rot) in einzelnen, gleichmäßig verteilten Zellen detektiert werden (Abbildung 12). Auch diese Zellen hatten mehrere zelluläre Ausläufer und glichen somit morphologisch tomato-exprimierenden Zellen der PDGFR β /tomato- und SMMHC/tomato-

A SMMHC/tomato



B SMMHC/tomato

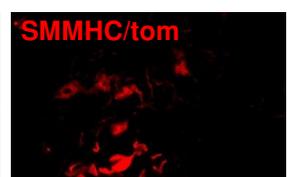
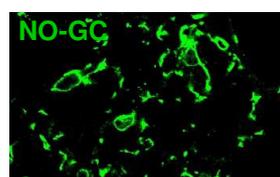
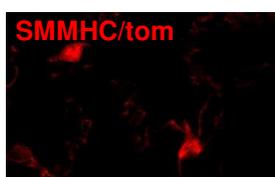
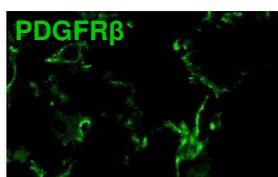
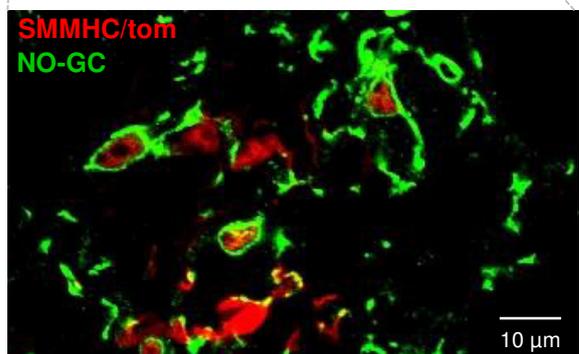
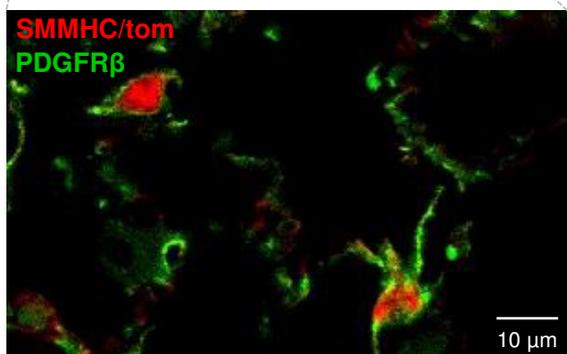
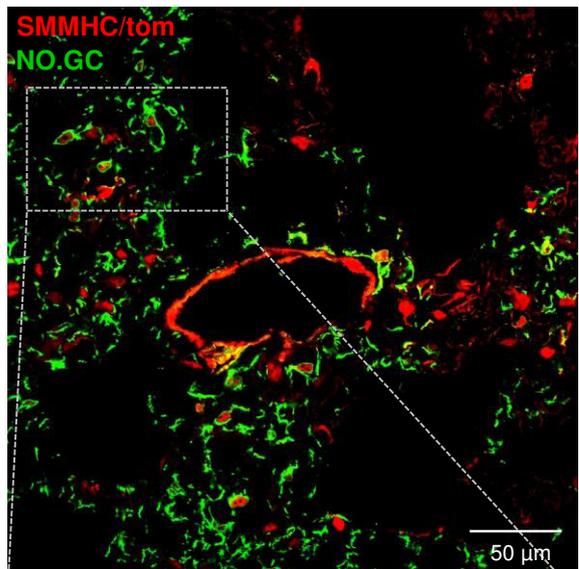
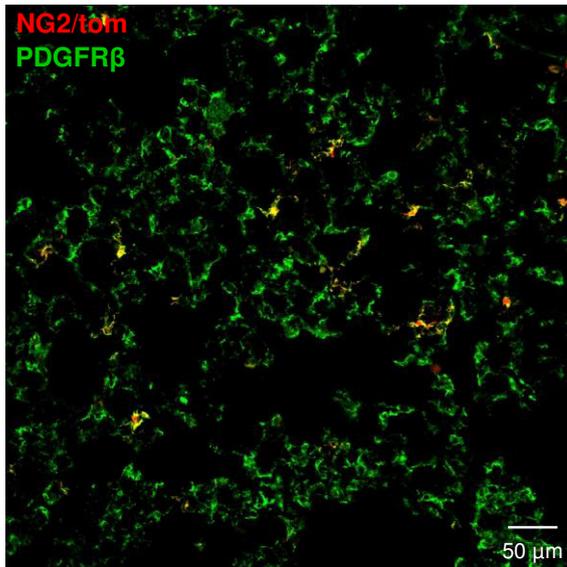


Abbildung 11: Lineage Tracing von SMMHC-positiven Zellen in der gesunden Lunge

Lungenschnitte von SMMHC/tomato-Reportermäusen wurden mit Antikörpern gegen PDGFR β (A) oder NO-GC (B) gefärbt. Eine starke Expression von tdTomato (PDGFR β /tomato; rot) ist in Zellkernen zu erkennen, während das Zytoplasma nur schwach fluoresziert. Die Überlagerungsbilder zeigen, dass alle PDGFR β -positiven Zellen (grün) tdTomato (rot) exprimieren. Alle NO-GC-positiven Zellen (grün) exprimieren tdTomato (rot).

A NG2/tomato



B NG2/tomato

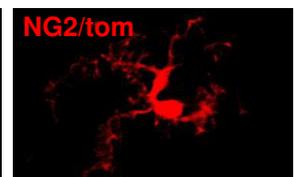
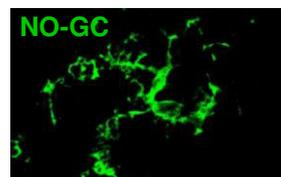
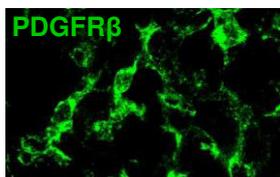
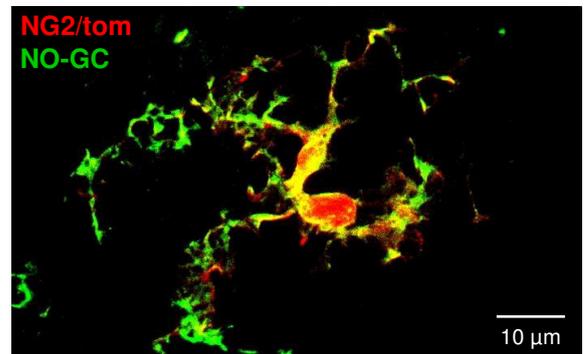
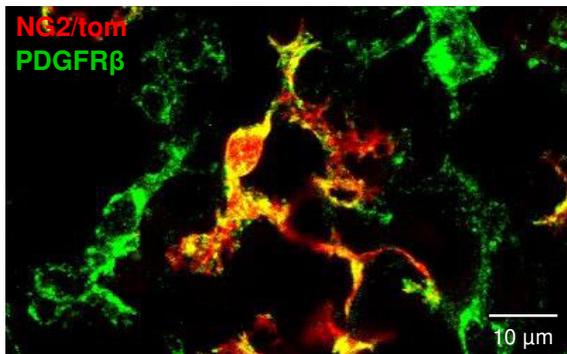
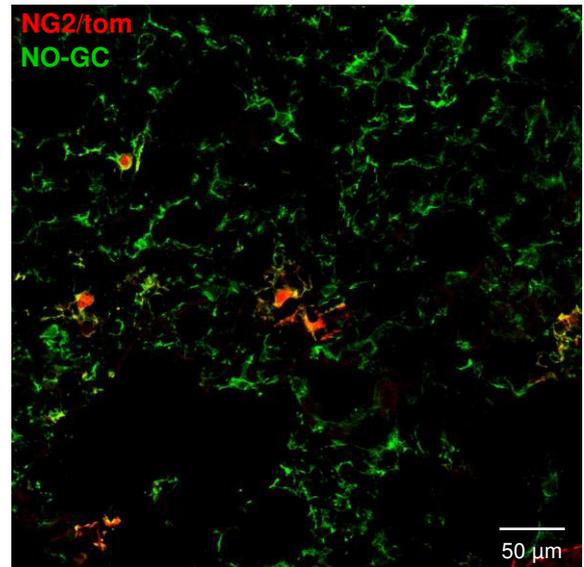


Abbildung 12: Lineage Tracing von NG2-positiven Zellen in der gesunden Lunge

Lungenschnitte von NG2/tomato-Reporterermäusen wurden mit Antikörpern gegen PDGFR β (A) oder NO-GC (B) gefärbt. Eine starke Expression von tdTomato (PDGFR β /tomato; rot) ist in Zellkernen zu erkennen, während das Zytoplasma nur schwach fluoresziert. Die Überlagerungsbilder zeigen, dass alle PDGFR β -positiven Zellen (grün) tdTomato (rot) exprimieren. Alle NO-GC-positiven Zellen (grün) exprimieren tdTomato (rot).

Mäuse (siehe Abbildung 10 und 11). Kofärbung mit Antikörpern gegen PDGFR β (siehe Abbildung 12A, grün) und die NO-GC (siehe Abbildung 12B; grün) belegte, dass alle tomato-exprimierenden Zellen sowohl PDGFR β als auch NO-GC-positiv sind. Hingegen zeigten jedoch nicht alle NO-GC- und PDGFR β -positiven Zellen eine Expression von tomato (siehe Abbildung 12B).

Tie2/tomato-Mäuse

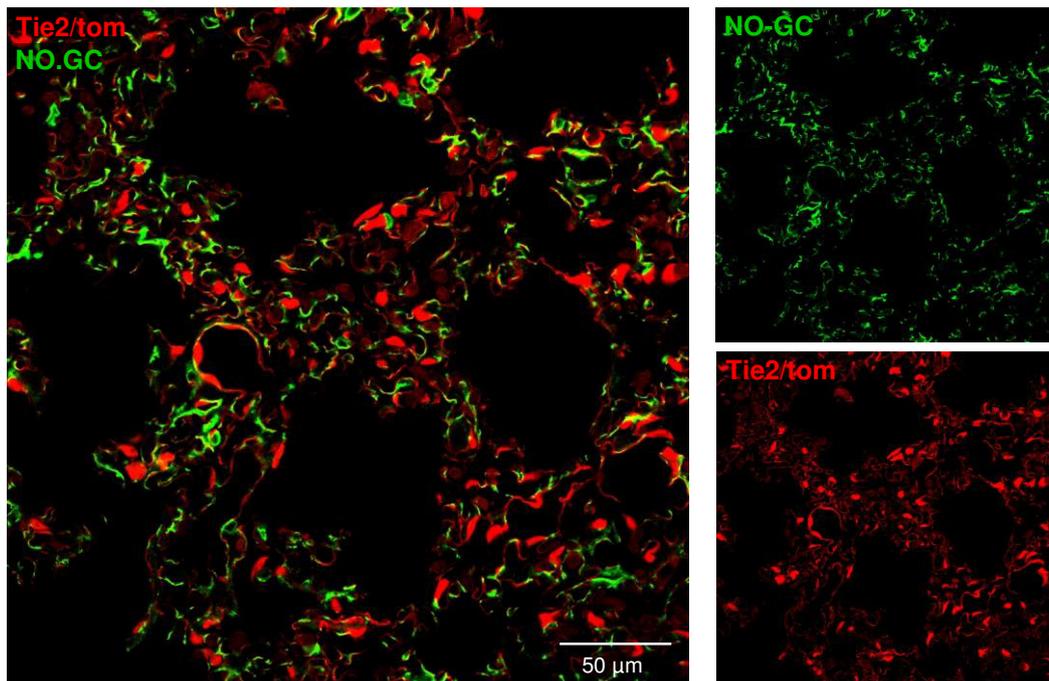
Bei dieser Reporterlinie wird eine konstitutive Cre-Rekombinase unter dem Tie2-Promotor genutzt (Kisanuki *et al.*, 2001). Somit wird tomato in Zellen exprimiert, in denen der Endothel-spezifische Tie2-Promotor aktiv ist. Lungengewebe wurde mit dem Antikörper gegen die NO-GC inkubiert. Es konnte keine Kolo-kalisation von tomato (rot) mit der NO-GC (grün) gezeigt werden. Die zellulären Ausläufer der NO-GC-positiven Zellen waren jedoch in unmittelbarer Nähe der Endothelzellen angesiedelt (Abbildung 13A). Dies unterstützt die Ergebnisse in Abbildung 7A und zeigt, dass sich NO-GC-exprimierende Zellen in unmittelbarer Nähe zu Endothelzellen befinden.

FoxD1/tomato-Mäuse

FoxD1/tomato-Mäuse besitzen ebenfalls eine nicht induzierbare Cre-Rekombinase. Der FoxD1-Promotor ist jedoch nur pränatal zwischen Woche E12 und E15 in Perizyten-Vorläuferzellen aktiv (Zhang *et al.*, 2003; Humphreys *et al.*, 2010). Somit zeigte sich in der adulten Lunge eine Expression von tomato (rot) in Nachkommen von Zellen, die FoxD1 in ihrer Entwicklung exprimiert haben (Abbildung 13B). Dabei handelte es sich um eine Population von Zellen, die vereinzelt und mosaikartig im Lungenparenchym vorkamen. Eine gleichzeitige Färbung mit dem spezifischen Antikörper gegen die NO-GC zeigte, dass FoxD1(rot) nicht mit der NO-GC (grün) kolo-kalisiert war (siehe Abbildung 13B).

Die Ergebnisse der Cre-Reporter-mäuse deuteten darauf hin, dass die NO-GC in der Lunge in Zellen mit aktivem PDGFR β -Promotor exprimiert wird. Dabei handelt es sich um Glattmuskulzellen und PDGFR β -positive Perizyten. Diese Perizyten-Population kann in zwei Gruppen unterteilt werden: Eine große PDGFR β /SMMHC-positiv und eine kleine PDGFR β /NG2-positiv Subpopulation. NO-GC wird weder in Tie2-positiven Endothelzellen noch in Zellen exprimiert, die von FoxD1-exprimierenden Vorläuferzelle abstammen.

A Tie2/tomato



B Foxd1/tomato

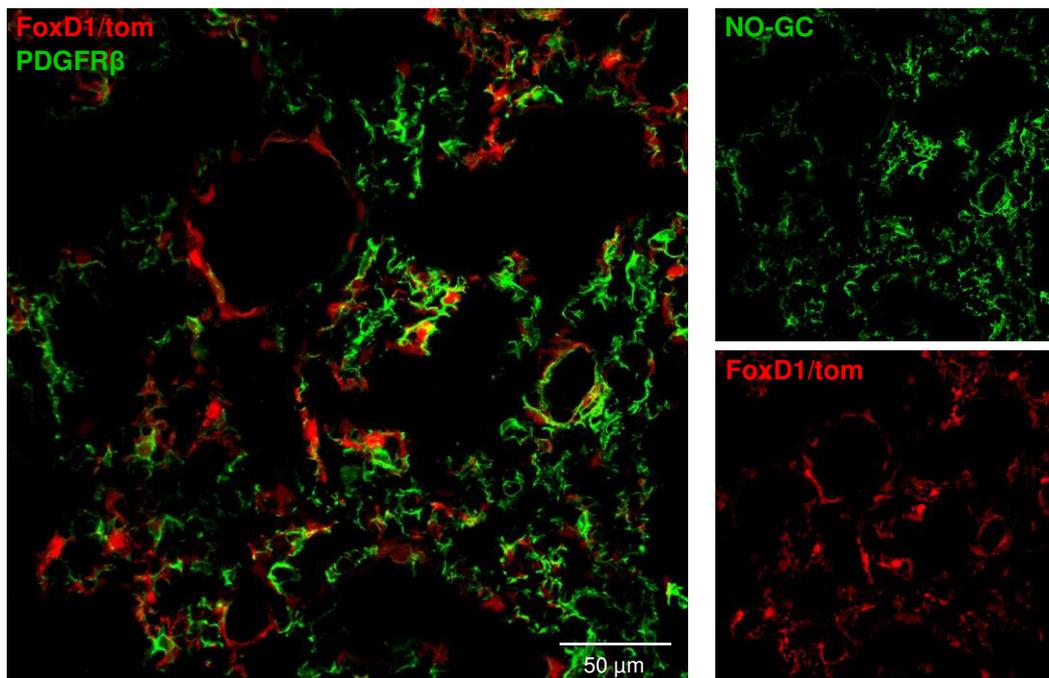


Abbildung 13: Lineage Tracing von Tie2- und Foxd1-positiven Zellen in der gesunden Lunge
Lungenschnitte von Tie2/tomato-Reporterermäusen (A) und FoxD1/tomato-Reporterermäusen (B) wurden mit dem spezifischen Antikörper gegen die NO-GC gefärbt. Eine starke Expression von tdTomato (PDGFRβ/tom; rot) ist in Zellkernen zu erkennen während das Zytoplasma nur schwach fluoresziert. Die Überlagerungsbilder zeigen, dass NO-GC-positive Zellen (grün) kein tdTomato (rot) exprimieren.

4.2 Untersuchungen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose

4.2.1 Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in WT- und GCKO-Mäusen

Um die Rolle der NO-GC bei der Lungenfibrose zu untersuchen, wurde das Bleomycin-Fibrosemodell verwendet. Bleomycin (2 U/kg) oder 0,9% NaCl (Carrier) wurde den Tieren einmalig intratracheal an Tag 0 appliziert. Lungen wurden 21 Tage nach der Gabe entnommen und fixiert, da innerhalb der ersten Woche zunächst eine inflammatorische Antwort zu sehen ist. Typische histopathologische Merkmale der Fibrose treten dagegen erst ab Tag 7 auf und erreichen an Tag 21 nach Bleomycin-Gabe ein Maximum (Izbicki *et al.*, 2002; Moore und Hogaboam, 2008; Peng *et al.*, 2013). WT-Lungen wiesen nach der Gabe von Bleomycin eine stark erhöhte PDGFR β -Immunreaktivität im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen auf. Zudem war die Signalintensität der PDGFR β -positiven Zellen in fibrotischen Arealen höher als in benachbarten, nicht betroffenen Regionen sowie in gesundem Lungengewebe von Kontrolltieren (Abbildung 14A). Bleomycin führte demnach nicht nur zu einer Proliferation von Perizyten sondern auch zu einer vermehrten Expression von PDGFR β in fibrotischen Arealen.

Lungenschnitte von WT-Tieren wurden zudem mit α -SMA, einem etablierten Marker für Myofibroblasten (Sun *et al.*, 2016) angefärbt. Während in der unbehandelten WT-Lunge nur vereinzelt schwache punktförmige α -SMA-Signale zu finden waren, zeigte sich nach der Behandlung mit Bleomycin ein deutliches α -SMA-Signal (Abbildung 14B). Die Signale in der unbehandelten Lunge traten jedoch auch ohne Inkubation mit dem Primärantikörper auf und lassen sich durch Autofluoreszenz der Makrophagen bei einer Wellenlänge von 488 nm erklären (Abbildung 14C). Demnach führt Bleomycin zu einer Entstehung von α -SMA-positiven Myofibroblasten innerhalb fibrotischer Regionen.

Als nächstes wurden WT- und GCKO-Lungen auf die Einlagerung von Kollagen in das Lungenparenchym untersucht. Da Kollagenfasern vor allem aus dem Protein Kollagen Typ I α 1 (col1 α 1) bestehen, wurde Lungengewebe mit einem Antikörper gegen col1 α 1 (rot) inkubiert. Lokal konnte in Bleomycin-behandelten Lungen von WT- und GCKO-Tieren anhand des DAPI-Signals eine Zunahme von Zellkernen detektiert werden. Zudem war eine erhöhte Expression von col1 α 1 im Vergleich zu unbehandelten Lungen zu sehen. Es konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Einlagerung von Kollagen zwischen WT- und GCKO-Lungen gezeigt werden (Abbildung 15).

