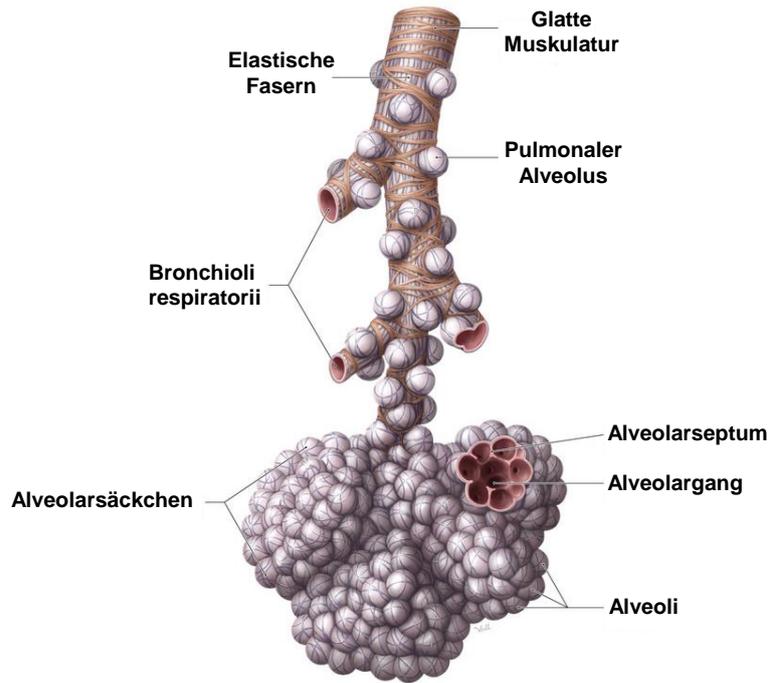


Abbildung 1: Die NO/cGMP-Signalkaskade

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.

A



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

B

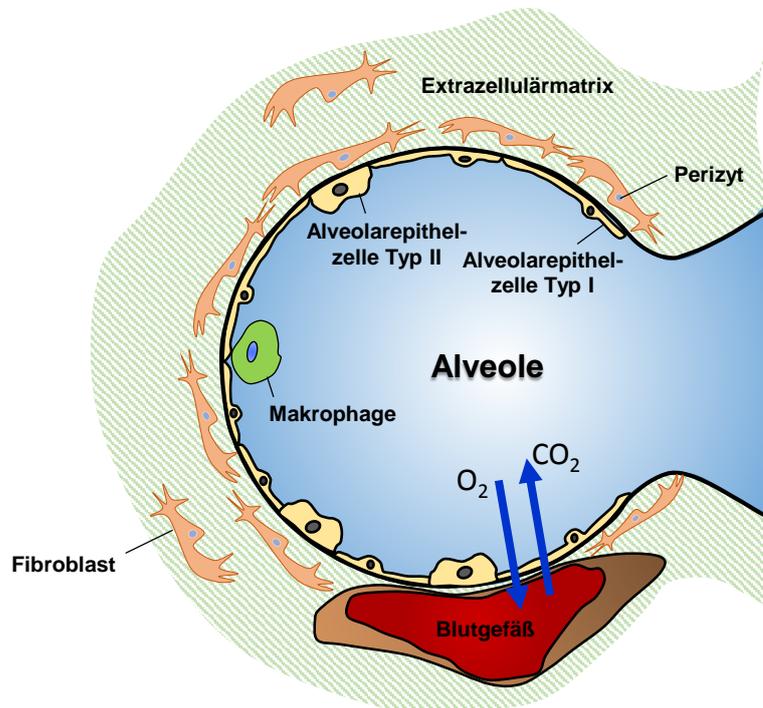


Abbildung 2: Anatomie und Histologie des Respirationstrakts

(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.

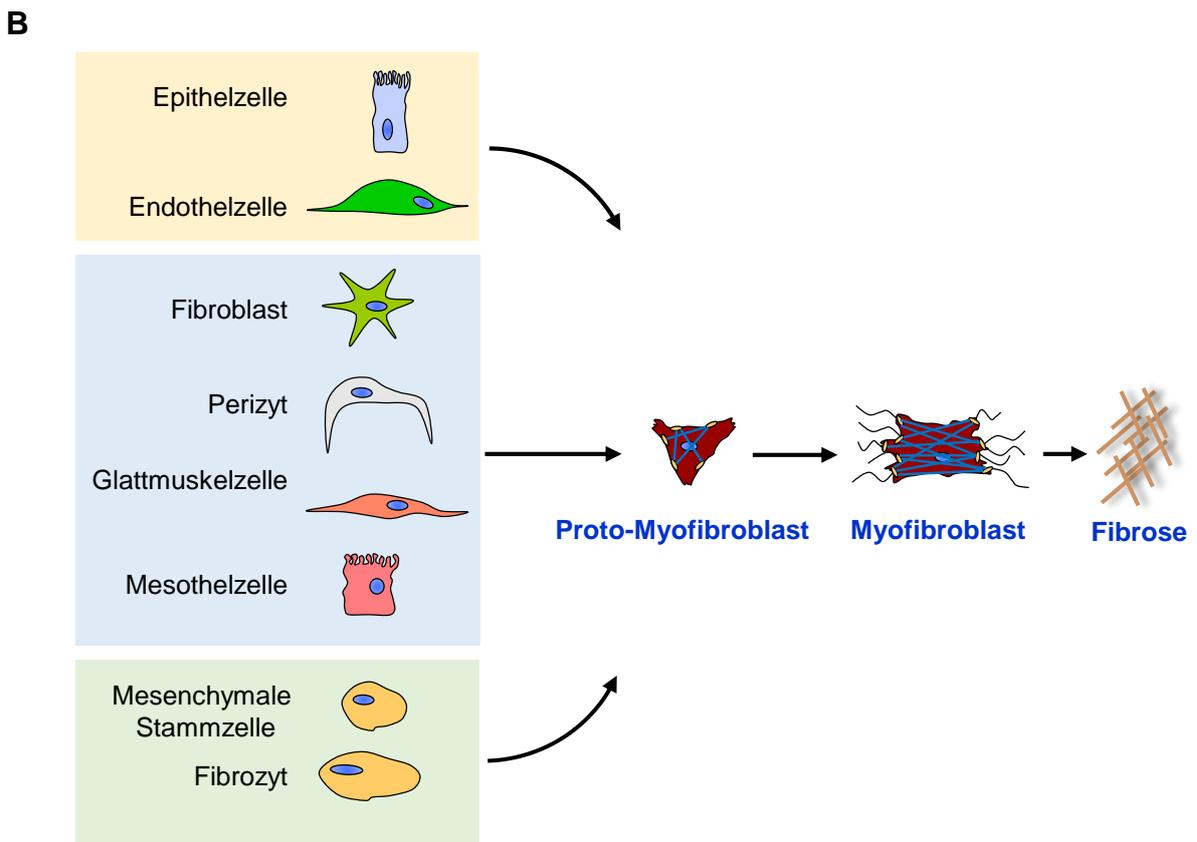
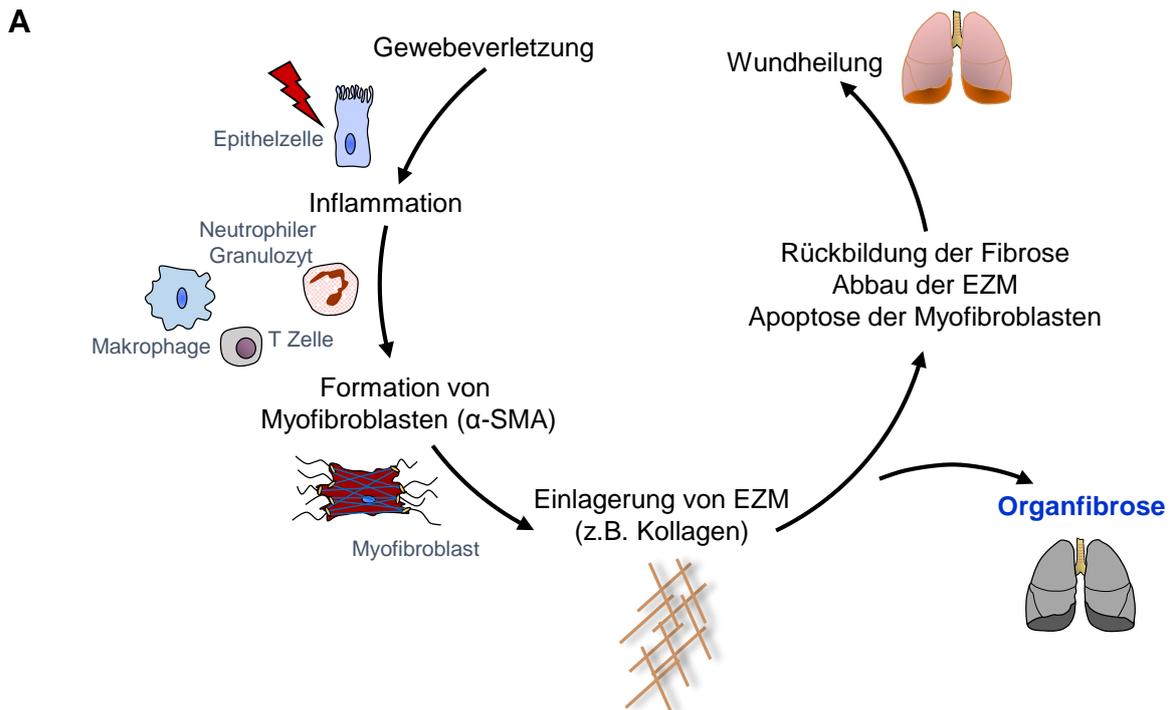