Um fibrotische Veränderungen der Lunge sowie die Ausprägung der Fibrose nach Bleomycin-Gabe zu bewerten, wurden neben immunhistochemischen Untersuchungen auch biochemische Analysen durchgeführt. Da es bei der Fibrose in der Lunge zu einer Gewebevermehrung kommt, wurden das Trockengewicht und der Kollagengehalt der Lunge vor und nach Gabe von Bleomycin bestimmt. Bleomycin führte zu einer statistisch

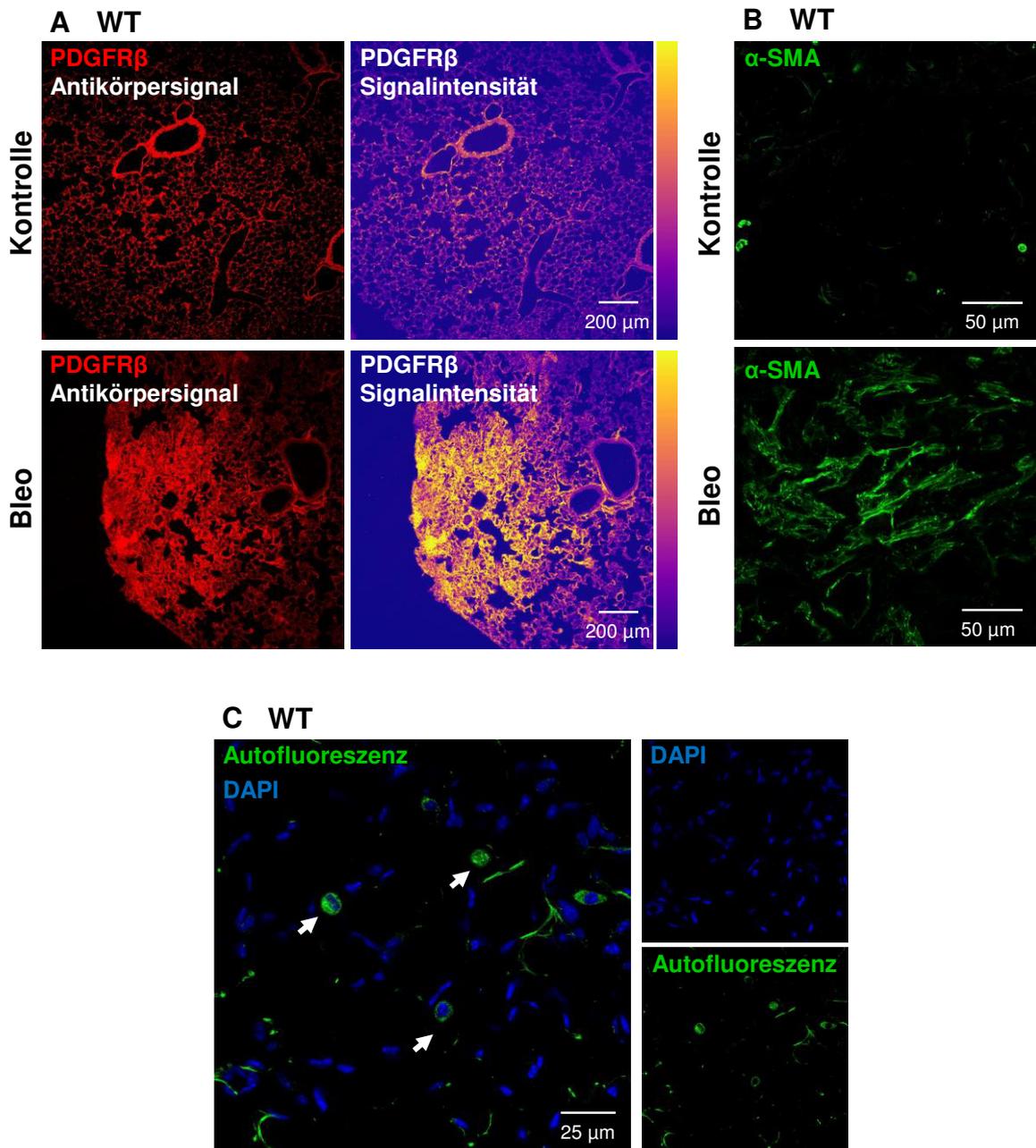


Abbildung 14: Bleomycin-induzierte Lungenfibrose der Maus

Die Induktion der Lungenfibrose erfolgte durch einmalige intratracheale Gabe von Bleomycin (Bleo). Mäuse wurden 21 Tage später geopfert und die Lungen fixiert. Lungenschnitte von unbehandelten und Bleomycin-behandelten WT-Tieren wurden mit den Antikörper gegen PDGFR β (A) und α -SMA (B) gefärbt. Die Signalintensität ist durch Pseudofarben dargestellt, die von gelb (hohe Signalintensität) bis lila (geringe Signalintensität) reichen. Lungenschnitte von WT-Tieren, die ohne Antikörperbehandlung bei einer Wellenlänge von 488 nm immunhistochemisch analysiert wurden, zeigen autofluoreszierende Makrophagen (C). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

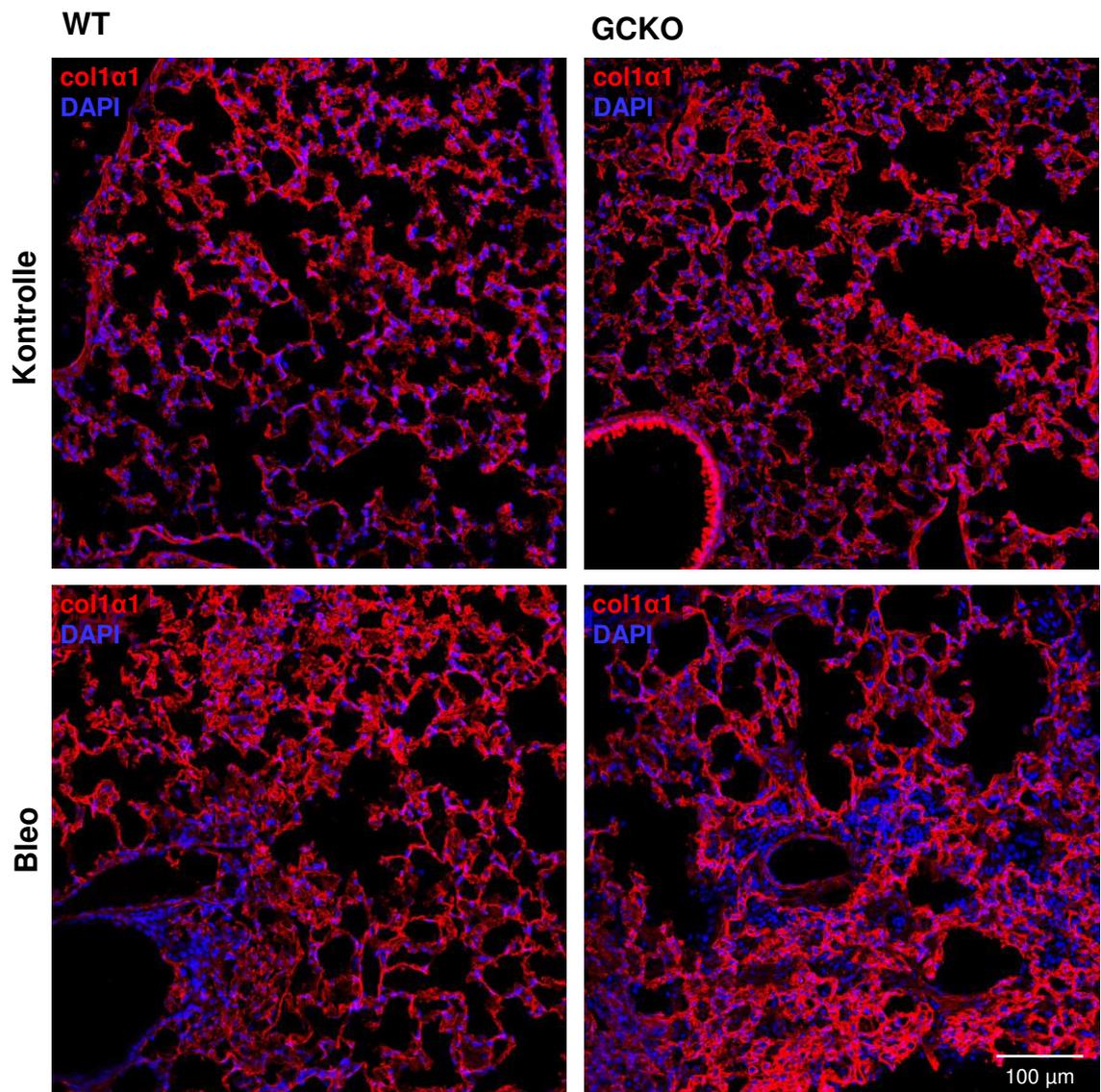


Abbildung 15: Kollageneinlagerung bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose der Maus

Immunhistochemische Analyse der Kollagen-Expression in unbehandelten und Bleomycin-behandelten Lungen. Lungenschnitte von WT- und GCKO-Tieren wurden mit Antikörper gegen col1 α 1 (rot) gefärbt. Lungen zeigen eine erhöhte Kollagen-Expression 21 Tage nach der Gabe von Bleomycin (Bleo). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

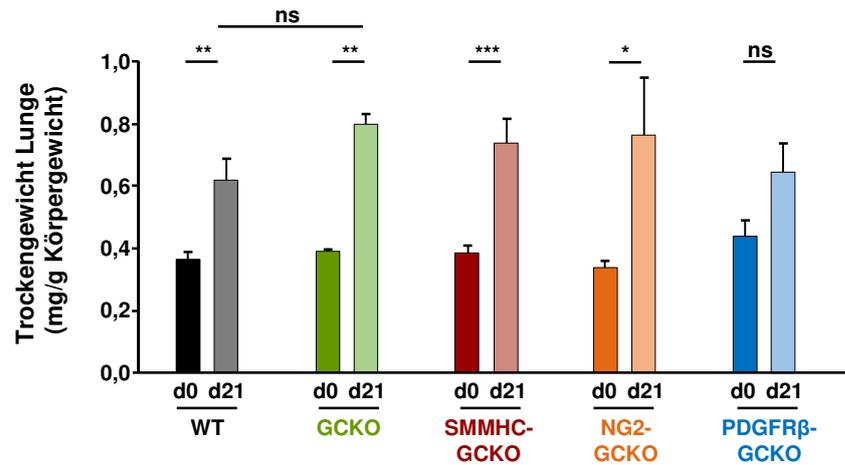
signifikanten Erhöhung des Trockengewichts und des Kollagengehalts in Lungen von WT- und GCKO-Tieren sowie in den Lungen von Perizyten-spezifischen Knockout-Linien: SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und PDGFR β -GCKO (Abbildung 16A und 16B). Interessanterweise konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Trockengewicht fibrotischer Lungen von WT- und GCKO-Tieren gezeigt werden, obwohl der Kollagengehalt in Abwesenheit der NO-GC signifikant erhöht war. Diese Daten unterstützten die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen, die auf eine modulatorische Rolle der NO-GC bei der Ablagerung von Kollagen hindeuten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die NO-GC vermutlich eine protektive Rolle bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose einnimmt. Die Verletzung der Lunge ist durch eine vermehrte Anzahl von PDGFR β -positiven Zellen, eine erhöhte Expression von PDGFR β und col1 α 1 sowie *de novo*-Expression von α -SMA in Myofibroblasten in fibrotischen Arealen gekennzeichnet.

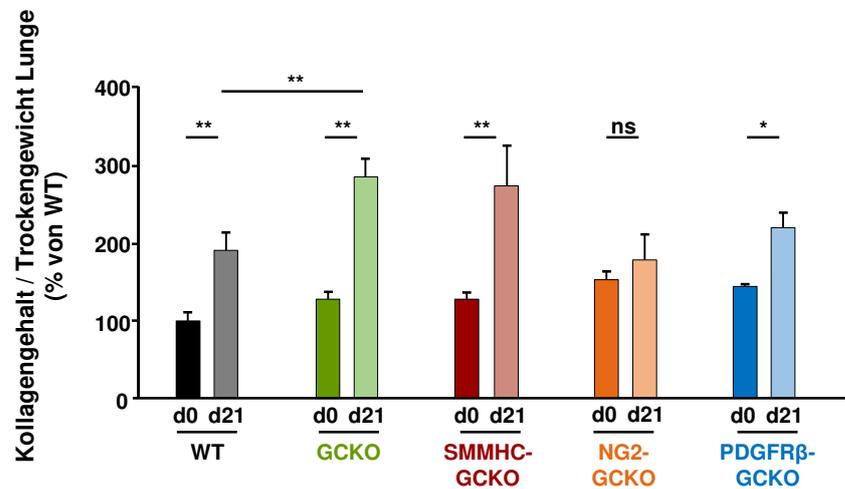
Zur weiteren Untersuchung der Beteiligung der NO-GC an der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung der Maus, wurden fibrotische Areale in Lungengewebe von WT- und GCKO-Tieren miteinander verglichen. Zunächst wurde ein Western Blot mit Lungenhomogenaten von WT- und GCKO-Tieren nach Bleomycin-Gabe durchgeführt. Es konnte wie schon in der unbehandelten WT-Lunge eine Expression der NO-GC nachgewiesen werden. In GCKO-Lungen war die NO-GC auf Proteinebene nicht mehr zu detektieren (Abbildung 16C).

Als nächstes sollte mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen analysiert werden, ob es strukturelle Unterschiede zwischen den fibrotischen Regionen von WT- und GCKO-Lungen gibt. Fibrotische Areale wurden wie bereits oben erwähnt durch das vermehrte Auftreten und eine erhöhte Signalintensität von PDGFR β -positiven Zellen identifiziert (Abbildung 17, siehe Abbildung 14A). In Lungen beider Genotypen waren diffuse Veränderungen der Lungenarchitektur und ein Verlust alveolärer Strukturen zu beobachten. Fibrotische Areale (gestrichelte Kreise in Abbildung 17A) in Lungen von GCKO-Tieren waren größer und kompakter. Zudem wiesen, wie oben erwähnt, die fibrotischen Regionen eine erhöhte PDGFR β -Signalintensität im Vergleich zu gesundem Lungengewebe auf. Interessanterweise war die Signalintensität in Bleomycin-behandelten GCKO-Lungen höher als in Lungen aus WT-Tieren (siehe Abbildung 17A; Inset). Eine stärkere Vergrößerung der fibrotischen Areale offenbarte eine organisierte Ausrichtung der α -SMA Fasern in der WT-Lunge, wohingegen die Ausrichtung der Fasern in fibrotischen Arealen der GCKO-Lunge „unorganisiert“ und „undefiniert“ erschien (siehe Abbildung 17B). Diese Daten unterstreichen einen möglichen Effekt der NO-GC auf die Steifigkeit der Lunge, Freisetzung von TGF- β sowie die Wundheilung.

A



B



C

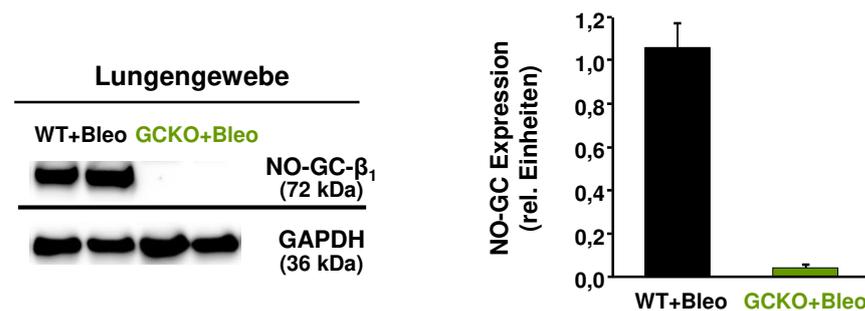


Abbildung 16: Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt

Das Trockengewicht (A) und der Kollagengehalt (B) der Lungen von WT-, GCKO-, SMMHC-GCKO-, NG2-GCKO- und PDGFRβ-GCKO-Tieren wurden bestimmt. Zur Analyse des Trockengewichts wurde die linke Lunge getrocknet, mit Salzsäure gekocht, um die Struktur aufzulösen, und der Kollagengehalt mittels kolorimetrischer Messung quantifiziert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=5-11 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001). Western Blot-Analyse von Lungenhomogenaten aus Bleomycin-behandelten WT- und GCKO-Tieren. Die Expression der NO-GC wurde mit dem spezifischen Antikörper gegen die β₁-Untereinheit detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt ist ein Beispiel-Western Blot und die dazugehörige Statistik (C).

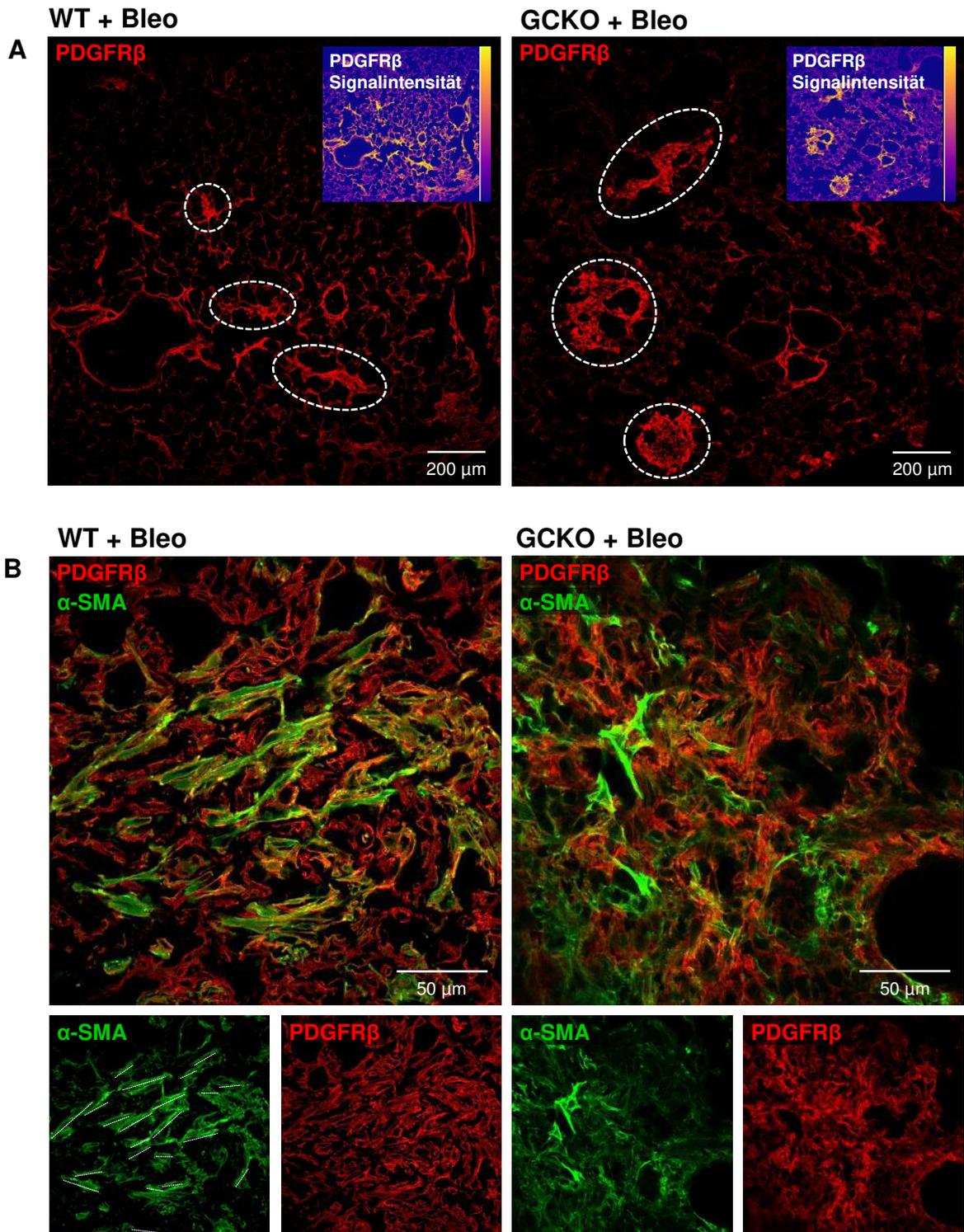


Abbildung 17: Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in An- und Abwesenheit von NO-GC

Zur Induktion der Lungenfibrose in WT- und GCKO-Tieren wurde Bleomycin (Bleo) einmalig intratracheal appliziert. Nach 21 Tagen wurden die Tiere geopfert. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen PDGFR β (rot) und α -SMA (grün) gefärbt. Fibrotische Bereiche in Lungen von WT- und GCKO-Tieren durch die Akkumulation von PDGFR β -positiven Zellen (gestrichelte Kreise) und eine erhöhte Signalintensität (gelb; kleines Bild) identifiziert (A). Eine stärkere Vergrößerung zeigt, dass in fibrotischen Bereichen in WT- und GCKO-Lungen viele PDGFR β -positive Zellen (rot) α -SMA (grün) exprimieren (Gelbfärbung; B). Gestrichelte Linien zeigen die Orientierung der α -SMA Fasern in den Myofibroblasten.

4.2.2 Charakterisierung von Myofibroblasten-Subtypen

Um die Rolle der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktion während der Lungenfibrose näher zu untersuchen, wurde im Folgenden die Expression der NO-GC in fibrotischem Lungengewebe detailliert untersucht. Wie bereits erwähnt werden fibrotische Areale durch die Einwanderung und Proliferation von α -SMA-exprimierenden Myofibroblasten definiert. Lungengewebe von Bleomycin-behandelten WT-Tieren wurde daher mit einem Antikörper gegen α -SMA gefärbt. In unbehandeltem Lungengewebe ist α -SMA ein Marker für perivaskuläre und peribronchiale Glattmuskelzellen (Kapanci *et al.*, 1992).

Nach Gabe von Bleomycin konnten zwei verschiedene α -SMA-positive Zellen identifiziert werden. In der Überlagerung zeigte sich keine Kollokalisierung von α -SMA (grün) und NO-GC (rot) in den großen, multipolaren Zellen, die in fibrotischen Bereichen erscheinen. NO-GC-spezifische Immunsignale (rot) konnten ausschließlich in Zellen der Alveolarwand nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Die NO-GC wird somit nicht in intra-alveolären, α -SMA-positiven Myofibroblasten exprimiert, von denen sich mehrere innerhalb einer Alveole befinden können (Abbildung 18B).

Ein weiterer Myofibroblasten-Subtyp konnte in der Alveolarwand gezeigt werden: Dieser Zelltyp war immunopositiv sowohl für α -SMA, als auch NO-GC, was sich an der Gelbfärbung im Überlagerungsbild zeigt (siehe Abbildung 18A; Pfeilspitzen). Eine Kollokalisierung der beiden Marker konnte jedoch nur direkt an der Grenze zu fibrotischen Arealen beobachtet werden und trat weder innerhalb dieser Areale, noch in gesundem Gewebe in unmittelbarer Nähe auf (siehe Abbildung 10A).

Durch Anfärbung der Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen PDGFR β und NO-GC ließ sich jedoch eine Kollokalisierung von NO-GC mit PDGFR β zeigen (Abbildung 19A). Somit scheint es sehr wahrscheinlich, dass dieser Myofibroblasten-Subtyp, der sich in der Alveolarwand und in der Übergangszone zu fibrotischen Arealen befindet, von PDGFR β -positiven Perizyten abstammt.

Die großen multipolaren Myofibroblasten, die sich innerhalb der Alveolarräume befanden, wiesen ebenfalls eine starke PDGFR β -Fluoreszenz auf (siehe Abbildung 19A). Die Kofärbung von α -SMA (grün) mit col1 α 1 (rot) bestätigte die zuvor gezeigte intra-alveoläre Lokalisation dieser NO-GC-negativen Myofibroblasten. Durch den col1 α 1-Antikörper wurde das Kollagengerüst angefärbt und somit die Alveolarwand definiert (Abbildung 19B). Zusammenfassend konnten nach Bleomycin-Gabe zwei verschiedene Myofibroblasten-Subtypen aufgrund der α -SMA-Expression identifiziert werden. Diese unterscheiden sich in der Expression der NO-GC und der extra-/intra-alveolären Lokalisation.

WT + Bleo

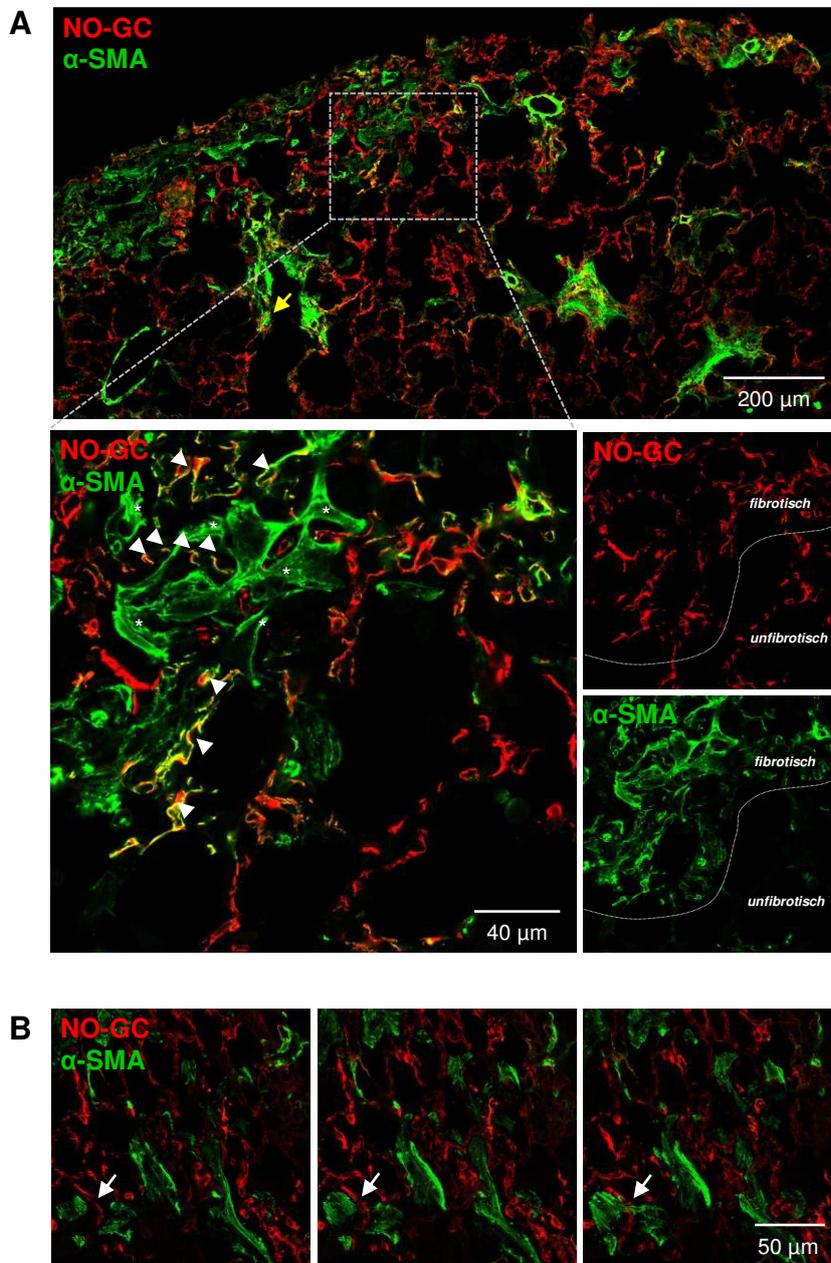


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der fibrotischen Lunge
 Zur Induktion der Lungenfibrose in WT-Tieren wurde Bleomycin (Bleo) einmalig intratracheal appliziert. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen NO-GC (rot) und α -SMA (grün) gefärbt. Es können zwei Typen von α -SMA-positiven Myofibroblasten durch die Expression von NO-GC unterschieden werden (NO-GC-positive, gelb; Pfeilspitzen oder NO-GC-negative, grün; Sternchen). α -SMA-positive Myofibroblasten sind nur in fibrotischen Bereichen zu finden (A). Darstellung von drei verschiedenen Schnittebenen eines Lungenschnittes. NO-GC-negative Myofibroblasten befinden sich innerhalb der Alveolarräume und erstrecken sich über mehrere Alveolen (Pfeile; B).

WT + Bleo

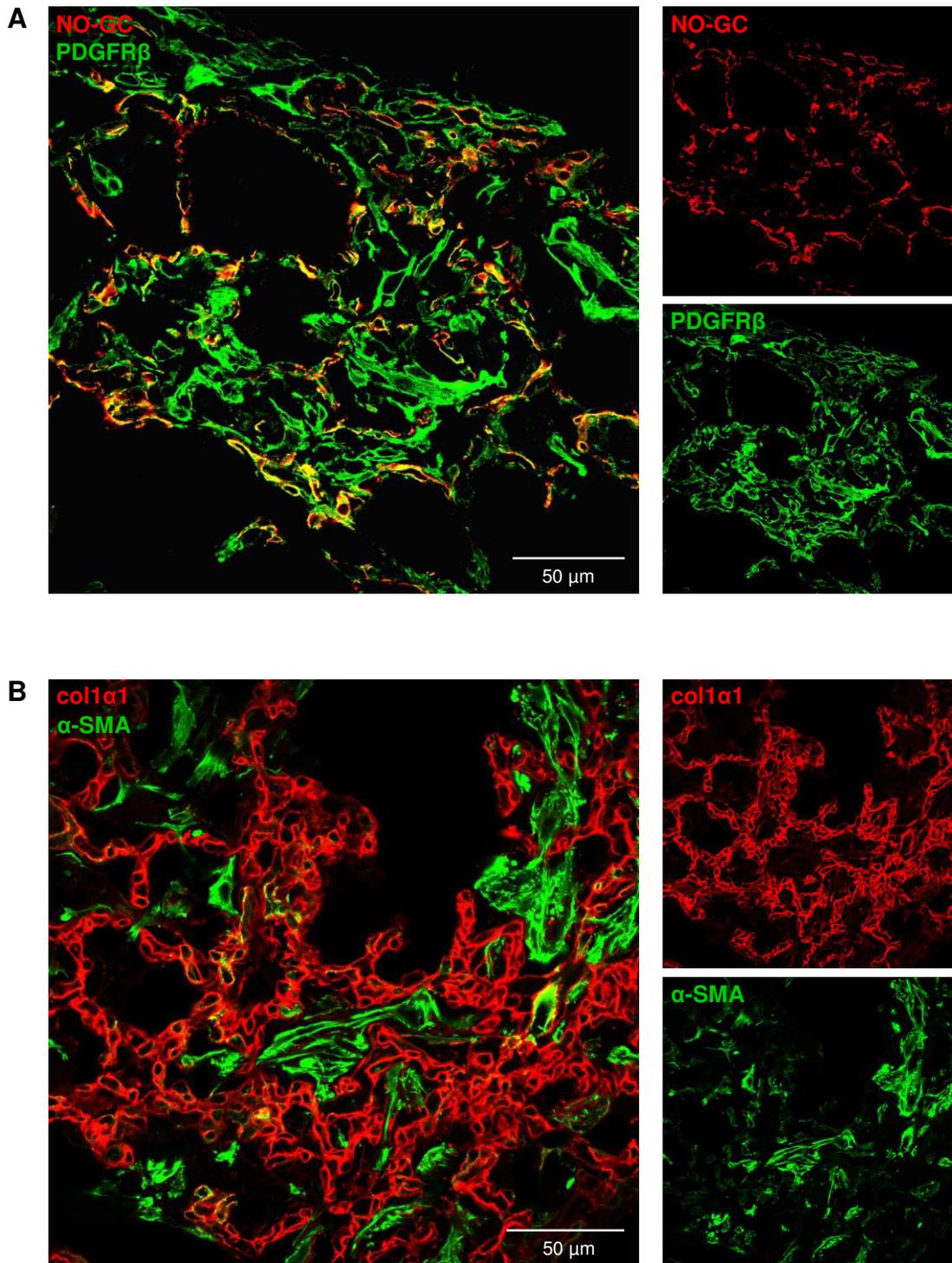


Abbildung 19: Herkunft und Lokalisation von Myofibroblasten-Subtypen

Zur Induktion der Lungenfibrose in WT-Tieren wurde Bleomycin einmalig intratracheal appliziert. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen NO-GC, PDGFR β , α -SMA und col1 α 1 gefärbt. (B) PDGFR β (gün) ist mit NO-GC (rot) in Perizyten und Myofibroblasten in der Alveolarwand kolokalisiert (gelb). Intra-alveoläre PDGFR β -positive Myofibroblasten zeigen kein NO-GC-Signal (A). α -SMA-positive Myofibroblasten (grün) befinden sich in den Alveolen, deren Wand durch das col1 α 1-Signal (rot) definiert ist (B).

4.2.2.1 Lineage Tracing von Myofibroblasten in der Lungenfibrose

PDGFR β /tomato-Mäuse

Die Herkunft der Myofibroblasten bei der Entwicklung der Fibrose ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Wells und Schwabe, 2015). Um zu ermitteln, ob Perizyten als Vorläuferzellen der beiden identifizierten Myofibroblasten-Subtypen fungieren, wurden in dieser Arbeit Lineage Tracing-Versuche mit PDGFR β /tomato-Mäusen durchgeführt. In anderen Publikationen wurde die konstitutiv aktive PDGFR β -Cre benutzt (Henderson *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016). Die Verwendung der induzierbaren PDGFR β -CreER^{T2} hat jedoch den Vorteil, dass Zellen sichtbar gemacht und nachverfolgt werden können, die zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe einen aktiven Promotor und somit eine aktive Cre-Rekombinase haben. Wie oben erwähnt führte die Induktion mit Tamoxifen zu einer Expression von tomato (rot) in Zellen des Lungenparenchyms. Dabei akkumulierte das tomato-Signal in den Zellkernen. Gleichzeitige Anfärbung mit dem PDGFR β -Antikörper (grün) zeigte, dass alle Zellen, die eine PDGFR β -Fluoreszenz aufweisen, tomato exprimieren (Abbildung 20A). Dies bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt sowohl das PDGFR β -Protein in der Zelle vorhanden ist als auch der PDGFR β -Promotor aktiv ist. Dies ließ auf eine konstitutive Aktivität des Promotors schließen.

Um das Schicksal von PDGFR β -exprimierenden Zellen nach Induktion einer Lungenverletzung zu ermitteln, wurden Mäuse zunächst mit Tamoxifen behandelt. Dadurch wurde die PDGFR β -spezifische Expression von tomato induziert. 15 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion wurde den Tieren Bleomycin intratracheal verabreicht. Es konnte sichergestellt werden, dass Tamoxifen bereits vollständig aus dem Körper eliminiert wurde und somit keine falsch-positiven Signale evoziert. Lungen wurden 21 Tage später analysiert.

In fibrotischen Regionen war nach der Gabe von Bleomycin eine erhöhte Anzahl von tomato-positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten Lungen zu finden (siehe Abbildung 18A). Fibrotische Regionen zeigten auch verglichen mit nicht fibrotischen Lungenbereichen der gleichen Lunge eine Vermehrung tomato-positiver Zellen (Abbildung 20B). Neben der Anzahl der PDGFR β -immunopositiven Zellen war auch die PDGFR β -Signalintensität stark erhöht (siehe Abbildung 20A und 20B; Pseudofarben). Alle tomato-exprimierenden Zellen waren PDGFR β -immunopositiv. Interessanterweise zeigten sich in fibrotischen Regionen Zellen, die zwar PDGFR β -immunopositiv waren, aber kein tomato exprimierten. Diese großen, multipolaren Zellen ähnelten stark den zuvor identifizierten intra-alveolären Myofibroblasten (siehe Abbildung 20B).

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Zellen um intra-alveoläre Myofibroblasten handelt, wurden Lungenschnitte von PDGFR β /tomato-Mäusen mit Antikörpern gegen α -SMA und PDGFR β inkubiert (Abbildung 21). Innerhalb des Lungenlappens fanden sich fibrotische

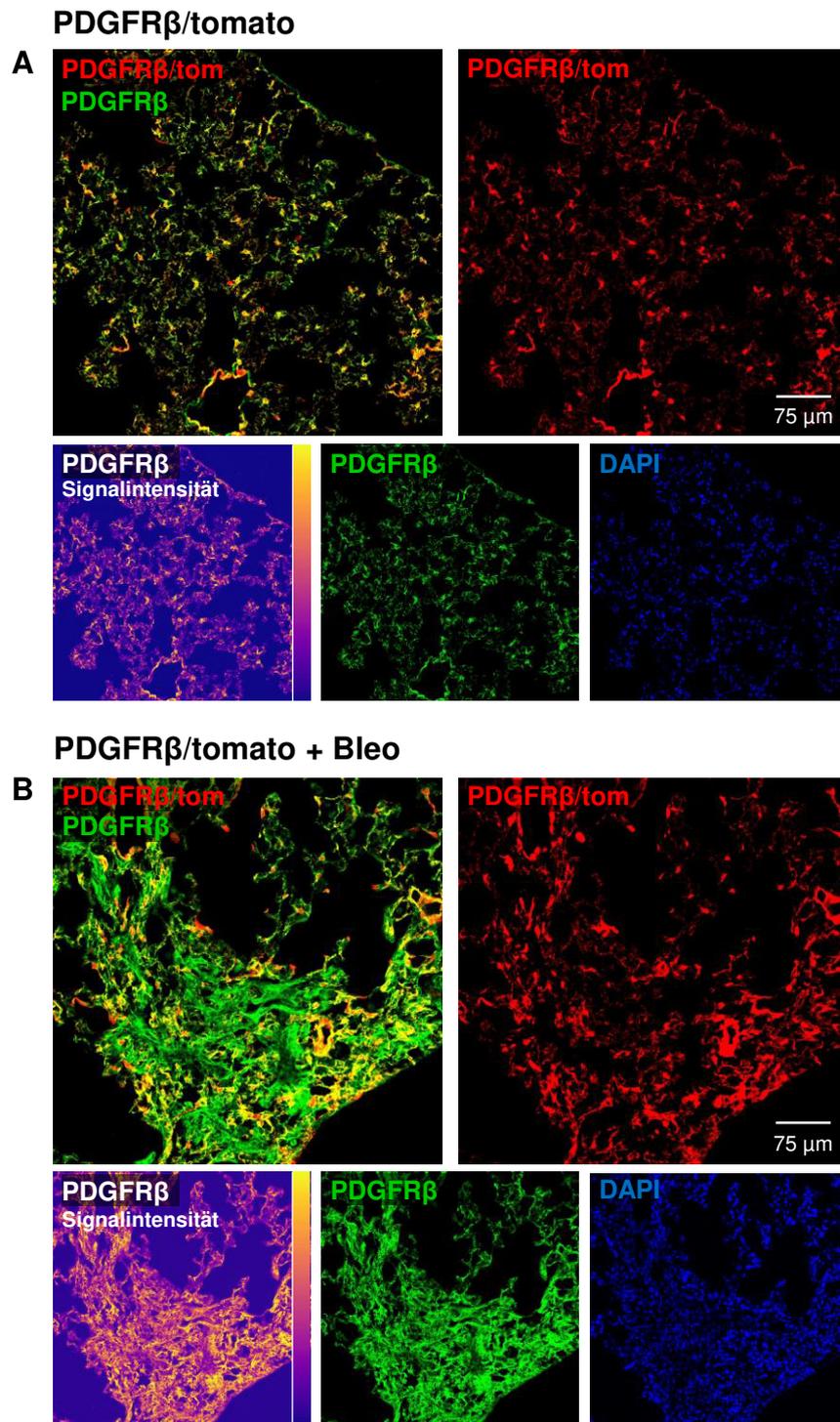


Abbildung 20: Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten in der gesunden und Bleomycin-behandelten Lunge

Immunhistochemische Analyse von unbehandelten (A) und Bleomycin-behandelten Lungen (B) aus Reporter-mäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β - Promotors exprimieren (PDGFR β /tom; rot) und gleichzeitig mit dem Antikörper gegen PDGFR β (grün) gefärbt wurden. Die Signalintensität ist durch Pseudofarben dargestellt, die von gelb (hohe Signalintensität) bis lila (geringe Signalintensität) reichen. tdTomato-markierte Zellen proliferieren nach Induktion der Fibrose. PDGFR β -positive Zellen (grün), die von tdTomato-markierten Perizyten (rot) abstammen zeigen eine Gelbfärbung im Überlagerungsbild. PDGFR β -positive Myofibroblasten in Alveolen exprimieren kein tdTomato (B). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

PDGFR β /tomato + Bleo

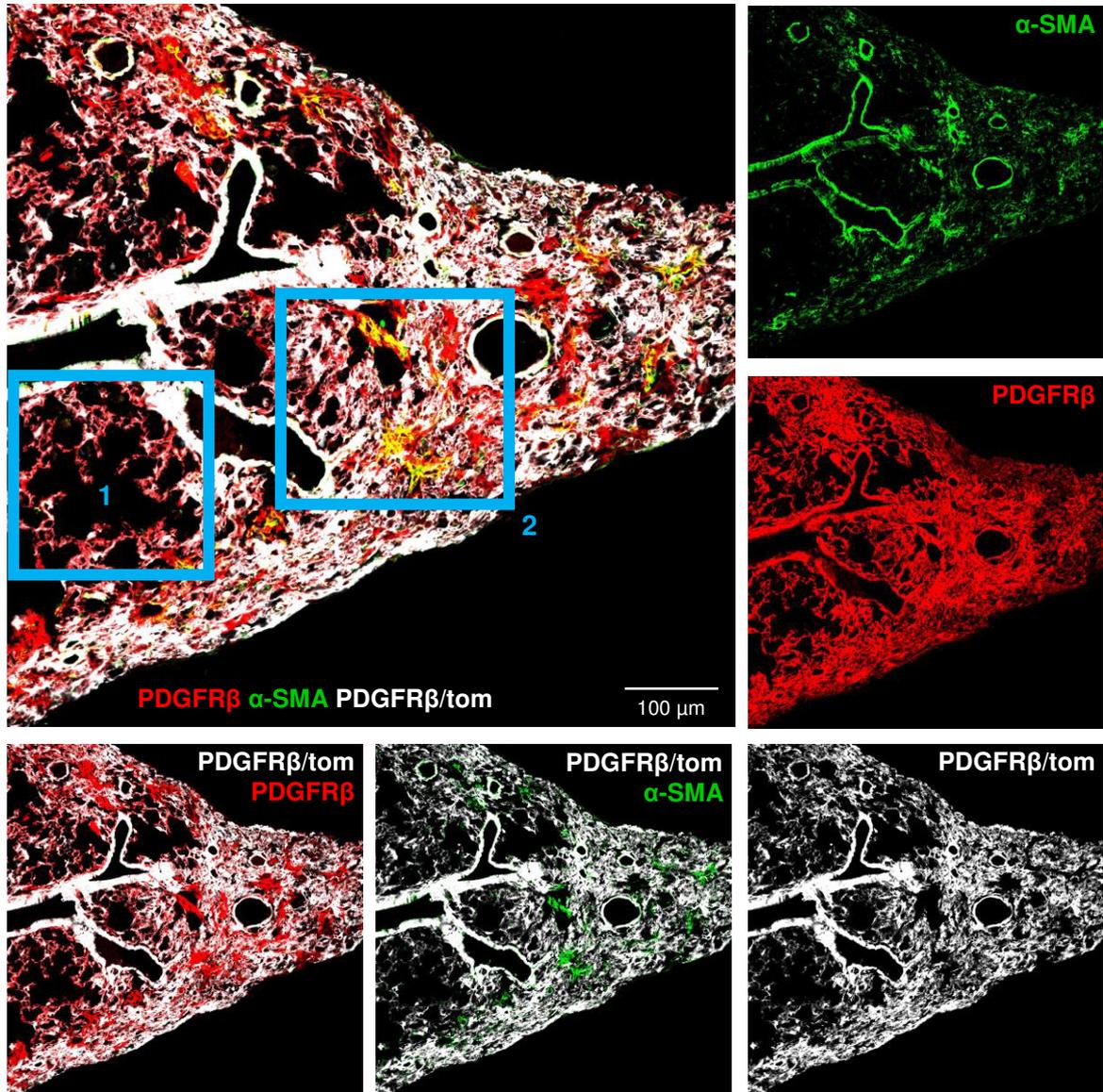


Abbildung 21: Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten während der Lungenfibrose
Lungenschnitte von Bleomycin-behandelten Reporterermäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β Promotors exprimieren (PDGFR β /tom; weiß) wurden zeitgleich mit Antikörpern gegen α -SMA (grün) und PDGFR β (rot) gefärbt. Blaue Quadrate zeigen nicht fibrotische (1) und fibrotische (2) Regionen in unmittelbarer Nähe zueinander.
Bleo = Bleomycin

Areale (siehe Feld 2 in Abbildung 21) in direkter Nachbarschaft zu Arealen mit gesundem Lungengewebe (siehe Feld 1 in Abbildung 21). Fibrotische Areale waren durch eine vermehrte Anzahl von PDGFR β -immunopositiven Zellen (rot), das Auftreten von α -SMA-immunopositiven Zellen (grün) sowie tomato-markierten Zellen (weiß) gekennzeichnet. Der normale histologisch-strukturelle Aufbau der Lunge war in fibrotischen Arealen nicht mehr zu erkennen, während in gesunden Bereichen die Alveolargänge und ihre alveolären Ausbuchtungen deutlich dargestellt werden konnten. Auffällig war hierbei, dass sich Areale mit starken fibrotischen Veränderungen vorzugsweise in Randbereichen des Organs auffinden ließen.

Im Folgenden wurden beide Areale detailliert untersucht und miteinander verglichen (siehe Feld 1 und 2 in Abbildung 21). Nicht fibrotische Lungenbereiche, die kein tomato-Signal zeigten, enthielten auch keine anderen Zellen (rot gestrichelte Linien in Abbildung 22). Bei einzelnen Zellkernen (blau) innerhalb dieser Bereiche handelt es sich vermutlich um Makrophagen. In fibrotischen Regionen dagegen waren Bereiche ohne tomato-Signal häufig von Zellen besetzt, die größtenteils α -SMA-positiv waren (siehe Abbildung 22; gelb). Interessanterweise waren diese Zellen, bei denen es sich um Myofibroblasten handelt, PDGFR β -immunopositiv, zeigten aber keine Expression von tomato. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die α -SMA-positiven Myofibroblasten, die den Alveolarraum während der fibrotischen Antwort infiltrieren, nicht von PDGFR β /tomato-positiven Perizyten abstammen.

Im Weiteren wurde das gleiche Protokoll der Tamoxifen- und Bleomycin-Gabe verwendet, um die Expression der NO-GC nach Induktion einer Lungenverletzung in den PDGFR β /tomato-Mäusen zu untersuchen (Abbildung 23A). In der gesunden Lunge konnten grundsätzlich in allen Zellen mit PDGFR β -spezifischer tomato-Expression (rot) Fluoreszenzsignale für die NO-GC (grün) detektiert werden. In den Alveolen der gesunden Lunge, die mittels DIC/Pol Filter und tomato-Signal identifiziert wurden, befanden sich auch hier keine Zellen (gestrichelte Linien in Abbildung 23B). Alle tomato-exprimierenden Zellen, die nach Gabe von Bleomycin eine Proliferation zeigten, waren NO-GC-positiv (Abbildung 23C). Dennoch waren Bereiche ohne tomato-Signal (siehe gestrichelte Linien in Abbildung 23C) mit Zellen besetzt, was in der DIC/Pol und DAPI Aufnahme zu erkennen war. Basierend auf den vorherigen immunhistochemischen Untersuchungen und dem Fehlen von Fluoreszenzsignalen für die NO-GC und tomato handelt es sich bei diesen Zellen wahrscheinlich um intra-alveoläre Myofibroblasten.

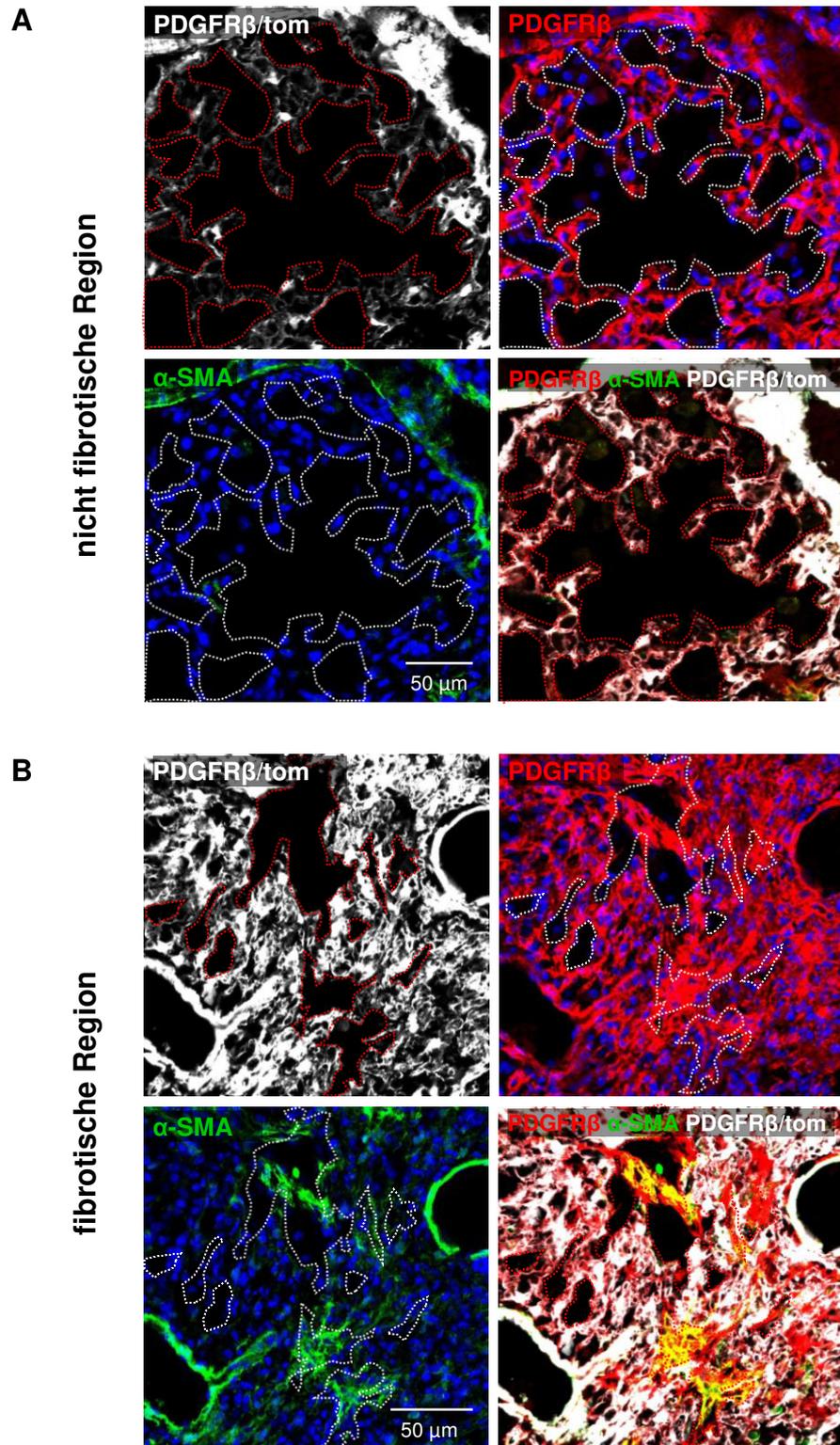


Abbildung 22: Identifizierung von unterschiedlichen Myofibroblasten-Populationen durch Lineage Tracing von Perizyten

Gestrichelte Linien zeigen Bereiche, in denen sich keine PDGFR β /tom-exprimierenden Zellen befinden. In den nicht fibrotischen Regionen (B), entsprechen diese Bereiche den Alveolen. In den fibrotischen Regionen (A) repräsentieren sie teilweise ehemalige Alveolarregionen, die von α -SMA- (grün) und PDGFR β - (rot) positiven Myofibroblasten infiltriert sind. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

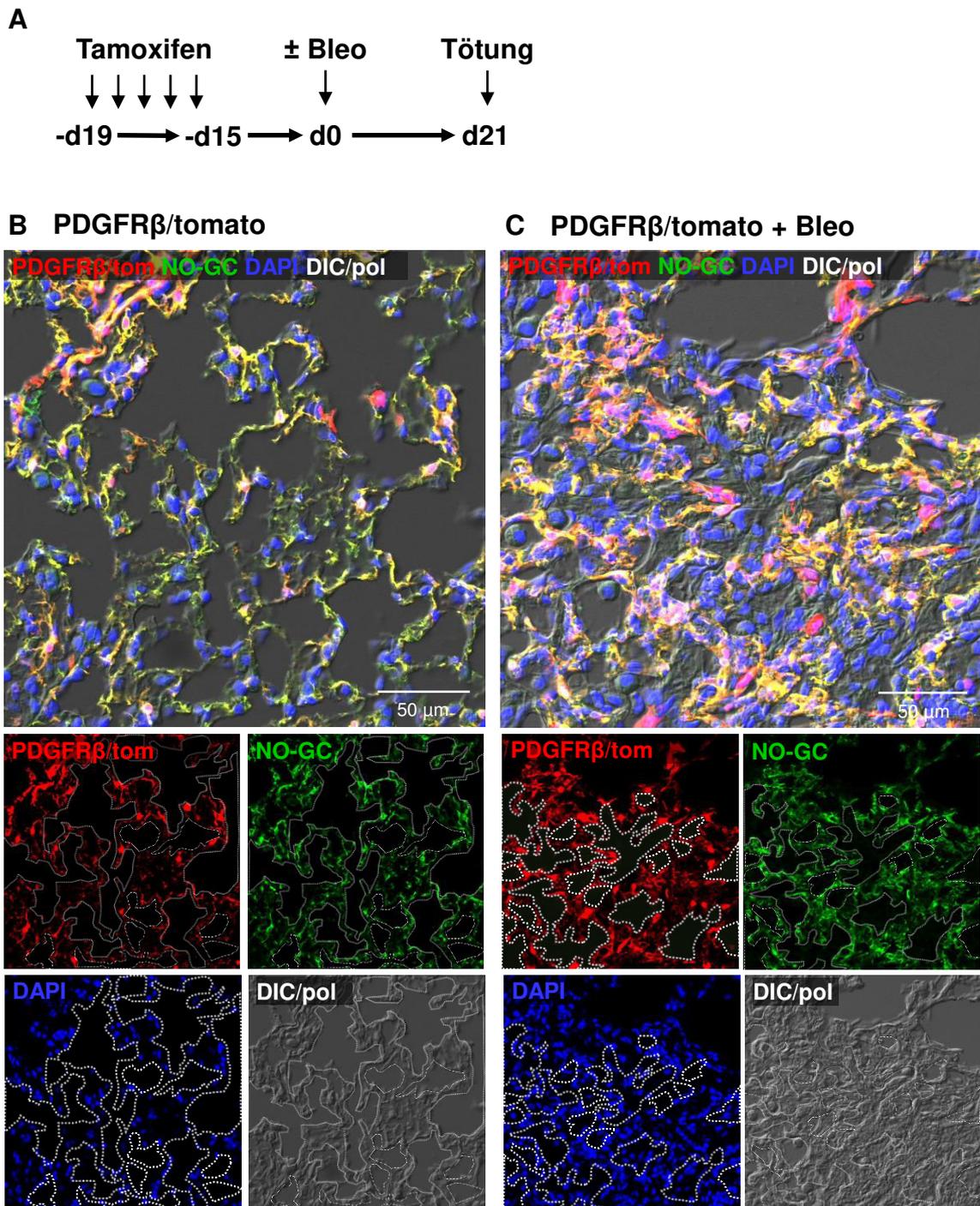


Abbildung 23: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in PDGFRβ/tomato-Reporter-mäusen während der Lungenfibrose

Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. PDGFRβ/tomato Reporter-mäusen wurde Tamoxifen an 5 aufeinander folgenden Tagen gespritzt, um die Expression von tdTomato unter Kontrolle des PDGFRβ Promotors (PDGFRβ/tom; rot) zu induzieren. 15 Tage später (=d0) blieben Mäuse unbehandelt oder wurden mit Bleomycin (Bleo) behandelt. Lungen wurden 21 Tage später fixiert (A). Lungenschnitte von unbehandelten (B) und Bleomycin-behandelten Reporter-mäusen (C), die tdTomato (rot) exprimieren, wurden mit dem Antikörper gegen die NO-GC (grün) gefärbt. Gelbfärbung in den Überlagerungsbildern zeigen eine Kolokalisation von NO-GC (grün) mit tdTomato (rot) innerhalb der Alveolarwand. Gestrichelte Linien zeigen Bereiche ohne PDGFRβ/tom-exprimierende Zellen. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

SMMHC/tomato-Mäuse

Im Folgenden wurde mit der SMMHC/tomato-Maus eine Linie verwendet, bei der tomato unter Kontrolle des SMMHC-Promotors exprimiert werden kann. Auch hier konnte nach der Gabe von Bleomycin eine erhöhte Anzahl tomato-exprimierender Zellen in fibrotischen Regionen im Vergleich zu nicht betroffenem Gewebe ermittelt werden (Abbildung 24). Diese gleichmäßig im Gewebe verteilten Zellen zeigten eine stärkere SMMHC-Signalintensität als in der unbehandelten Lunge. Durch Inkubation mit dem Antikörper gegen PDGFR β (grün) konnte nachgewiesen werden, dass die in die Alveolen eingewanderten Myofibroblasten jedoch kein tomato exprimierten (siehe Abbildung 24A).

NG2/tomato-Mäuse

Um zu überprüfen, ob NG2-positive Perizyten zum Pool der Myofibroblasten bei der Entwicklung der Fibrose beitragen, wurde die NG2/tomato-Mauslinie verwendet. Die NG2-positive Perizyten-Subpopulation wurde durch die Expression von tomato in Zellen mit aktivem NG2-Promotor bereits vor der Bleomycin-induzierten Lungenschädigung markiert. In fibrotischen Regionen war die Anzahl tomato-positiver Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Lungen erhöht. Diese Zellen zeigten eine intensive Fluoreszenz und kamen vereinzelt im Lungengewebe vor (Abbildung 24B). Weitere Färbungen zeigten eine Kollokalisierung des NG2/tomato-Signals mit PDGFR β sowohl in fibrotischen als auch nicht fibrotischen Regionen. Intra-alveoläre Myofibroblasten waren nicht mit dem Fluoreszenzfarbstoff tomato markiert (siehe Abbildung 24B), was darauf hindeutet, dass diese nicht von NG2-positiven Perizyten abstammen.

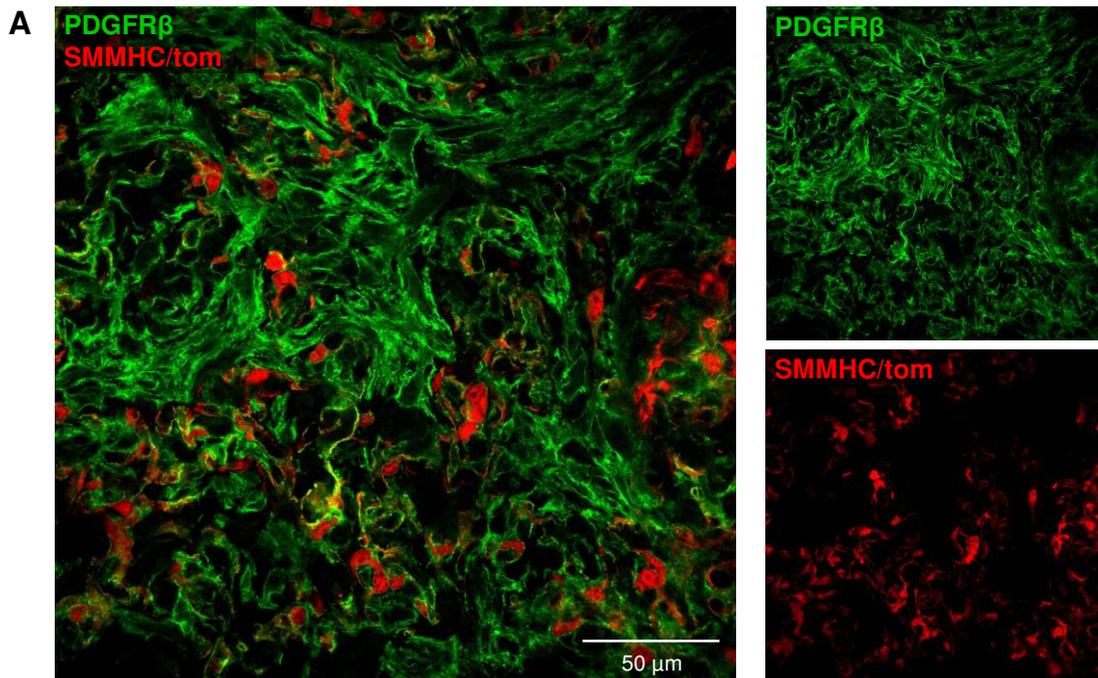
Tie2/tomato-Mäuse

Um eine mögliche Beteiligung von Endothelzellen bei der Myofibroblastenbildung zu untersuchen, wurde eine endothelspezifische Reportermaus genutzt. Nach Induktion der Lungenschädigung durch Bleomycin konnte mit Hilfe der Tie2/tomato-Reportermaus eine Vermehrung von Endothelzellen in fibrotischen Regionen gezeigt werden (Abbildung 25). Diese Zellen befanden sich wie in der gesunden Lunge extra-alveolär (siehe Abbildung 13A). Intra-alveoläre Myofibroblasten zeigten keine tomato-Expression. Diese Daten sprechen für eine vermehrte Angiogenese in fibrotischen Arealen, jedoch gegen eine Transition von Endothelzellen in Myofibroblasten.

Fibrozyten

Neben Fibroblasten und Perizyten werden auch vom Knochenmark abstammende, zirkulierende Fibrozyten als Vorläuferzellen von Myofibroblasten bei der Lungenfibrose beschrieben (Strieter und Mehrad, 2009; Keeley *et al.*, 2010; Sontake *et al.*, 2015). Unter

SMMHC/tomato + Bleo



NG2/tomato + Bleo

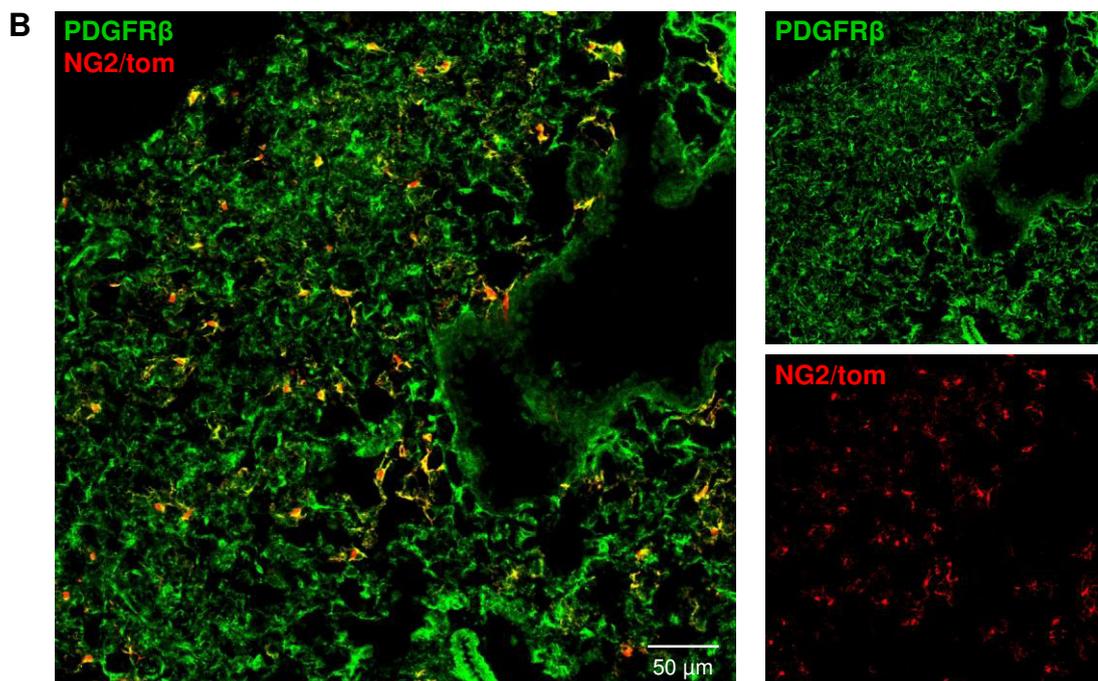


Abbildung 24: Lineage Tracing von SMMHC- und NG2-positiven Perizyten während der Lungenfibrose

Lungenschnitte von Bleomycin-behandelten Reporterermäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des SMMHC- oder NG2-Promotors exprimieren (SMMHC/tom; NG2/tom; rot) wurden zeitgleich mit dem Antikörper gegen PDGFR β (grün; A und B) gefärbt. PDGFR β -positive Myofibroblasten in Alveolen exprimieren kein tdTomato. Bleo = Bleomycin

Tie2/tomato + Bleo

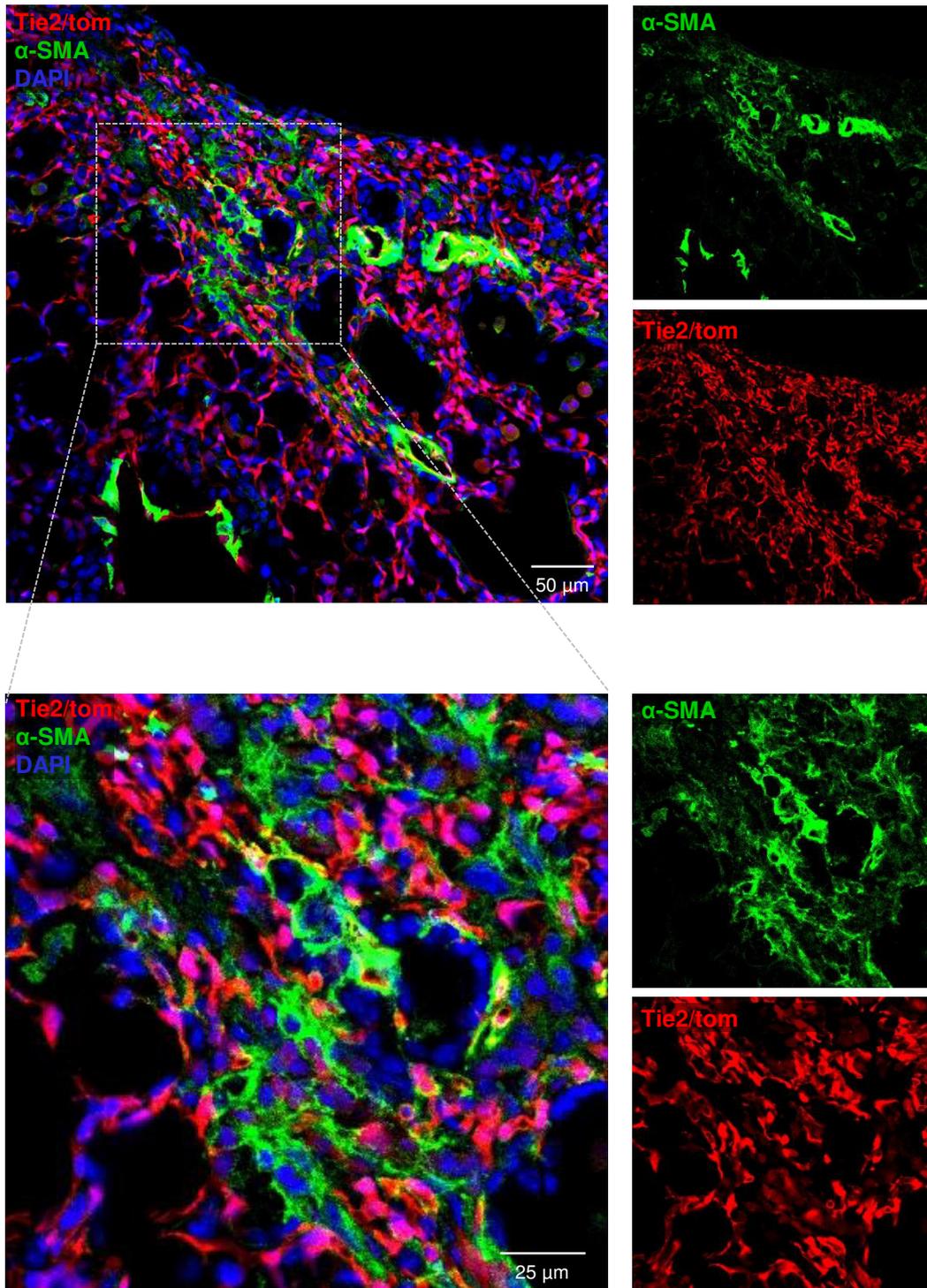


Abbildung 25: Lineage Tracing von Tie2-positiven Zellen während der Lungenfibrose

Lungenschnitte von Bleomycin-behandelten Reporterermäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des Tie2-Promotors exprimieren (Tie2/tom; rot) wurden zeitgleich mit Antikörper gegen α -SMA (grün) gefärbt. α -SMA-positive Myofibroblasten in Alveolen exprimieren kein tdTomato. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau). Bleo = Bleomycin

Verwendung von zwei Fibrozytenmarkern, CD45 und CD34, wurde diese Hypothese untersucht. Einzelne CD45-positive Zellen waren nach Bleomycin-Behandlung in den Lungensepten zu sehen (Abbildung 26A). α -SMA-positive Myofibroblasten zeigten dagegen keine Expression von CD45. Das CD34-Signal konnte ebenfalls nicht in α -SMA-positiven Zellen detektiert werden, war aber in endothelialen Zellen lokalisiert (Abbildung 26B). Diese immunhistochemischen Analysen sprechen dafür, dass die bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose entstehenden Myofibroblasten nicht von CD45/CD34-positiven Zellen abstammen. Um jedoch eine verlässliche Aussage über das Schicksal der Fibrozyten bei der Entstehung der Lungenfibrose zu treffen, müssen weitere Studien mit Fibrozyten-spezifischen Reporter-mäusen durchgeführt werden.

4.2.2.2 Kollagenproduktion

Myofibroblasten stellen die Effektorzellen der Lungenfibrose dar und sind für die vermehrte Einlagerung von Kollagen verantwortlich. Daher sollte untersucht werden, ob die beiden identifizierten Myofibroblasten-Subtypen an der Kollagenproduktion während der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beteiligt sind. Reporter-mäuse wurden wie in Abbildung 23 dargestellt mit Tamoxifen und Bleomycin behandelt und Lungen nach 21 Tagen fixiert. Lungenschnitte wurden mit dem Antikörper gegen col1 α 1 inkubiert. In der gesunden Lunge zeigte sich eine deutliche Anfärbung des Kollagengerüsts (grün). Tomato-positive Zellen (rot) befanden sich vereinzelt zwischen den Kollagenfasern. Es konnte eine stark erhöhte Kollagenproduktion von tomato-positiven Zellen nach Induktion der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung gezeigt werden (Abbildung 27A; gelb). Zudem waren in der Bleomycin-behandelten Lunge Zwischenräume ohne tomato-Fluoreszenzsignal mit tomato-negativen Zellen gefüllt. In diesen Zellen trat eine schwache col1 α 1-Fluoreszenz auf (siehe Abbildung 27A und 27B; Pfeile). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass beide Myofibroblasten-Subtypen nach der Gabe von Bleomycin an der vermehrten Synthese von col1 α 1 beteiligt sind.

4.2.2.3 Auflösung der Lungenfibrose

Die fibrotische Antwort nach einmaliger Gabe von Bleomycin ist reversibel und durch eine nahezu vollständige Rekonstruktion der Alveolararchitektur gekennzeichnet (Moore und Hogaboam, 2008; Mouratis und Aidinis, 2011). Wie oben gezeigt, waren sowohl das Trockengewicht als auch der Kollagengehalt 21 Tage nach Bleomycin-Gabe in Lungen von WT- und GCKO-Tieren erhöht. Um die Reversibilität der fibrotischen Antwort zu analysieren, wurden im Folgenden Tiere erst 56 Tage nach Bleomycin-Behandlung untersucht. WT-Lungen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine Abnahme des Trockengewichts auf ein Niveau von unbehandelten Kontrolltieren. Bei GCKO-Lungen konnte ebenfalls ein

WT + Bleo

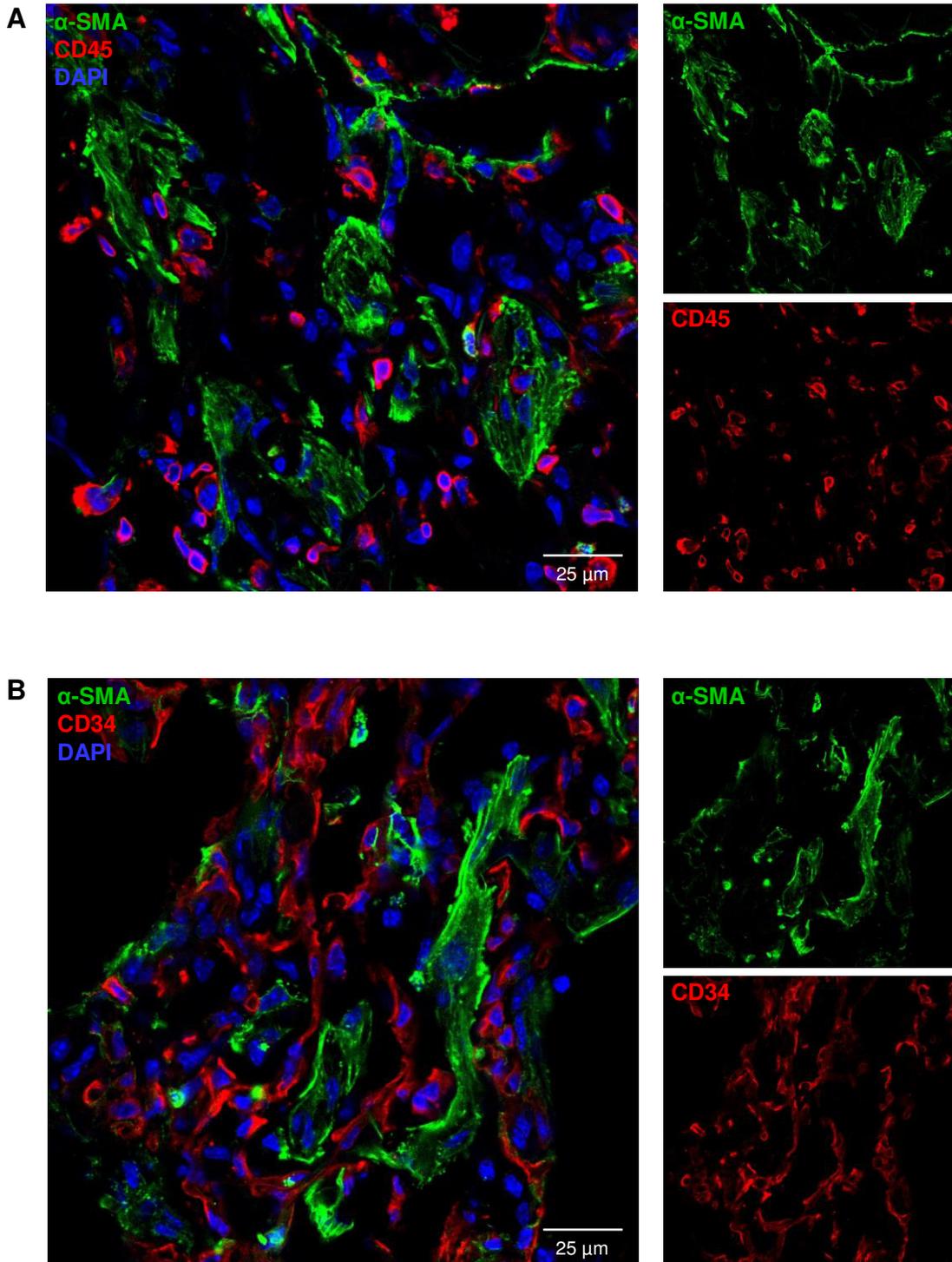


Abbildung 26: Expression von Fibrozytenmarkern in der fibrotischen Lunge

Zur Induktion der Lungenfibrose in WT-Tieren wurde Bleomycin (Bleo) einmalig intratracheal appliziert. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen α -SMA, CD45 und CD34 gefärbt. α -SMA-positive Myofibroblasten (grün) zeigen keine Kolokalisation mit CD45 oder CD34 (rot). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

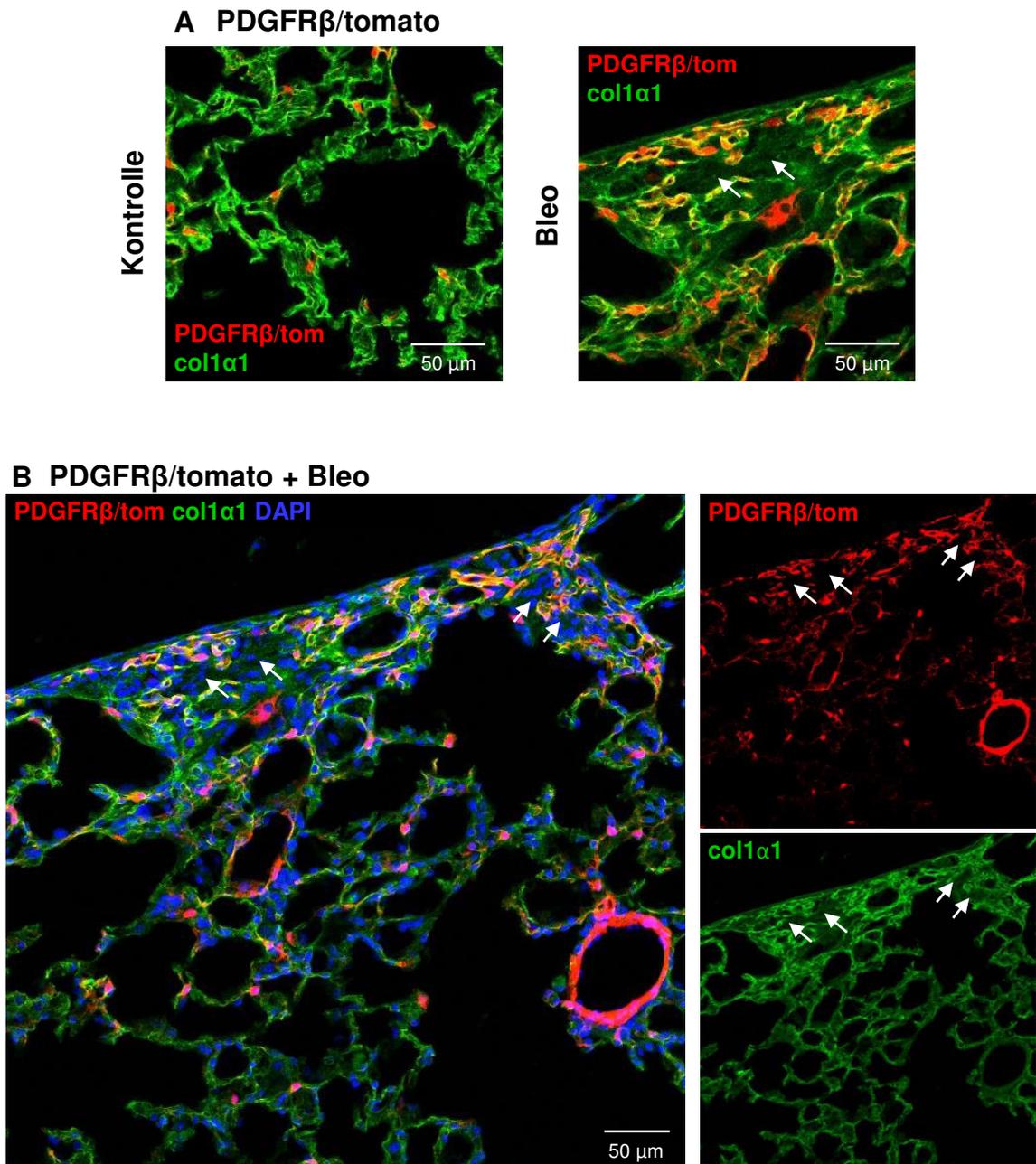
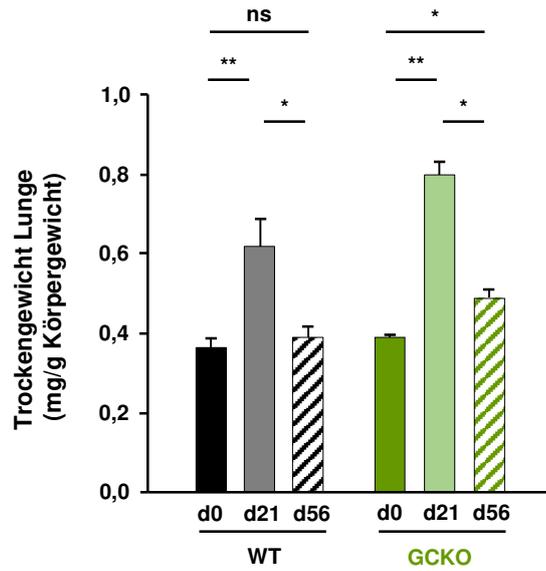


Abbildung 27: Kollageneinlagerung in der Bleomycin-behandelten Lunge

Lungenschnitte von unbehandelten und Bleomycin-behandelten Reporter-mäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors exprimieren (PDGFR β /tom; rot) wurden zeitgleich mit Antikörper gegen col1 α 1 (grün) gefärbt (A). Das Überlagerungsbild zeigt eine Kolokalisation von PDGFR β /tom und col1 α 1 (gelb) in fibrotischen Bereichen und somit eine EZM-Ablagerung durch Myofibroblasten in der Alveolarwand (A und B). Die grüne Färbung in den Alveolen zeigt eine Kollagenproduktion durch intra-alveoläre Myofibroblasten (Pfeile, A und B).

Rückgang beobachtet werden. Das Trockengewicht war im Vergleich zu unbehandelten GCKO-Tieren leicht erhöht (Abbildung 28A). Der Kollagengehalt nahm sowohl bei WT- als auch bei GCKO-Lungen an Tag 56 ab, war aber verglichen mit den unbehandelten Kontrollen erhöht (Abbildung 28B). Diese biochemischen Untersuchungen sprechen dafür, dass es zu einer Wiederherstellung der intakten Lungenstruktur nach der Bleomycin-induzierten Verletzung kommt. Der Abbau des vermehrt produzierten Kollagens scheint dabei mehr Zeit zu beanspruchen als die Reepithelialisierung und Neubildung der Alveolen. Um das Schicksal der beiden identifizierten Myofibroblasten-Subtypen bei der Auflösung der Fibrose zu verfolgen, wurde PDGFR β /tomato-Reportermause, wie in Abbildung 28A dargestellt, zunächst Tamoxifen intraperitoneal und danach Bleomycin intratracheal verabreicht. Lungen wurden jeweils an Tag 21 oder Tag 56 nach Bleomycin-Instillation entnommen und fixiert. Wie bereits gezeigt, war die fibrotische Antwort nach 21 Tagen durch die Proliferation von zwei Arten von PDGFR β -immunopositiven Myofibroblasten gekennzeichnet: (1) tomato-positive Myofibroblasten, die in der Alveolarwand lokalisiert sind, und (2) tomato-negative Myofibroblasten, die sich innerhalb der Alveolarräume befinden (Abbildung 29B). Nach 56 Tagen konnten nur noch wenige Bereiche mit fibrotischen Merkmalen detektiert werden. Der Großteil der Alveolararchitektur ähnelte der einer gesunden Lunge (Abbildung 29C). Einige Areale wiesen jedoch immer noch verdickte Alveolarwände auf. In diesen konnte eine verstärkte PDGFR β -Signalintensität und erhöhte Anzahl von tomato-positiven Zellen gezeigt werden. Außer in vaskulären Glattmuskelzellen wurden keine Fluoreszenzsignale für α -SMA detektiert, was die Abwesenheit von α -SMA-positiven Myofibroblasten zeigt (Abbildung 29D). Folglich konnte eine fast vollständige Kollokalisierung des tomato-Signals mit der PDGFR β -Immunofluoreszenz gezeigt werden (siehe Abbildung 29C). Aus diesen immunhistochemischen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass Myofibroblasten während der Auflösung der Lungenfibrose verschwinden. Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, welcher Mechanismus für den Untergang dieser Zellen verantwortlich ist. Zum einen ist vorstellbar, dass beide Myofibroblasten-Subtypen durch Apoptose zugrunde gehen. Zum anderen sprechen die verbleibenden Cluster tomato-exprimierender Zellen dafür, dass die von Perizyten abstammenden interstitiellen Myofibroblasten in der verdickten Alveolarwand verbleiben, aber kein α -SMA mehr exprimieren. Daher könnte eine Behandlung dieser NO-GC-positiven Myofibroblasten mit Substanzen, die anti-proliferativ wirken und das cGMP-Level erhöhen, eine sinnvolle therapeutische Option darstellen und somit die Verdickung der Alveolarwand reduzieren.

A



B

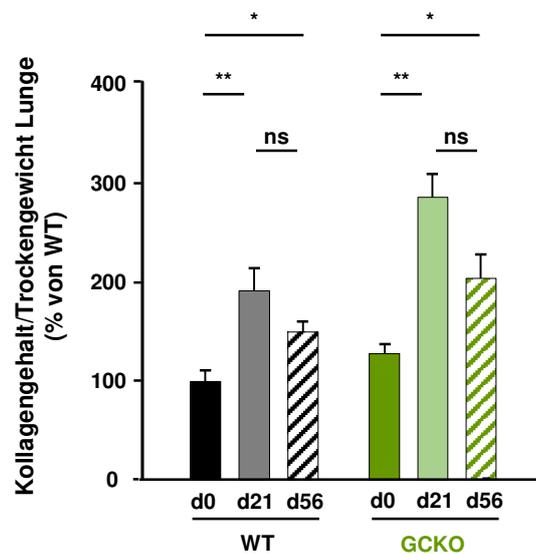
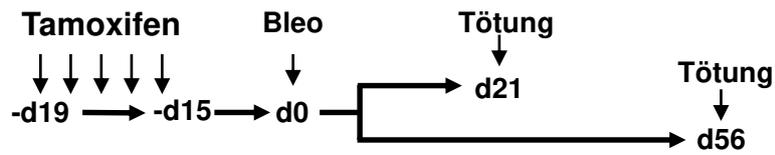


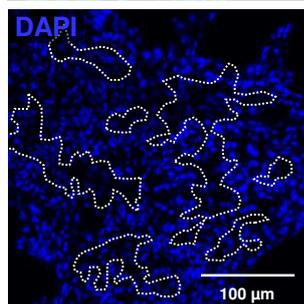
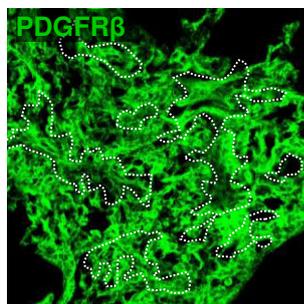
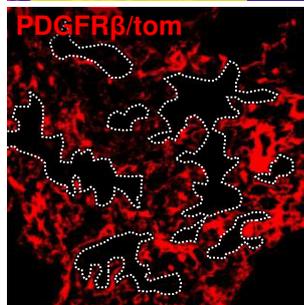
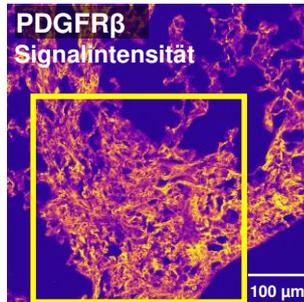
Abbildung 28: Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt 56 Tage nach Bleomycin-Behandlung

Das Trockengewicht (A) und der Kollagengehalt (B) der Lungen von WT-, GCKO-Tieren wurden bestimmt. Zur Analyse des Trockengewichts wurde die linke Lunge getrocknet, mit Salzsäure gekocht, um die Struktur aufzulösen und der Kollagengehalt mittels kolorimetrischer Messung quantifiziert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von n=5-11 pro Genotyp (ns=nicht signifikant; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$).

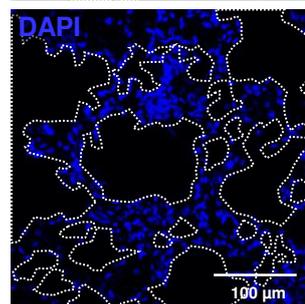
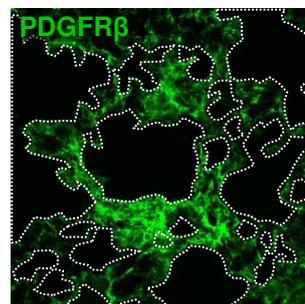
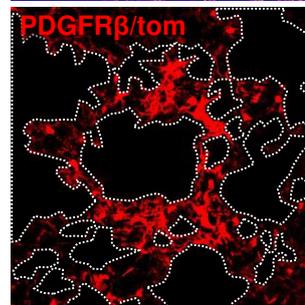
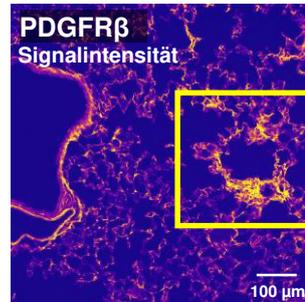
A PDGFR β /tomato



B d21



C d56



D d56

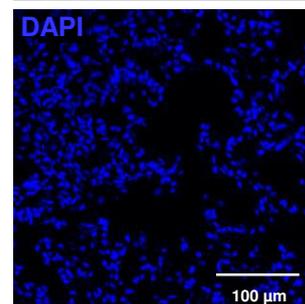
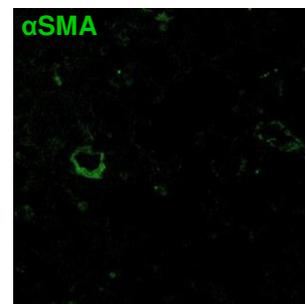
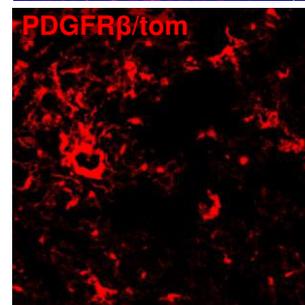
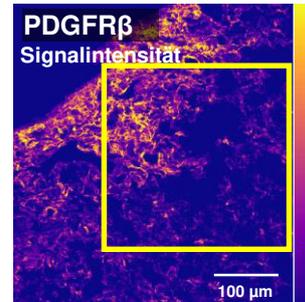


Abbildung 29: Auflösung fibrotischer Veränderungen der Lunge

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. PDGFR β /tomato-Reportermäusen wurde Tamoxifen an 5 aufeinander folgenden Tagen gespritzt, um die Expression von tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors (PDGFR β /tom; rot) zu induzieren. 15 Tage später (=d0) wurden Mäuse mit Bleomycin (Bleo) behandelt. Lungen wurden 21 oder 56 Tage (=d21 oder d56) später entnommen (A). PDGFR β -Färbung und -Signalintensität zeigen fibrotische Veränderungen an d21 und eine fast vollständige Auflösung der fibrotischen Vernarbung an d56. Die Signalintensität ist durch Pseudofarben dargestellt, die von gelb (hohe Signalintensität) bis lila (geringe Signalintensität) reichen. DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

5. Diskussion

Die Lungenfibrose ist das Ergebnis einer abnormalen Wundheilung. Myofibroblasten gelten als Schlüsselregulatoren bei Organverletzungen und Wundheilungsreaktionen. Bei der Lungenfibrose sind sie für die übermäßige Produktion und Einlagerung von Kollagen verantwortlich. Die Herkunft dieser Zellen ist noch weitgehend unbekannt. Als mögliche Vorläuferzellen werden endotheliale, epitheliale und mesotheliale Zellen, Fibroblasten, zirkulierende Fibrozyten sowie ortsständige Perizyten genannt. Zudem sind verschiedene Signalwege an der Wundheilung und Pathophysiologie der Lungenfibrose beteiligt. An unterschiedlichen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) und der *Second Messenger* cGMP an fibrotischen Prozessen beteiligt sind. In diesen Studien zeigte sich ein protektiver Effekt (Beyer *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2014; Beyer *et al.*, 2015). Dennoch ist wenig über die Rolle der NO-GC während der Lungenfibrose bekannt. Auch der spezifische Zelltyp, der die NO-GC in der Lunge exprimiert, ist noch nicht identifiziert. Um eine Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade an der fibrotischen Antwort zu untersuchen, wurden verschiedene Knockout-Mauslinien verwendet, die eine globale Deletion der NO-GC (GCKO) oder eine Perizyten-spezifische Deletion (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) aufweisen. Zur Aufklärung der Herkunft von Myofibroblasten wurden Lineage Tracing-Versuche mit tomato-Reportermäusen (PDGFR β /tomato, SMMHC/tomato, NG2/tomato, Tie2/tomato, FoxD1/tomato) durchgeführt.

In dieser Arbeit sollten daher folgende Punkte detailliert untersucht und diskutiert werden:

- (1) Die Expression der NO-GC in der Lunge
- (2) Die Beteiligung der NO-GC an der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose
- (3) Identifikation und Herkunft von Myofibroblasten bei der Lungenfibrose

5.1 Das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose

Das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose ist das am besten charakterisierte und am häufigsten verwendete Mausmodell, um fibrotische Prozesse nach Verletzung des Lungengewebes zu analysieren (Moeller *et al.*, 2008; Moore und Hogaboam, 2008; Mouratis und Aidinis, 2011). Durch die einmalige Gabe von Bleomycin kommt es im Mausmodell zunächst nur zu einer inflammatorischen Antwort, die mit einer Einlagerung von EZM assoziiert ist. Läuft der in Gang gesetzte Wundheilungsprozess in angemessenem Ausmaß ab, so kann innerhalb von 6 Wochen eine Auflösung der fibrotischen Veränderungen sowie eine Wiederherstellung der physiologischen Lungenarchitektur beobachtet werden (Chung *et al.*, 2003). Erst die mehrmalige Gabe von Bleomycin führt zu einer anhaltenden und manifesten Lungenfibrose, die sich nicht mehr zurückbildet (Chung

et al., 2003; Degryse *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2016). Nach der einmaligen Gabe von Bleomycin ist die fibrotische Antwort zwischen Tag 14 und Tag 28 besonders stark ausgeprägt (Degryse und Lawson, 2011). In der Tat konnte in dieser Arbeit 21 Tage nach der intratrachealen Gabe von Bleomycin eine Lungenverletzung beobachtet werden. Diese war durch ein vermehrtes Auftreten von PDGFR β -positiven Zellen, eine verstärkte Expression von PDGFR β sowie die Anwesenheit von Myofibroblasten und eine Einlagerung von Kollagen gekennzeichnet (siehe Abbildung 14-16).

Dennoch können durch das Modell der einmaligen intratrachealen Gabe von Bleomycin nicht alle typischen Merkmale der humanen Erkrankung nachgestellt werden. Insbesondere die chronischen Aspekte werden nicht berücksichtigt, die beim Menschen erst nach einer wiederholten Verletzung der Lunge entstehen. Trotz dieser erwähnten Nachteile lässt sich durch das Modell der einmaligen Gabe von Bleomycin die Transdifferenzierung von Myofibroblasten, die Einlagerung von EZM und die *de novo*-Produktion von α -SMA untersuchen. Abweichende Ergebnisse in verschiedenen Studien zur Lungenfibrose könnten in der Wahl der eingesetzten Bleomycin-Konzentration sowie dem Zeitpunkt der Beobachtung fibrotischer Veränderungen begründet sein. Bei der intratrachealen Gabe variiert die eingesetzte Bleomycin-Konzentration in verschiedenen publizierten Studien zwischen 1,25-4 U/kg Körpergewicht. Die Endpunkte liegen zwischen Tag 14 und 28. Ausgeprägte histopathologische Effekte lassen sich nach 21 Tagen beobachten (Moore und Hogaboam, 2008). Dennoch wird häufig auch Tag 14 als geeigneter Zeitpunkt für eine Bewertung der Lungenfibrose verwendet. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine fibrotische Antwort, die weniger variabel erscheint. Es kommt zur Ausbildung von verdickten Septen, einer intra-alveolären Fibrose mit der Bildung von Myofibroblasten innerhalb der Alveolen. Zudem ist an Tag 14 eine geringere Mortalität im Vergleich zu Tag 21 aufzuweisen. An Tag 21 nach Bleomycin-Gabe sind fibrotische Veränderungen unterschiedlich ausgeprägt, es gibt nahezu unauffällige Lungen bis hin zu sehr stark betroffenen Lungen (Izbicki *et al.*, 2002). Dies war auch in den in dieser Arbeit eingesetzten Tieren zu beobachten. Dennoch wurde Tag 21 als Endpunkt gewählt, da die maximale Ausprägung untersucht werden sollte. Neben der intratrachealen Gabe existieren noch andere Wege der Verabreichung. Möglich ist eine intravenöse, intraperitoneale und subkutane Gabe. Der Nachteil dieser Methoden liegt jedoch darin, dass die einzusetzende Konzentration deutlich höher ist als bei der intratrachealen Gabe und somit von einer höheren Belastung der Versuchstiere auszugehen ist (Mouratis und Aidinis, 2011).

5.2 Expression der NO-GC in Lungenperizyten

Seit langem ist bekannt, dass die NO-GC stark in Lungengewebe exprimiert wird. Das Dimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, wurde bereits vor mehreren Jahren

aus Ratten- und Rinderlungen isoliert (Garbers, 1979; Humbert *et al.*, 1990). Dennoch wurde der NO-GC-exprimierende Zelltyp in der Lunge noch nicht identifiziert. Daher sollte in dieser Arbeit zunächst mittels immunhistochemischer Färbungen sowie unter Verwendung von zellspezifischen Knockout-Mäusen die genaue zelluläre Lokalisation der NO-GC in der murinen Lunge untersucht werden. Es zeigt sich, dass die NO-GC stark in Perizyten der Lunge exprimiert wird (siehe Abbildung 6-9). Allgemein ist die Identifikation von Perizyten nicht trivial, da sie eine Vielzahl an molekularen Markern exprimieren, es jedoch keinen exklusiv exprimierten Marker gibt. In der Literatur werden daher verschiedene Proteine beschrieben, die zur Detektion von Perizyten verwendet werden können. Diese werden jedoch je nach Organ, Lokalisation, Entwicklungsstatus, Aktivierung der Perizyten und Gefäßtyp dynamisch und differenziert exprimiert (Murfee *et al.*, 2005; Crisan *et al.*, 2012). Desmin und α -SMA sind zwei kontraktile Filamente, die als intrazelluläre Marker verwendet werden. NG2 und PDGFR β dagegen sind Angiogenese-assoziierte Rezeptorproteine und somit auf der Zelloberfläche lokalisiert (Bergers und Song, 2005; Diaz-Flores *et al.*, 2009; Armulik *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden daher zur Identifikation der Perizyten Antikörper gegen zwei unterschiedlich zellulär lokalisierte Proteine, Desmin und PDGFR β , eingesetzt, sowie das Aussehen der Zellen und deren unmittelbare Nachbarschaft zu vaskulären Endothelzellen berücksichtigt. Es konnte eine Koexpression beider Marker mit der NO-GC gezeigt werden. Diese Zellen zeigten spindelförmige Ausläufer, die sich um das vaskuläre Endothel winden. Somit konnte die Expression der NO-GC in Lungenperizyten bewiesen werden (siehe Abbildung 6).

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte mit Hilfe von zellspezifischen Cre-Reportermäusen die Existenz von zwei verschiedenen Perizyten-Subpopulationen in der murinen Lunge gezeigt werden. Diese konnten durch eine differenzierte Expression von Markern identifiziert werden. Alle PDGFR β -positiven Perizyten exprimierten die NO-GC (siehe Abbildung 10C). Diese Population stammte nicht, wie von Hung *et al.* (2013) beschrieben, von FoxD1-positiven Vorläuferzellen ab (siehe Abbildung 13B). Der Pool von NO-GC-exprimierenden Perizyten konnte in zwei Subpopulationen unterteilt werden: Eine große Population bestehend aus PDGFR β /SMMHC-positiven Perizyten und eine kleine Population, die aus PDGFR β /NG2-positiven Perizyten besteht. Diese Ergebnisse bestätigen die Heterogenität und Variabilität dieser Zellpopulation (Diaz-Flores *et al.*, 2009; Armulik *et al.*, 2011). Um die Perizyten-spezifische Expression der NO-GC sowie die Spezifität des NO-GC-Antikörpers nachzuweisen, wurde die Deletion der NO-GC in Lungenperizyten überprüft. Dazu wurde die PDGFR β -CreER^{T2}-Linie verwendet. Ein PDGFR β -Cre-vermittelter Ausschnitt der NO-GC zeigte sich nicht nur in Lungenperizyten, sondern auch in Glattmuskelzellen der Lungengefäße (siehe Abbildung 9A). Somit ist der PDGFR β -Promotor in der Lunge nicht spezifisch für Perizyten. Dennoch konnte durch die

PDGFR β -Cre-vermittelte Deletion die schon zuvor mittels Immunhistochemie gezeigte Expression der NO-GC in Lungenperizyten bestätigt werden. Unter Verwendung des SMMHC-GCKO, des NG2-GCKO sowie des Doppel-Knockouts wurde zudem belegt, dass sich in der murinen Lunge die Perizyten-Population aus SMMHC-positiven und NG2-positiven Zellen zusammensetzt: Der SMMHC-GCKO zeigte entsprechend eine fast vollständige Deletion der NO-GC. Der NG2-GCKO zeigte nur in einigen Zellen eine Deletion der NO-GC und erst der Doppel-Knockout führte zu einer vollständigen Deletion der NO-GC in Lungengewebe (siehe Abbildung 9B-D).

5.3 Beteiligung der NO-GC an der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose

Die Rolle der NO/cGMP-Signalkaskade in Lungenperizyten ist bislang noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NO-GC-exprimierende Perizyten Vorläuferzellen von interstitiellen Myofibroblasten sind (siehe Abbildung 20-22). Diese produzieren während der Entwicklung der Fibrose Kollagen, das in den Alveolarwänden eingelagert wird (siehe Abbildung 27). Daher ist anzunehmen, dass der NO/cGMP-Signalweg an der Wundheilung sowie an fibrotischen Prozessen beteiligt ist. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der NO-GC zu einer Verbesserung der Fibrose in verschiedenen Organen, wie Herz, Niere und Leber führt (Hohenstein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007; Knorr *et al.*, 2008; Masuyama *et al.*, 2009; Mihout *et al.*, 2011; Sandner und Stasch, 2017). In der Lunge dagegen wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt, die eine protektive Rolle der NO-GC bei der Lungenfibrose vermuten lassen (Beyer *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2014; Beyer *et al.*, 2015). Daher wurden in dieser Arbeit die NO-GC und ihre modulatorische Rolle während der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung näher untersucht. Biochemische Analysen an Lungen zeigten 21 Tage nach Bleomycin-Gabe keine Unterschiede des Trockengewichts zwischen dem GCKO und dem WT. Dennoch konnte eine Erhöhung des Kollagengehalts in der GCKO-Lunge beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Dies lässt eine Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade an der Einlagerung von EZM während der Fibrose vermuten. Tatsächlich zeigte sich in immunhistochemischen Untersuchungen, dass die Abwesenheit der NO-GC zur Entstehung von größeren und kompakteren fibrotischen Regionen führt. Diese wiesen zudem eine verstärkte PDGFR β -Signalintensität im Vergleich zur fibrotischen WT-Lunge auf. Neben diesen Unterschieden waren die α -SMA-Fasern innerhalb der Myofibroblasten von GCKO-Lungen desorganisierter als in WT-Lungen (siehe Abbildung 17). Dies weist darauf hin, dass die NO-GC die Steifheit der Lunge, die Kontraktilität des Gewebes und die Architektur beeinflussen könnte. Obwohl die Mechanik des Lungengewebes nicht weiter untersucht wurde, ist davon auszugehen, dass die NO-GC eine Rolle bei der Aktivierung von TGF- β spielt. Bei der Hautfibrose führt die

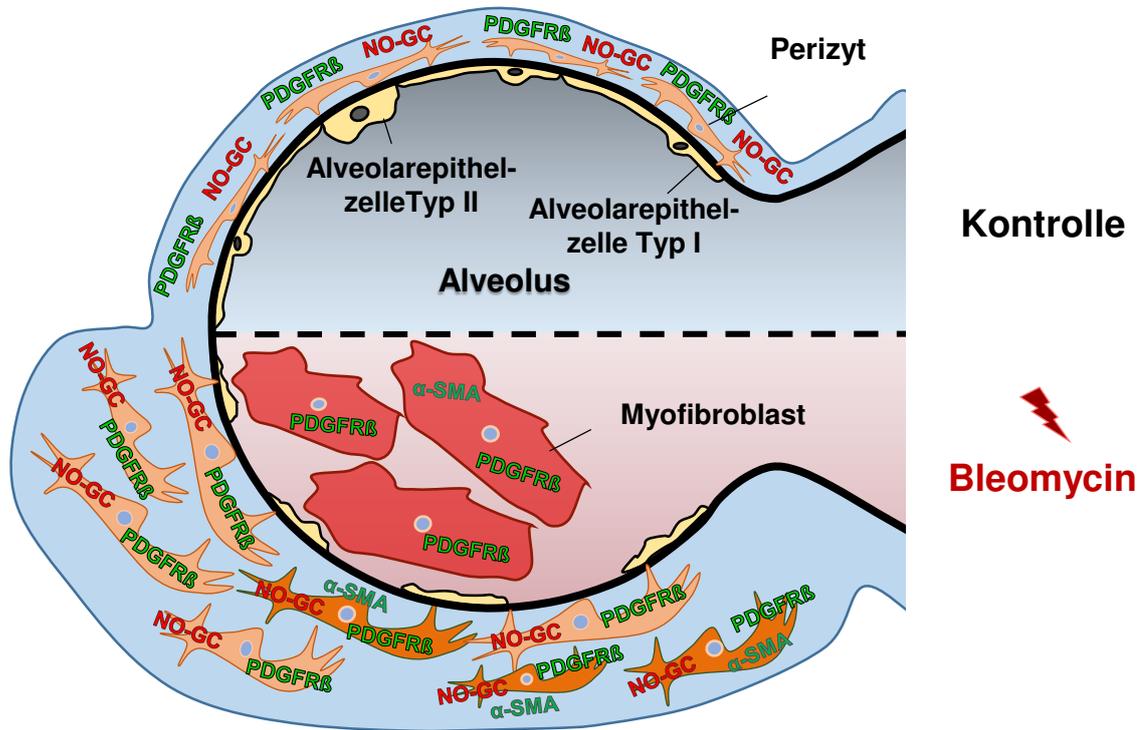
pharmakologische Stimulation der NO-GC zu einer Reduktion fibrotischer Veränderungen (Beyer *et al.*, 2012). Anti-fibrotische Effekte werden über eine Inhibition des TGF- β -Signalweges vermittelt und die Anzahl von Myofibroblasten vermindert sich (Beyer *et al.*, 2015). Studien an Triple-NOS-Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass die Gabe von exogenem NO das Fortschreiten der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung verhindert (Noguchi *et al.*, 2014). Diese Daten deuten auf eine protektive Rolle der NO-GC und des sekundären Botenstoffes cGMP in Mäusen hin und stehen in Einklang mit den in GCKO-Lungen gemachten Beobachtungen. Da bereits in vielen Systemen ein anti-proliferativer Effekt der NO/cGMP-Signalkaskade beschrieben wurde (Moroi *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998), scheint die Modulation der NO-GC-Aktivität und somit des cGMP-Spiegels auch bei der Lungenfibrose eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie zu sein.

5.4 Identifikation und Herkunft von Myofibroblasten

Myofibroblasten sind die Schlüsselzellen der Wundheilung und Organfibrose (Kim *et al.*, 2006; Barnes und Gorin, 2011; Fernandez und Eickelberg, 2012; Hung *et al.*, 2013; Ahluwalia *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnten erstmalig zwei unterschiedliche Myofibroblasten-Subtypen durch die Expression der NO-GC differenziert werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten NO-GC-negative Myofibroblasten, die sich innerhalb der Alveolen befanden. Ein zweiter Myofibroblasten-Subtyp war in der Alveolarwand lokalisiert und zeigte keine Expression der NO-GC (Abbildung 30).

5.4.1 α -SMA als Marker für Myofibroblasten

Myofibroblasten wurden in der vorliegenden Arbeit durch die *de novo*-Expression von α -SMA identifiziert. In der Literatur wird α -SMA als ein typischer Marker für pathologisch auftretende Myofibroblasten verwendet. Dennoch handelt es sich hierbei um einen inkonsistenten Marker (Sun *et al.*, 2016). Durch die lokale Verletzung des Gewebes kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von speziellen mesenchymalen Zellen. Diese werden als aktivierte Fibroblasten oder Myofibroblasten bezeichnet und ursprünglich durch die Expression von α -SMA identifiziert. α -SMA-positive Myofibroblasten stellen jedoch nur eine Gruppe von aktivierten Fibroblasten dar. Ihr Auftreten variiert sowohl räumlich als auch zeitlich. Zudem wird die Existenz einer weiteren Gruppe aktivierter Fibroblasten diskutiert, die für die Produktion und Einlagerung von Kollagen, aber auch für Reparaturprozesse verantwortlich sind (Di Carlo und Peduto, 2018). Beide in dieser Arbeit beobachteten Typen von Myofibroblasten, die sich in der Expression von NO-GC sowie der Lokalisation unterscheiden, waren durch eine *de novo*-Expression von α -SMA gekennzeichnet. Interessanterweise stellten die α -SMA-positiven Zellen nur eine Untergruppe der PDGFR β -



Interstitielle Myofibroblasten

Intra-alveoläre Myofibroblasten

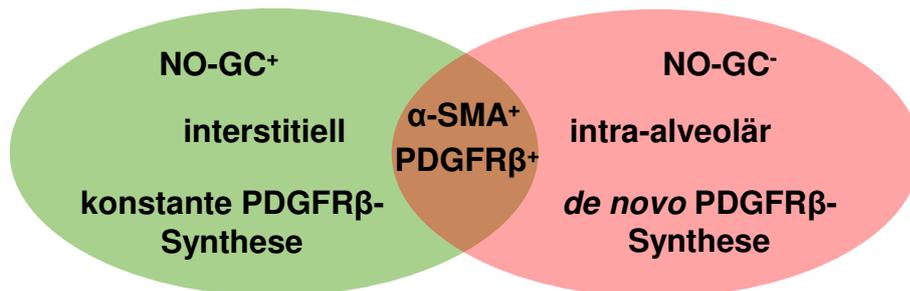


Abbildung 30: Differenzierung von zwei Myofibroblasten-Subtypen

Dargestellt ist ein Alveolus vor und nach Behandlung mit Bleomycin. Es lassen sich zwei verschiedene Myofibroblasten-Subtypen anhand der Lokalisation und Expression der NO-GC unterscheiden. Nähere Beschreibung im Text.

positiven Myofibroblasten dar (siehe Abbildung 18). Möglicherweise haben zum Zeitpunkt der stärksten Fibrose schon einige Myofibroblasten die Expression von α -SMA verloren. Dies stünde in Einklang mit Beobachtungen, dass die Expression von α -SMA reversibel ist. Darby *et al.* (1990) stellten eine transiente Expression von α -SMA in Myofibroblasten während der Wundheilung fest. Etwa 70% der Myofibroblasten waren α -SMA-positiv. Die Expression war zwischen Tag 6 und Tag 15 nachzuweisen. Danach konnte ein Rückgang der α -SMA-Signalintensität beobachtet werden. An Tag 30 konnte keine Färbung von α -SMA in Myofibroblasten gezeigt werden. Somit wird α -SMA in Myofibroblasten nur temporär exprimiert (Darby *et al.*, 1990). Darüber hinaus wäre es möglich, dass bei der Entwicklung der Lungenfibrose auch α -SMA-negative Myofibroblasten entstehen, die niemals α -SMA exprimiert haben. Durch die Heterogenität der Myofibroblasten-Population könnte die Rolle dieses Zelltyps bei der Entstehung der Lungenfibrose noch weitaus komplexer sein als bisher angenommen.

5.4.2 Herkunft von Myofibroblasten

Da die Herkunft von Myofibroblasten kontrovers diskutiert wird und in neuesten Studien residierende Lungenperizyten als wichtige Vorläuferzellen genannt werden (Fernandez und Eickelberg, 2012; Hung *et al.*, 2013), wurden Lineage Tracing-Studien mit Reporter-mäusen durchgeführt. Bei den Lineage Tracing-Versuchen wurde die Expression des rot fluoreszierenden Proteins zur zellspezifischen Markierung verwendet. Dadurch lässt sich das Schicksal der mit tomato markierten Zellen nachverfolgen. So sollte zunächst in ersten Kontrollversuchen an unbehandelten Lungen untersucht werden, dass der PDGFR β -Promotor auch in den Zellen aktiv ist, in denen ein Antikörpersignal für PDGFR β und die NO-GC detektiert werden konnte. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass alle PDGFR β /tomato-exprimierenden Zellen sowohl mit dem Antikörper gegen PDGFR β als auch gegen NO-GC angefärbt werden konnten (siehe Abbildung 10B und C). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass sich PDGFR β /tomato-Reporter-mäuse für das Lineage Tracing von PDGFR β -positiven und NO-GC-exprimierenden Perizyten eignen. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei tomato um ein Fluoreszenzprotein handelt, das stark im Zellkern akkumuliert. Es ist dennoch auch im Zytosol vorhanden, jedoch erst bei stärkerer Expressionsrate mit dem Konfokalmikroskop detektierbar. Das tomato-Signal war teilweise nur schwach in den Ausläufern der Perizyten zu erkennen. Da die Antikörper zytosolisch oder membran-assoziiert sind, konnte meist keine direkte Kollokalisierung des tomato-Signals mit den verwendeten Antikörpern detektiert werden (siehe Abbildung 10-13).

Um das Schicksal von Perizyten zu verfolgen, wurde die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PDGFR β -Promotors exprimiert, da PDGFR β sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen als ein nahezu selektiver Marker für Perizyten herausstellte. Die Verwendung der konstitutiven PDGFR β -Cre-Linie, die in vorherigen Studien eingesetzt wurde (Henderson *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016), ermöglicht jedoch nicht zwischen den beiden Subtypen von Myofibroblasten zu unterscheiden, da beide PDGFR β exprimieren. Daher wurde in dieser Arbeit die Tamoxifen-induzierbare PDGFR β -CreER^{T2} eingesetzt, die ein zeitlich kontrolliertes Markieren von Zellen mit aktivem PDGFR β -Promotor in der adulten Lunge ermöglicht. In Bleomycin-behandelten Lungen konnte nachgewiesen werden, dass die Myofibroblasten innerhalb der Alveolarwand, die sich vor allem an der Grenze zu gesundem Gewebe befinden, von NO-GC/PDGFR β -positiven Perizyten abstammen. Die intra-alveolären Myofibroblasten dagegen zeigten zwar nach Verletzung der Lunge eine *de novo*-Expression von PDGFR β , jedoch konnten NO-GC/PDGFR β -positive Perizyten als Quelle dieses zweiten Myofibroblasten-Subtyps ausgeschlossen werden, da diese Zellen kein *tomato* exprimierten (siehe Abbildung 20-22).

Die zelluläre Herkunft der intra-alveolären Myofibroblasten konnte noch nicht charakterisiert werden. Durch die Verwendung von verschiedenen *tomato*-Reportermausen konnten einige Zellen als Quelle dieser Myofibroblasten durch Lineage Tracing-Versuche ausgeschlossen werden. So zeigte sich, dass intra-alveoläre Myofibroblasten nicht von PDGFR β -positiven Perizyten abstammen. Wie bei Rock *et al.* (2011) konnte auch in dieser Arbeit keine Beteiligung von NG2-positiven Perizyten an der Transition zu α -SMA-positiven Myofibroblasten nachgewiesen werden. Hung *et al.* (2013) dagegen zeigten, dass Perizyten, die von FoxD1-positiven Vorläuferzellen abstammen, zum Pool der Kollagenproduzierenden Zellen beitragen. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch Endothelzellen keine Vorläuferzellen von Myofibroblasten sind. Eine Proliferation der rot markierten Endothelzellen (siehe Abbildung 25) unterstreicht, dass es bei der Lungenfibrose zu einer Neovaskularisation und einer vaskulären Umgestaltung kommt (Turner-Warwick, 1963; Renzoni *et al.*, 2003; Cosgrove *et al.*, 2004). Ebenfalls werden zirkulierende Fibrozyten als mögliche Vorläuferzellen von Myofibroblasten genannt (Strieter *et al.*, 2009; Sontake *et al.*, 2015). Entgegen dieser Daten konnte in der vorliegenden Arbeit keine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nachgewiesen werden. Es wurden jedoch nur Fibrozyten-spezifische Antikörper verwendet (siehe Abbildung 26). Um das Schicksal von Fibrozyten während der Lungenfibrose genauer zu untersuchen, müssten Fibrozyten-spezifische Reportermause verwendet und entsprechende Lineage Tracing-Versuche durchgeführt werden.

5.4.3 Differenzierung von zwei Myofibroblasten-Subtypen

Die genaue Funktion der beiden unterschiedlichen Subtypen von Myofibroblasten während der fibrotischen Antwort konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die unterschiedliche Lokalisation dieser Zellen impliziert jedoch spezifische Funktionen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.2.1 erwähnt lieferten immunhistochemische Färbungen den Beweis, dass Perizyten sich in Myofibroblasten transdifferenzieren, die in der Alveolarwand verbleiben. Diese Myofibroblasten waren hauptsächlich an den Randbereichen fibrotischer Areale lokalisiert. Da die Myofibroblasten in der Alveolarwand NO-GC-positiv sind, könnten sie an der Angiogenese (Bettaga *et al.*, 2015) und somit der Wiederherstellung der alveolären Kapillarisation beteiligt sein. Im Gegensatz dazu befinden sich die großen, multipolaren Myofibroblasten innerhalb der Alveolen und weisen prominente, aus Aktin bestehende Filamente auf. Demnach könnte es sich bei diesen Zellen um Platzhalter handeln, die den Alveolarraum nach der Verletzung der Lunge ausfüllen und somit die Grenzen für eine Realveolarisation definieren. Es wird eine exzessive und irreversible Wundheilung verhindert, indem die Alveolen durch die eingewanderten Myofibroblasten offen gehalten werden. Eine relativ schwache Produktion von col1 α 1 durch diesen Subtyp spricht dafür, dass die Kollagenfasern vielmehr der Fixierung der Zellen in den Alveolarräumen dienen, als zur charakteristischen Verdickung der Interalveolarsepten, die bei einer Lungenfibrose auftritt. Da die intra-alveolären Myofibroblasten im Verlauf der Verletzung verschwinden, könnte eine Verlängerung ihrer Präsenz oder Halbwertszeit dazu beitragen, frühe irreversible Veränderungen der Lungenstruktur zu verhindern, indem sie die Wiederherstellung der Alveolen unterstützen und verbessern. Neben der vermehrten Produktion von col1 α 1 kann in fibrotischem Gewebe eine erhöhte Expression von Kollagen Typ III α 1 (col3 α 1) beobachtet werden (Zhang *et al.*, 2013). Während der Wundheilung wird zunächst col3 α 1 produziert und erst in der späteren Phase durch col1 α 1 ersetzt. In dieser Arbeit wurde eine Einlagerung von col3 α 1 mittels immunhistochemischer oder biochemischer Untersuchungen nicht überprüft. Es wäre jedoch vorstellbar, dass die intra-alveolären Myofibroblasten vermehrt col3 α 1 produzieren und somit eine Grundmatrix vorgeben, die die Einwanderung von Endothel- und Epithelzellen und somit eine Angiogenese und Realveolarisation der verletzten Region ermöglichen. Perizyten produzieren zudem col1 α 1 (siehe Abbildung 27). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die zwei Subtypen von Myofibroblasten unterschiedliche Funktionen während der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung haben. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ihre genaue Rolle zu charakterisieren.

Unter Verwendung der PDGFR β /tomato-Reportermause konnte zudem eine Proliferation der tomato-markierten, NO-GC-positiven Perizyten in fibrotischen Regionen beobachtet werden (siehe Abbildung 20). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei

verschiedene Subpopulationen den Gesamtpool der Perizyten in der Lunge bilden. Daher wurden zwei weitere Reportermause (SMMHC/tomato und NG2/tomato) untersucht. Nach Bleomycin-Gabe zeigte sich sowohl eine Vermehrung von SMMHC/tomato als auch von NG2/tomato Zellen, was auf eine Proliferation beider Zelltypen hindeutet (siehe Abbildung 11,12 und 24). Daher sind beide Perizyten-Subtypen (SMMHC/PDGFR β -positive und NG2/PDGFR β -positive) am fibrotischen Prozess in der murinen Lunge beteiligt. Allerdings wäre die Vermutung, dass beide Subpopulationen gleichermaßen an fibrotischen Prozessen beteiligt sind, bei der repetitiven Gabe von Bleomycin oder der Auflösung der fibrotischen Veränderungen zu überprüfen.

5.4.4 Auflösung der Lungenfibrose

Wie schon erwähnt ist die Lungenfibrose, die sich nach einmaliger Gabe von Bleomycin einstellt, in der Maus reversibel (Chung *et al.*, 2003). Daher lässt sich mit Hilfe des Bleomycin-induzierten Modells die Rolle der Myofibroblasten nicht nur während der Entstehung, sondern auch während der Auflösung fibrotischer Veränderungen untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte 56 Tage nach der Gabe von Bleomycin beobachtet werden, dass sich immer noch kleinere fibrotische Bereiche inmitten von gesundem Gewebe befinden. Diese Regionen waren wie an Tag 21 nach Gabe von Bleomycin durch eine Anhäufung von tomato-positiven Perizyten gekennzeichnet. Allerdings konnte ein Verschwinden der α -SMA-positiven Myofibroblasten beobachtet werden (siehe Abbildung 29D), was auch schon in verschiedenen Studien beschrieben wurde. Dennoch ist das Schicksal dieser Zellen im Verlauf der Regeneration des Lungengewebes noch ungeklärt. Zum einen wurde beschrieben, dass aktivierte Myofibroblasten bei der Auflösung der Fibrose durch Apoptose eliminiert werden (Issa *et al.*, 2001; Hinz, 2007). Unter Verwendung von Lineage Tracing-Studien konnte eine Dedifferenzierung der aktivierten Myofibroblasten in einen Lipofibroblasten-ähnlichen Phänotyp nachgewiesen werden (El Agha *et al.*, 2017). Die Identifizierung von Vorläuferzellen dieser Myofibroblasten mit Hilfe von geeigneten Reportermaus-Linien gäbe weiteren Aufschluss über das Schicksal dieser Zellen.

In der Literatur wurde bereits eine Proliferation von interstitiellen NG2/PDGFR β -positiven Perizyten-ähnlichen Zellen in fibrotischen Regionen nach Behandlung mit Bleomycin gezeigt (Rock *et al.*, 2011). Das Schicksal dieser Zellen ist dagegen noch unbekannt. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Proliferation von PDGFR β -positiven Perizyten bei der Entwicklung der Lungenfibrose beobachtet werden. Im Gegensatz zu Myofibroblasten verschwanden diese Zellen jedoch nicht bei der Rückbildung der fibrotischen Veränderungen, sondern blieben im Lungeninterstitium vermehrt erhalten (siehe Abbildung 29C und D). Greenhalgh *et al.* (2015) nennen pro-fibrogene Perizyten als

mögliche therapeutische Ziele bei der Lungenfibrose. Dass sich diese Zellen auch nach Ablauf der Wundheilungsreaktion und der Rückbildung fibrotischer Veränderungen nicht auflösen, unterstützt die Hypothese, dass es sich hierbei um die eigentlichen Effektorzellen der chronisch manifesten Fibrose handelt. Denkbar wäre, dass diese Perizyten im Lungeninterstitium verbleiben und, wie schon an Tag 21 gezeigt (siehe Abbildung 27), an der Produktion von col1 α 1 und somit der Verdickung der Alveolarsepten beteiligt sind. Somit wären diese pro-fibrogenen Perizyten die Zielzellen einer möglichen Therapie, um die Einlagerung von EZM zu verhindern oder zu reduzieren und die Verdickung der Alveolarwand zu verhindern. Im Gegensatz dazu könnte die Unterstützung der Bildung von intra-alveolären Myofibroblasten positive Auswirkungen auf die Realveolisierung und Angiogenese nach Verletzung der Lunge haben.

6. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Fragestellungen vermitteln neue Kenntnisse über die Pathogenese der Lungenfibrose auf zellulärer Ebene. Bei der Lungenfibrose handelt es sich um eine chronische Erkrankung, die durch eine initiale Inflammation und das Auftreten von Myofibroblasten gekennzeichnet ist. Die Myofibroblasten führen zu einer vermehrten Produktion von EZM, was in einer Zerstörung der Lungenarchitektur, Narbenbildung und folglich einem verminderten Gasaustausch resultiert. Eine modulatorische Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) bei der Entwicklung der Lungenfibrose wird vermutet, dennoch sind die Effektorzellen in der Lunge noch nicht bekannt.

Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Lokalisation des NO-Rezeptors, der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC), in der Lunge untersucht. Dazu wurden Knockout-Mäuse generiert, bei denen die NO-GC global (GCKO) oder Perizyten-spezifisch (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO) deletiert ist. Zudem wurden tdTomato-Reporter-mäuse verwendet, die das Fluoreszenzprotein unter Kontrolle eines spezifischen Reporters exprimieren (PDGFR β /tomato, SMMHC/tomato, NG2/tomato, FoxD1/tomato und Tie2/tomato). In der Lunge sind Perizyten der NO-GC-exprimierende Zelltyp. Durch Immunhistochemie konnten zudem zwei verschiedene Subpopulationen von NO-GC-exprimierenden Perizyten identifiziert werden: Eine große Population an SMMHC/PDGFR β -positiven Perizyten und eine kleine Population an NG2/PDGFR β -positiven Perizyten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion der NO-GC während der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose untersucht. Bleomycin führt zu einer fibrotischen Antwort in allen Genotypen, was durch ein erhöhtes Lungengewicht und einen erhöhten Kollagengehalt deutlich wird. Der Schweregrad der Lungenverletzung ist in NO-GC-defizienten Mäusen größer als in Anwesenheit der NO-GC. Dies deutet auf eine Rolle der NO-GC bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose hin.

Während der Entstehung der Lungenfibrose kommt es zur Bildung von Myofibroblasten, die als die Schlüsselzellen der Wundheilung und fibrotischer Prozesse bezeichnet werden. Diese Zellen kommen unter physiologischen Bedingungen kaum vor und ihre Herkunft ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Da Perizyten als mögliche Vorläuferzellen betrachtet werden, wurde Lineage Tracing von Perizyten durchgeführt. Erstmals wurden zwei verschiedene Myofibroblasten-Subtypen durch die Expression von NO-GC unterschieden: (1) NO-GC-positive Myofibroblasten, die in der Alveolarwand lokalisiert sind und von Perizyten abstammen und (2) NO-GC-negative Myofibroblasten, die sich innerhalb der Alveolen befinden, deren Ursprung jedoch nicht Perizyten sind. Diese Myofibroblasten zeigen jedoch eine *de novo*-Synthese von PDGFR β . Durch Lineage Tracing-Versuche sowie immunhistochemische Analysen können Perizyten, Endothelzellen und Fibrozyten

als Vorläuferzellen ausgeschlossen werden. Die Ursprungszelle der intra-alveolären Myofibroblasten ist somit bislang nicht identifiziert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Rolle der an der Lungenfibrose beteiligten Zelltypen näher untersucht. Dazu wurde die Auflösung der reversiblen Bleomycin-induzierten Lungenschäden betrachtet. Der Verlust der beiden Myofibroblasten-Subtypen weist darauf hin, dass sie zwar die Effektorzellen der Wundheilungsreaktion, jedoch nicht an der Entstehung der chronisch manifesten Fibrose beteiligt sind. Perizyten proliferieren in Folge der Gabe von Bleomycin und sind vermehrt im Lungenparenchym auch nach Auflösung der Bleomycin-induzierten Lungenverletzung vorzufinden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass es sich hierbei um die Effektorzellen der chronisch manifesten Lungenfibrose handelt, die durch eine Verdickung der Alveolarwand gekennzeichnet ist. Um die zellulären Mechanismen der Lungenfibrose umfassend aufzuklären, müssen weitere Untersuchungen an irreversiblen Fibrosemodellen folgen, die auch die chronischen Charakteristiken der Erkrankung berücksichtigen.

7. Summary

This project provides new insights into the pathogenesis of pulmonary fibrosis on the cellular level. Pulmonary fibrosis is a chronic disease characterized by signs of inflammation and the appearance of myofibroblasts that are responsible for excessive production of extracellular matrix (ECM). This leads to destroyed lung architecture, scar formation and reduced gas exchange. A modulatory role of nitric oxide (NO) in the development of pulmonary fibrosis has been proposed. However, the effector cells in the lung are remain elusive.

The first part of the thesis focused on the localization of NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC) in lung. Pericytes are the major NO-GC-expressing cell type in lung. Knock-out mice were generated lacking NO-GC globally (GCKO) as well as pericyte-specific GCKO mice (PDGFR β -GCKO, SMMHC-GCKO, NG2-GCKO und SMMHC/NG2-GCKO). In addition, reporter mice were used that express tdTomato following cre-mediated recombination (PDGFR β /tomato, SMMHC/tomato, NG2/tomato, FoxD1/tomato und Tie2/tomato). Immunohistochemical analysis shows the existence of two subpopulations of pericytes expressing NO-GC in lung: SMMHC/PDGFR β -positive pericytes and a smaller subpopulation of NG2/PDGFR β -positive pericytes.

In the second part of the thesis, the role of NO-GC during bleomycin-induced lung injury was investigated. Bleomycin led to a fibrotic response in all genotypes as seen by an increase of lung weight and collagen content. Severity of lung injury in NO-GC-deficient

mice was greater compared to wild type (WT) mice following instillation of bleomycin. These results indicate a possible role of NO-GC during bleomycin-induced lung injury.

The development of pulmonary fibrosis is characterized by the formation of myofibroblasts that are known to be key players of wound healing and fibrotic processes. These cells do not occur under physiological conditions and their origin is still under debate. Lineage tracing of pericytes showed that NO-GC-expression allows to differentiate interstitial from intra-alveolar myofibroblasts: (1) NO-GC-positive, pericyte-derived myofibroblasts located in the alveolar wall and (2) NO-GC-negative, intra-alveolar myofibroblasts that are not derived from pericytes but, surprisingly, show *de novo*-expression of PDGFR β after injury. The precursor cell type of intra-alveolar myofibroblasts is not identified yet. Pericytes, endothelial cells and fibrocytes do not transdifferentiate into myofibroblasts.

Investigation of different cell types during resolution of lung fibrosis showed the disappearance of both types of myofibroblast. NO-GC-expressing pericytes that proliferate following administration of bleomycin are still present in an increased number. These results implicate a major role of myofibroblasts during wound healing responses but pericytes could be the effectors of chronic and manifest pulmonary fibrosis that is characterized by thickening of the alveolar wall. For a further understanding of the cellular mechanisms during pulmonary fibrosis investigations on irreversible models of fibrosis need to be performed.

8. Literaturverzeichnis

- Ahlbrecht K & McGowan SE. (2014). In search of the elusive lipofibroblast in human lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **307**, L605-608.
- Ahluwalia N, Shea BS & Tager AM. (2014). New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 867-878.
- al-Khateeb T, Stephens P, Shepherd JP & Thomas DW. (1997). An investigation of preferential fibroblast wound repopulation using a novel in vitro wound model. *J Periodontol* **68**, 1063-1069.
- Almudever P, Milara J, De Diego A, Serrano-Mollar A, Xaubet A, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A & Cortijo J. (2013). Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax* **68**, 938-948.
- Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G & Selman M. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2129-2140.
- Armulik A, Abramsson A & Betsholtz C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**, 512-523.
- Armulik A, Genove G & Betsholtz C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* **21**, 193-215.
- Baenkler HW, Goldschmidt H, Hahn JM, Hinterseer M & Knez A. (2015). *Kurzlehrbuch Innere Medizin* vol. 3. Thieme.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW & Michel T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **270**, 14582-14586.
- Barnes JL & Gorin Y. (2011). Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* **79**, 944-956.
- Bauman KA, Wettlaufer SH, Okunishi K, Vannella KM, Stoolman JS, Huang SK, Courey AJ, White ES, Hogaboam CM, Simon RH, Toews GB, Sisson TH, Moore BB & Peters-Golden M. (2010). The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice. *J Clin Invest* **120**, 1950-1960.
- Behr J, Gunther A, Kreuter M, Koschel D, Prasse A, Pfeifer M & Costabel U. (2017). [Expert Knowledge and Supporting Advice for the Clinical Use of Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis]. *Pneumologie* **71**, 567-579.
- Benjamin LE, Hemo I & Keshet E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591-1598.
- Bergers G & Song S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* **7**, 452-464.
- Betsholtz C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 215-228.
- Bettaga N, Jager R, Dunnes S, Groneberg D & Friebe A. (2015). Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **18**, 245-254.

- Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, Hirth-Dietrich C, von Degenfeld G, Sandner P, Distler O, Schett G & Distler JH. (2012). Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1019-1026.
- Beyer C, Zenzmaier C, Palumbo-Zerr K, Mancuso R, Distler A, Dees C, Zerr P, Huang J, Maier C, Pachowsky ML, Friebe A, Sandner P, Distler O, Schett G, Berger P & Distler JH. (2015). Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling. *Ann Rheum Dis* **74**, 1408-1416.
- Bohme E, Graf H & Schultz G. (1978). Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 131-143.
- Bohme E, Jung R & Mechler I. (1974). Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol* **38**, 199-202.
- Border WA & Noble NA. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**, 1286-1292.
- Border WA & Noble NA. (1995). Targeting TGF-beta for treatment of disease. *Nat Med* **1**, 1000-1001.
- Border WA & Noble NA. (1997). TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* **51**, 1388-1396.
- Border WA & Ruoslahti E. (1992). Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* **90**, 1-7.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH & Valtschanoff JG. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* **22**, 8961-8970.
- Cao Z, Lis R, Ginsberg M, Chavez D, Shido K, Rabbany SY, Fong GH, Sakmar TP, Rafii S & Ding BS. (2016). Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis. *Nat Med* **22**, 154-162.
- Capecchi MR. (1994). Targeted gene replacement. *Sci Am* **270**, 52-59.
- Cavazza A, Rossi G, Carbonelli C, Spaggiari L, Paci M & Roggeri A. (2010). The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: an update. *Respir Med* **104 Suppl 1**, S11-22.
- Chan-Ling T, Page MP, Gardiner T, Baxter L, Rosinova E & Hughes S. (2004). Desmin ensheathment ratio as an indicator of vessel stability: evidence in normal development and in retinopathy of prematurity. *Am J Pathol* **165**, 1301-1313.
- Chaudhary NI, Schnapp A & Park JE. (2006). Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 769-776.
- Chen Q, Zhang H, Liu Y, Adams S, Eilken H, Stehling M, Corada M, Dejana E, Zhou B & Adams RH. (2016). Endothelial cells are progenitors of cardiac pericytes and vascular smooth muscle cells. *Nat Commun* **7**, 12422.
- Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Taylor DO, Kucheryavaya AY & Hertz MI. (2008). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report--2008. *J Heart Lung Transplant* **27**, 957-969.
- Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS & Hunninghake GW. (2003). Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 375-380.

- Clark ER & Clark EL. (1925). A. The development of adventitial (Rouget) cells on the blood capillaries of amphibian larvae. *American Journal of Anatomy*.
- Clouthier DE, Comerford SA & Hammer RE. (1997). Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest* **100**, 2697-2713.
- Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD & Worthen GS. (2004). Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 242-251.
- Crisan M, Corselli M, Chen WC & Peault B. (2012). Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med* **16**, 2851-2860.
- Cutroneo KR, White SL, Phan SH & Ehrlich HP. (2007). Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* **211**, 585-589.
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D & Friebe A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost* **8**, 1343-1352.
- Darby I, Skalli O & Gabbiani G. (1990). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* **63**, 21-29.
- Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M & D'Amore PA. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol* **264**, 275-288.
- Degryse AL & Lawson WE. (2011). Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* **341**, 444-449.
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS & Lawson WE. (2010). Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **299**, L442-452.
- Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M & Group IS. (2005). High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **353**, 2229-2242.
- Desmouliere A. (1995). Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* **19**, 471-476.
- Desmouliere A, Darby IA & Gabbiani G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* **83**, 1689-1707.
- Di Carlo SE & Peduto L. (2018). The perivascular origin of pathological fibroblasts. *J Clin Invest* **128**, 54-63.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martin-Vasallo P & Diaz-Flores L, Jr. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* **24**, 909-969.
- Dimmeler S & Zeiher AM. (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* **6**, 964-968.

- Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F, Eberl G & Peduto L. (2012). Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med* **18**, 1262-1270.
- Eddy AA. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **12**, 353-365.
- Eickelberg O & Selman M. (2010). Update in diffuse parenchymal lung disease 2009. *Am J Respir Crit Care Med* **181**, 883-888.
- El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, De Langhe S, Crnkovic S, Kwapiszewska G, Szibor M, Kosanovic D, Schwind F, Schermuly RT, Henneke I, MacKenzie B, Quantius J, Herold S, Ntokou A, Ahlbrecht K, Braun T, Morty RE, Gunther A, Seeger W & Bellusci S. (2017). Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell* **20**, 261-273 e263.
- Epling GP. (1966). Electron microscopic observations of pericytes of small blood vessels in the lungs and hearts of normal cattle and swine. *The Anatomical Record*.
- Esposito DB, Lanes S, Donneyong M, Holick CN, Lasky JA, Lederer D, Nathan SD, O'Quinn S, Parker J & Tran TN. (2015). Idiopathic Pulmonary Fibrosis in United States Automated Claims Incidence, Prevalence, and Algorithm Validation. *Am J Resp Crit Care* **192**, 1200-1207.
- Evans RA, Tian YC, Steadman R & Phillips AO. (2003). TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* **282**, 90-100.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH & Stasch JP. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 755-768.
- Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A & Sharpe PT. (2011). Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6503-6508.
- Fernandez IE & Eickelberg O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **380**, 680-688.
- Flaherty KR, Travis WD, Colby TV, Toews GB, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL, Flint A, Lynch JP & Martinez FJ. (2001). Histopathologic variability in usual and nonspecific interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1722-1727.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I & Kleinert H. (1994). Nitric-Oxide Synthase Isozymes - Characterization, Purification, Molecular-Cloning, and Functions. *Hypertension* **23**, 1121-1131.
- Forstermann U & Sessa WC. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829-+.
- Friebe A & Koesling D. (1998). Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **53**, 123-127.
- Friebe A & Koesling D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* **93**, 96-105.
- Friebe A, Mergia E, Dangel O, Lange A & Koesling D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7699-7704.
- Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Gaengel K, Genove G, Armulik A & Betsholtz C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 630-638.

- Garbers DL. (1979). Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* **254**, 240-243.
- Garcia-Alvarez J, Ramirez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M & Pardo A. (2006). Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* **23**, 13-21.
- Gaston B. (1997). Expired nitric oxide in pediatric asthma: emissions testing for children? *J Pediatr* **131**, 343-344.
- Gerhardt H & Betsholtz C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15-23.
- Gerzer R, Bohme E, Hofmann F & Schultz G. (1981). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* **132**, 71-74.
- Gharib SA, Johnston LK, Huizar I, Birkland TP, Hanson J, Wang Y, Parks WC & Manicone AM. (2014). MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* **95**, 9-18.
- Green FH. (2002). Overview of pulmonary fibrosis. *Chest* **122**, 334S-339S.
- Greenhalgh SN, Conroy KP & Henderson NC. (2015). Healing scars: targeting pericytes to treat fibrosis. *QJM* **108**, 3-7.
- Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJ, West J & Tata LJ. (2006). Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* **61**, 980-985.
- Groneberg D, Konig P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D & Friebe A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation* **121**, 401-409.
- Groneberg D, Lies B, Konig P, Jager R & Friebe A. (2013). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the nitric oxide receptor. *J Physiol* **591**, 491-502.
- Gross TJ & Hunninghake GW. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **345**, 517-525.
- Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T & Hara N. (2002). TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* **168**, 6470-6478.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M & Attwell D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60.
- Han RN & Stewart DJ. (2006). Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 29-34.
- Hashimoto N, Kawabe T, Imaizumi K, Hara T, Okamoto M, Kojima K, Shimokata K & Hasegawa Y. (2004). CD40 plays a crucial role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 808-815.
- Haslam RJ, Davidson MM, Davies T, Lynham JA & McClenaghan MD. (1978). Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 533-552.
- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A & Betsholtz C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**, 3047-3055.
- Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminiski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP,

- Lacy-Hulbert A, Adams RH & Sheppard D. (2013). Targeting of alpha_v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* **19**, 1617-1624.
- Hinz B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**, 526-537.
- Hinz B & Gabbiani G. (2010). Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol Rep* **2**, 78.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML & Gabbiani G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* **170**, 1807-1816.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M & Gabbiani G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* **180**, 1340-1355.
- Hoch RV & Soriano P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development* **130**, 4769-4784.
- Hohenstein B, Daniel C, Wagner A, Stasch JP & Hugo C. (2005). Stimulation of soluble guanylyl cyclase inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F685-693.
- Houdebine LM. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* **360**, 163-202.
- Hsu YC, Wang LF & Chien YW. (2007). Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* **42**, 599-607.
- Hughes S & Chan-Ling T. (2004). Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2795-2806.
- Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G & Bohme E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* **190**, 273-278.
- Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP & Duffield JS. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* **176**, 85-97.
- Hung C, Linn G, Chow YH, Kobayashi A, Mittelsteadt K, Altemeier WA, Gharib SA, Schnapp LM & Duffield JS. (2013). Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 820-830.
- Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R & McKeever T. (2015). Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J* **46**, 795-806.
- Ignarro LJ. (1990). Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* **67**, 1-7.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9269.
- Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC & Iredale JP. (2001). Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* **48**, 548-557.
- Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW & Breuer R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* **83**, 111-119.

- Kalluri R & Neilson EG. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776-1784.
- Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N & Schuman EM. (1996). A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science* **274**, 1744-1748.
- Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C & Gabbiani G. (1992). Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. *J Histochem Cytochem* **40**, 1955-1963.
- Kasper M & Haroske G. (1996). Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol* **11**, 463-483.
- Kasper M, Koslowski R, Luther T, Schuh D, Muller M & Wenzel KW. (1995). Immunohistochemical evidence for loss of ICAM-1 by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol* **104**, 397-405.
- Katzenstein AL & Myers JL. (1998). Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1301-1315.
- Katzenstein AL, Zisman DA, Litzky LA, Nguyen BT & Kotloff RM. (2002). Usual interstitial pneumonia: histologic study of biopsy and explant specimens. *Am J Surg Pathol* **26**, 1567-1577.
- Keeley EC, Mehrad B & Strieter RM. (2010). Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 535-542.
- Khalil N, Corne S, Whitman C & Yacyshyn H. (1996). Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 252-259.
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D & Chapman HA. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13180-13185.
- King TE, Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Jr., Flint A, Thurlbeck W & Cherniack RM. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1025-1032.
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA & Yanagisawa M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* **230**, 230-242.
- Knorr A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Harter M, Hahn M, Keim Y, Wunder F & Stasch JP. (2008). Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung* **58**, 71-80.
- Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mulsch A, Bohme E, Schultz G & Frank R. (1988). The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* **239**, 29-34.
- Koesling D, Mergia E & Russwurm M. (2016). Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. *Curr Med Chem* **23**, 2653-2665.
- Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y, Kotani Y, Okada T, Nakamura S & Yokoyama M. (2007). Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**, 395-404.
- Kubes P. (1992). Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* **262**, G1138-1142.

- Kuhn C, 3rd, Boldt J, King TE, Jr., Crouch E, Vartio T & McDonald JA. (1989). An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **140**, 1693-1703.
- Kuhn C & McDonald JA. (1991). The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* **138**, 1257-1265.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakari E, Soini Y, Saily M, Koistinen P, Paakko P & Kinnula VL. (2002). Inducible nitric oxide synthase, but not xanthine oxidase, is highly expressed in interstitial pneumonias and granulomatous diseases of human lung. *Am J Clin Pathol* **117**, 132-142.
- Lasky JA & Brody AR. (2000). Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 4**, 751-762.
- Limjunyawong N, Mitzner W & Horton MR. (2014). A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol Rep* **2**, e00249.
- Loesch A & Burnstock G. (1995). Ultrastructural-Localization of Nitric-Oxide Synthase and Endothelin in Coronary and Pulmonary-Arteries of Newborn Rats. *Cell and Tissue Research* **279**, 475-483.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U & De Jonge HR. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**, 307-312.
- Lown JW & Sim SK. (1977). Studies Related to Antitumor Antibiotics .12. Mechanism of Bleomycin-Induced Cleavage of DNA. *Biochem Bioph Res Co* **77**, 1150-1157.
- Lu YF, Kandel ER & Hawkins RD. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* **19**, 10250-10261.
- Luppi F, Spagnolo P, Cerri S & Richeldi L. (2012). The big clinical trials in idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* **18**, 428-432.
- Mason RJ, Schwarz MI, Hunninghake GW & Musson RA. (1999). NHLBI Workshop Summary. Pharmacological therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. Past, present, and future. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1771-1777.
- Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch JP & Kitamura K. (2009). Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res* **32**, 597-603.
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL & Kadowitz PJ. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* **57**, 946-955.
- Mergia E, Russwurm M, Zoidl G & Koesling D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell Signal* **15**, 189-195.
- Mihout F, Shweke N, Bige N, Jouanneau C, Dussaule JC, Ronco P, Chatziantoniou C & Boffa JJ. (2011). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces chronic kidney disease through a mechanism involving collagen and TGF-beta1 synthesis. *J Pathol* **223**, 37-45.
- Misumi S & Lynch DA. (2006). Idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia: imaging diagnosis, spectrum of abnormalities, and temporal progression. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 307-314.
- Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C, Bischoff E, Feurer A, Gerisch M, Kern A, Knorr A, Lang D, Muentner K, Radtke M, Schirok H, Schlemmer KH, Stahl E, Straub A, Wunder F & Stasch JP.

- (2009). Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem* **4**, 853-865.
- Moeller A, Ask K, Warburton D, Gaudie J & Kolb M. (2008). The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 362-382.
- Montorfano I, Becerra A, Cerro R, Echeverria C, Saez E, Morales MG, Fernandez R, Cabello-Verrugio C & Simon F. (2014). Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2-dependent pathway. *Lab Invest* **94**, 1068-1082.
- Moore BB & Hogaboam CM. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol-Lung C* **294**, L152-L160.
- Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC & Huang PL. (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* **101**, 1225-1232.
- Mouratis MA & Aidinis V. (2011). Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med* **17**, 355-361.
- Mullis KB & Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S & Kimura H. (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 145-158.
- Murfee WL, Skalak TC & Peirce SM. (2005). Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation* **12**, 151-160.
- Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K & Murad F. (1988). Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 1139-1147.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U & Murad F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* **316**, 175-180.
- Nathan CF & Hibbs JB, Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65-70.
- Nicholson AG, Fulford LG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM & Wells AU. (2002). The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care* **166**, 173-177.
- Noguchi S, Yatera K, Wang KY, Oda K, Akata K, Yamasaki K, Kawanami T, Ishimoto H, Toyohira Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M & Mukae H. (2014). Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res* **15**, 92.
- Oh K, Park HB, Byoun OJ, Shin DM, Jeong EM, Kim YW, Kim YS, Melino G, Kim IG & Lee DS. (2011). Epithelial transglutaminase 2 is needed for T cell interleukin-17 production and subsequent pulmonary inflammation and fibrosis in bleomycin-treated mice. *J Exp Med* **208**, 1707-1719.
- Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC, Norris JM, Wilson CG & Brown KK. (2007). Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 277-284.
- Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

- Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H & Sawai T. (2001). Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J* **17**, 1220-1227.
- Pardo A & Selman M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 383-388.
- Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, Burns L, Renteria L, Woods J, Chen L, Allard J, Ravindran P, Bitter H, Liang Z, Hogaboam CM, Kitson C, Budd DC, Fine JS, Bauer CM & Stevenson CS. (2013). Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease. *PLoS One* **8**, e59348.
- Postlethwaite AE, Shigemitsu H & Kanangat S. (2004). Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 733-738.
- Raghu G, Chen SY, Hou Q, Yeh WS & Collard HR. (2016). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18-64 years old. *European Respiratory Journal* **48**, 179-186.
- Raghu G, Chen SY, Yeh WS, Maroni B, Li Q, Lee YC & Collard HR. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir Med* **2**, 566-572.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ & Fibrosis AEJACoIP. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 788-824.
- Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraraghavan S, Bishop AE, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM & Du Bois RM. (2003). Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 438-443.
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B & Folkerts G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* **84**, 731-765.
- Richeldi L. (2014). Treatments for idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **371**, 783.
- Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR & Investigators IT. (2014). Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2071-2082.
- Roberts AB. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* **24**, 111-119.
- Roberts AB, Russo A, Felici A & Flanders KC. (2003). Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 1-10.
- Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW & Hogan BL. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1475-1483.
- Rosas IO, Dellaripa PF, Lederer DJ, Khanna D, Young LR & Martinez FJ. (2014). Interstitial lung disease: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. *Ann Am Thorac Soc* **11 Suppl 3**, S169-177.
- Rosenbloom J, Castro SV & Jimenez SA. (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* **152**, 159-166.

- Rouget C. (1873). Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries senguins et lymphatiques. *Arch Physiol Norm Pathol* **5**, 603-663.
- Rowley JE & Johnson JR. (2014). Pericytes in chronic lung disease. *Int Arch Allergy Immunol* **164**, 178-188.
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS & Sessa WC. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* **101**, 731-736.
- Russwurm M & Koesling D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* **23**, 4443-4450.
- Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F & Koesling D. (2002). Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. *J Biol Chem* **277**, 24883-24888.
- Russwurm M, Wittau N & Koesling D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* **276**, 44647-44652.
- Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE & Beavo JA. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* **93**, 280-291.
- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH, Jr. & Erlich HA. (1988a). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* **319**, 537-541.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA. (1988b). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saleh D, Barnes PJ & Giaid A. (1997). Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1763-1769.
- Sanders KM, Ward SM, Thornbury KD, Dalziel HH, Westfall DP & Carl A. (1992). Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Jpn J Pharmacol* **58 Suppl 2**, 220P-225P.
- Sandner P & Stasch JP. (2017). Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence. *Respir Med* **122 Suppl 1**, S1-S9.
- Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB & Ooshima A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* **112**, 1486-1494.
- Schmidt HHHW & Walter U. (1994). No at Work. *Cell* **78**, 919-925.
- Schmidt PM, Rothkegel C, Wunder F, Schroder H & Stasch JP. (2005). Residues stabilizing the heme moiety of the nitric oxide sensor soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* **513**, 67-74.
- Schmidt PM, Schramm M, Schroder H, Wunder F & Stasch JP. (2004). Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* **279**, 3025-3032.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D & Mayer B. (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **50**, 1-5.
- Schultz K, Schultz K & Schultz G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* **265**, 750-751.

- Schunke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M & Wesker K. (2012). *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: Innere Organe* Thieme.
- Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic S, European Respiratory S & American College of Chest P. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* **134**, 136-151.
- Shepro D & Morel NM. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J* **7**, 1031-1038.
- Sime PJ, Sarnstrand B, Xing Z, Graham F, Fisher L & Gauldie J. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of the proteoglycan biglycan induces fibroblastic responses in the lung. *Chest* **111**, 137S.
- Sims DE. (1986). The Pericyte - a Review. *Tissue & Cell* **18**, 153-174.
- Sims DE & Westfall JA. (1983a). Analysis of Relationships between Pericytes and Gas-Exchange Capillaries in Neonatal and Mature Bovine Lungs. *Microvascular Research* **25**, 333-342.
- Sims DE & Westfall JA. (1983b). Pericytes and Endothelial Cell-Junctions of Bovine Gas-Exchange Capillaries Are Concentrated Where the Blood-Air Barrier Is Thickest. *Microvascular Research* **25**, 257-257.
- Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER & Hawkins RD. (1998). The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learn Mem* **5**, 231-245.
- Sontake V, Shanmukhappa SK, DiPasquale BA, Reddy GB, Medvedovic M, Hardie WD, White ES & Madala SK. (2015). Fibrocytes Regulate Wilms Tumor 1-Positive Cell Accumulation in Severe Fibrotic Lung Disease. *J Immunol* **195**, 3978-3991.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A & Schramm M. (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**, 212-215.
- Stasch JP, Pacher P & Evgenov OV. (2011). Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation* **123**, 2263-2273.
- Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroder H, Stahl E, Steinke W & Wunder F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* **136**, 773-783.
- Stegemann H & Stalder K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* **18**, 267-273.
- Stone JR & Marletta MA. (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **33**, 5636-5640.
- Strieter RM, Keeley EC, Hughes MA, Burdick MD & Mehrad B. (2009). The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* **86**, 1111-1118.
- Strieter RM & Mehrad B. (2009). New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest* **136**, 1364-1370.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF & Nathan CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7773-7777.
- Sugiura H & Ichinose M. (2011). Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide* **25**, 138-144.

- Sun KH, Chang Y, Reed NI & Sheppard D. (2016). alpha-Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGFbeta activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **310**, L824-836.
- Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, 3rd & Martinez FJ. (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* **55**, 395-417.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C & Brown RA. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349-363.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Trawinska MA, Rupesinghe RD & Hart SP. (2016). Patient considerations and drug selection in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Clin Risk Manag* **12**, 563-574.
- Treuting PM, Dintzis SM, Frevert CW, Liggitt D & Montine KS. (2012). *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas*. Elsevier.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA & Warman ML. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29**, 52, 54.
- Turner-Warwick M. (1963). Precapillary Systemic-Pulmonary Anastomoses. *Thorax* **18**, 225-237.
- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T & Okami Y. (1966). New Antibiotics Bleomycin a and B. *J Antibiot* **19**, 200-&.
- Vancheri C & du Bois RM. (2013). A progression-free end-point for idiopathic pulmonary fibrosis trials: lessons from cancer. *European Respiratory Journal* **41**, 262-269.
- Waldman SA, Rapoport RM & Murad F. (1984). Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* **259**, 14332-14334.
- Walter U & Gambaryan S. (2004). Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood* **104**, 2609-2609.
- Walters DM & Kleeberger SR. (2008). Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Curr Protoc Pharmacol* **Chapter 5**, Unit 5 46.
- Wang Q, Mergia E, Koesling D & Mittmann T. (2017). Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience* **360**, 180-189.
- Wang Y, Kramer S, Loof T, Martini S, Kron S, Kawachi H, Shimizu F, Neumayer HH & Peters H. (2006). Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation vs. phosphodiesterase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F167-176.
- Weibel ER. (1974). On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc Res* **8**, 218-235.
- Wells RG & Schwabe RF. (2015). Origin and function of myofibroblasts in the liver. *Semin Liver Dis* **35**, e1.
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM & Borok Z. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **166**, 1321-1332.

- Winqvist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F & Rapoport RM. (1984). Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7661-7664.
- Woessner JF, Jr. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**, 440-447.
- Wolters PJ, Collard HR & Jones KD. (2014). Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Pathol* **9**, 157-179.
- Wynn TA. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* **117**, 524-529.
- Wynn TA. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199-210.
- Wynn TA. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* **208**, 1339-1350.
- Yamashita T, Yamamoto E, Kataoka K, Nakamura T, Matsuba S, Tokutomi Y, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H & Kim-Mitsuyama S. (2007). Apoptosis signal-regulating kinase-1 is involved in vascular endothelial and cardiac remodeling caused by nitric oxide deficiency. *Hypertension* **50**, 519-524.
- Zhang H, Palmer R, Gao X, Kreidberg J, Gerald W, Hsiao L, Jensen RV, Gullans SR & Haber DA. (2003). Transcriptional activation of placental growth factor by the forkhead/winged helix transcription factor FoxD1. *Curr Biol* **13**, 1625-1629.
- Zhang K & Phan SH. (1996). Cytokines and pulmonary fibrosis. *Biol Signals* **5**, 232-239.
- Zhang K, Rekhter MD, Gordon D & Phan SH. (1994). Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **145**, 114-125.
- Zhang XY, Liu H, Hock T, Thannickal VJ & Sanders YY. (2013). Histone Deacetylase Inhibition Downregulates Collagen 3A1 in Fibrotic Lung Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 19605-19617.

9. Eigene Publikationen

Publikationen

- Aue A**, Schwiering F, König P, Adams R, Schmidtko A, Friebe A Groneberg D (2018).
Differentiation of interstitial from alveolar myofibroblasts in pulmonary fibrosis.
[eingereicht]
- Dünnes S, Voussen B, **Aue A**, Groneberg K, Nikolaev V, Groneberg D, Friebe A. (2018).
Phosphodiesterase 3A expression and activity in the murine vasculature is influenced
by NO-sensitive guanylyl cyclase. Pflug Arch Eur J Phy 470, 693-702
- Schrama D, Hesbacher S, Angermeyer S, Schlosser A, Haferkamp S, **Aue A**, Adam C,
Weber A, Schmidt M, Houben R (2016).
Serine 220 phosphorylation of the Merkel cell polyomavirus large T antigen crucially
supports growth of Merkel cell carcinoma cells. Int J Cancer 138, 1153-1162
- Houben R, Angermeyer S, Haferkamp S, **Aue A**, Goebeler M, Schrama D, Hesbacher S
(2015).
Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T
antigen. Int J Cancer 136, E290-300

Konferenzbeiträge

- Annemarie Aue**, Dieter Groneberg, Fabian Schwiering, Nils Englert and Andreas Friebe
NO-GC in pericytes as modulator of lung fibrosis
Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research, 08.-10.10.2018, Tübingen
- Fabian Schwiering, **Annemarie Aue**, Dieter Groneberg, Andreas Friebe
NO-sensitive guanylyl cyclase expression is increased in CCl4-induced liver fibrosis
Hot Topics in Signal Transduction & cGMP Research, 08.-10.10.2018, Tübingen
- Annemarie Aue**, Dieter Groneberg, Fabian Schwiering and Andreas Friebe
NO-GC in pericytes as modulator of lung fibrosis
8th International Conference on cGMP, 23.-25.06.2017, Bamberg
- Annemarie Aue**, Katharina Beck, Dieter Groneberg, Fabian Schwiering, Barbara Voussen,
Andreas Friebe
NO/cGMP signalling in cells 'off the beaten track'
8th International Conference on cGMP, 23.-25.06.2017, Bamberg
- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Fabian Schwiering, Andreas Friebe
Localization of the NO-sensitive guanylyl cyclase in mouse lung
8th International Conference on cGMP 23.-25.06.2017, Bamberg
- Fabian Schwiering, **Annemarie Aue**, Dieter Groneberg, Andreas Friebe
Pericytes isolated from mouse lung express NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC)
and differentiate into myofibroblasts upon stimulation with TGF- β
8th Internationale Conference on cGMP 23.-25.06.2017, Bamberg

- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Fabian Schwiering, Andreas Friebe
Role of cGMP signalling in pericytes during lung fibrosis
Second Funding Kick-off Meeting FOR 2060, 14 – 15.10.2016 Johannisberg
- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Barbara Voussen-Lies, Andreas Friebe
Comparing phosphodiesterase-dependent cardiovascular and gastrointestinal smooth muscle relaxation
2nd Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting, 25-28.08.2016, San Francisco, USA
- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Barbara Lies, Andreas Friebe
Cell-specific modulation of gastrointestinal NO-induced relaxation by phosphodiesterases
First International Joint Meeting ISAN-AAS-EFAS-JSNR, 26-29.09.2015, Stresa, Italien
- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Barbara Lies, Andreas Friebe
Cell-specific modulation of gastrointestinal NO-induced relaxation by phosphodiesterases
7th Internationale Conference on cGMP 19.-21.06.2015, Trier
- Dieter Groneberg, **Annemarie Aue**, Barbara Lies, Andreas Friebe
Modulation of NO-induced relaxation by phosphodiesterases in fundus and lower esophagus spincter”
New Developments in Signal Transduction & cGMP Research FOR 2060 Meeting, 18-20.01.2015, Rottenburg

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit durchzuführen. Durch konstruktive Diskussionen, seine hilfreichen Ratschläge und sein umfassendes Wissen hat er mir die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt. Ganz besonders wichtig für das Gelingen dieser Arbeit war dabei eine stets positive Atmosphäre, sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und Unterstützung bei Problemen.

Herr Prof. Dr. Benavente möchte ich danken für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie seine Zeit und Ratschläge bei den regelmäßigen Besprechungen.

Mein ganz spezieller Dank richtet sich an Herrn Dr. Dieter Groneberg, der mir in den vergangenen drei Jahren eine außerordentliche Stütze war. Er stand mir stets hilfsbereit zur Seite. Durch seine unermüdliche Geduld und Begeisterung bei fachlichen Diskussionen war er maßgeblich daran beteiligt diese Dissertation erfolgreiche abzuschließen. Insbesondere seine fröhliche Art, seine motivierenden Worte und seine positive Einstellung haben mir die Arbeit nicht nur erleichtert, sondern zu einer Freude werden lassen. Für all die Erfahrungen und wertvollen Tipps während unserer Zusammenarbeit bin ich sehr dankbar.

Ein weiterer Dank geht an meine wundervollen Arbeitskollegen, die mich während der vergangenen drei Jahre begleitet und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. An Dr. Barbara Voußen, Sarah Dünnes und Katharina Beck für die aufmunternden Worte und Hilfsbereitschaft. An Fabian Schwiering für den wissenschaftlichen Austausch und seine Hilfe bei labor- und computertechnischen Problemen. An Linda Kehrer für die Unterstützung bei Versuchen und das allzeit offene An Amelie Reigl für die allzeit gute Laune. Bedanken möchte ich mich auch bei den restlichen Mitarbeitern des Institutes, mit denen ich eine intensive, lehrreiche aber auch lustige Zeit verbringen durfte. Hervorzuheben sind Kai Schuh, Melanie Ullrich und Simone Pickel. Marco Abeßer möchte ich danke, dass er immer für mich da war, wenn ich seine Hilfe brauchte. Sein Humor war von unschätzbarem Wert für mich.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Nirina Sivakumar, Sabine Tauscher und Nadine Mauro. Ihr habt unsere gemeinsame Zeit an der Arbeit zu etwas Einzigartigem gemacht. Ich werde diese wunderbaren Stunden nie vergessen. Ein besonders großer Dank geht an Bianca Röger, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke für die fachliche aber vor allem mentale Unterstützung, die wertvollen Ratschläge und aufheiternden Gespräche. Danke an die beste Labor-Mama der Welt. Es war mir eine Freude ein Stück meines beruflichen Weges zusammen mit dir zu gehen. Ich bin mir sicher, dass wir uns nie mehr aus den Augen verlieren.

Zuletzt gilt mein Dank meiner wundervollen Familie. Meinen Eltern, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und mir mit unendlicher Geduld zur Seite gestanden haben. Meinen Großeltern für ihr Vertrauen und ihre Liebe.

Insbesondere danke ich meinem Freund Nils für seine fröhliche Art, seine Unterstützung und sein Verständnis in schwierigen Situationen. Danke für die wundervolle Zeit, den gemeinsamen Spaß und die Freude an Kleinigkeiten. All das hat mir den Laboralltag unglaublich bunt gemacht.