Abbildung 3: Pathogenese und Pathologie der Lungenfibrose

(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.

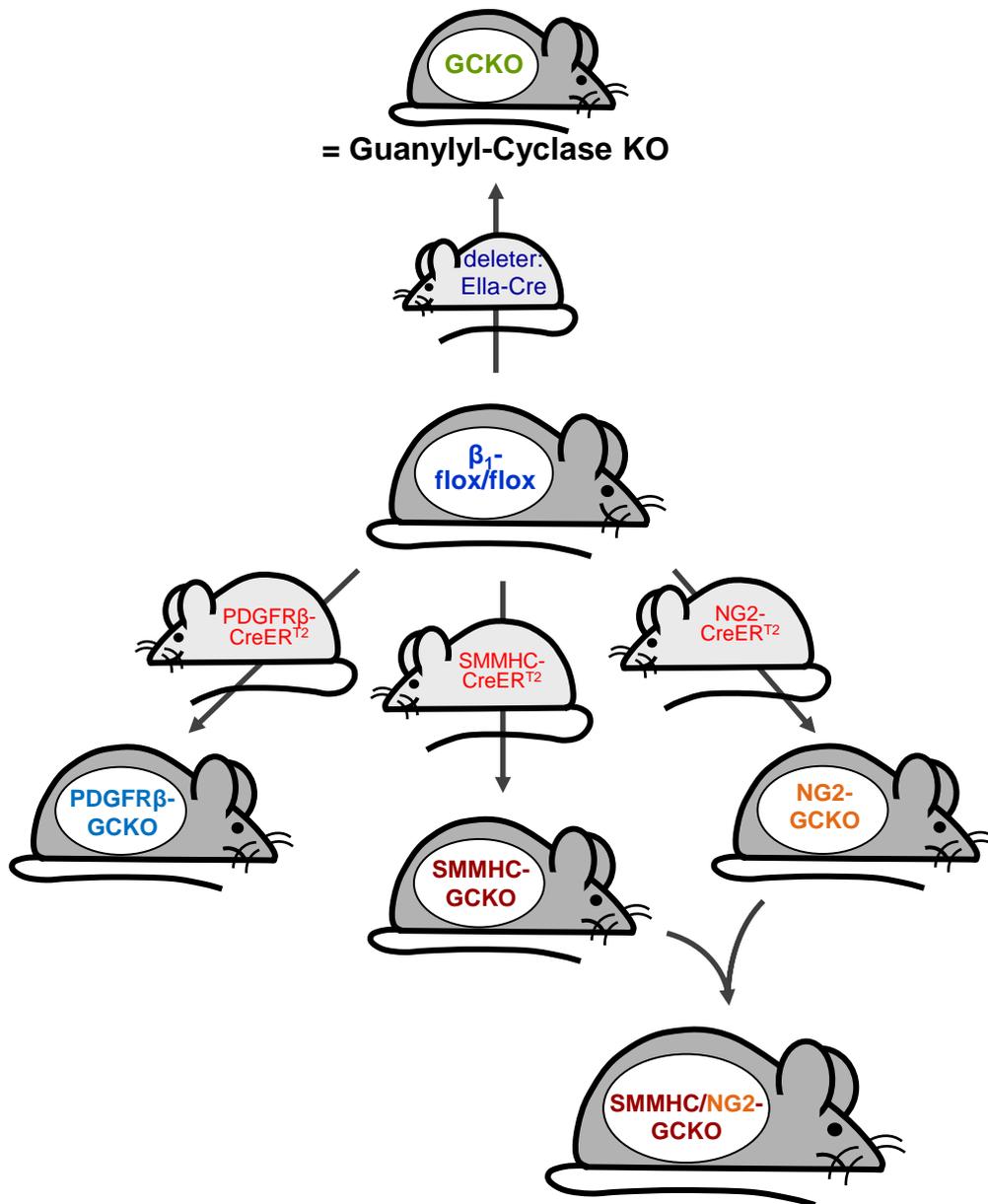
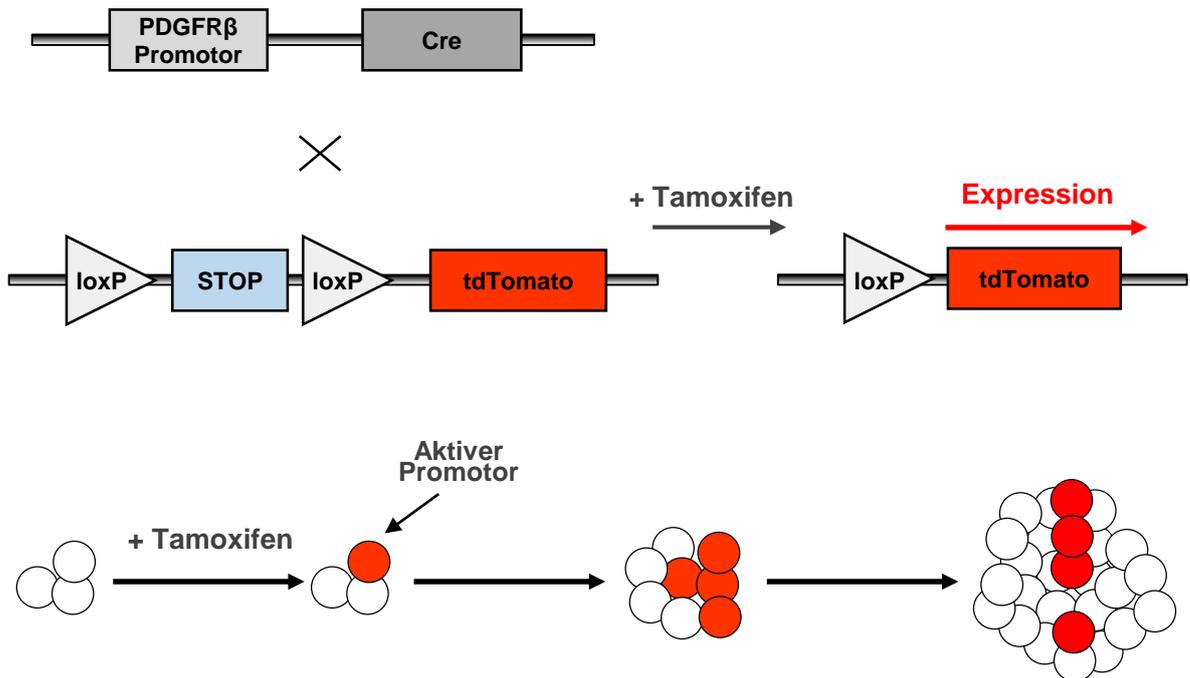


Abbildung 4: Generierung der globalen und Perizyten-spezifischen Knockout-Mäuse

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.

A



B

Reporter-Linie	Cre-Linie	Spezifität
tdTomato	PDGFRβ-CreER ^{T2}	Perizyten/ Glattmuskelzellen
tdTomato	SMMHC-CreER ^{T2}	Perizyten/ Glattmuskelzellen
tdTomato	NG2-CreER ^{T2}	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 (CreER^{T2}) 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).

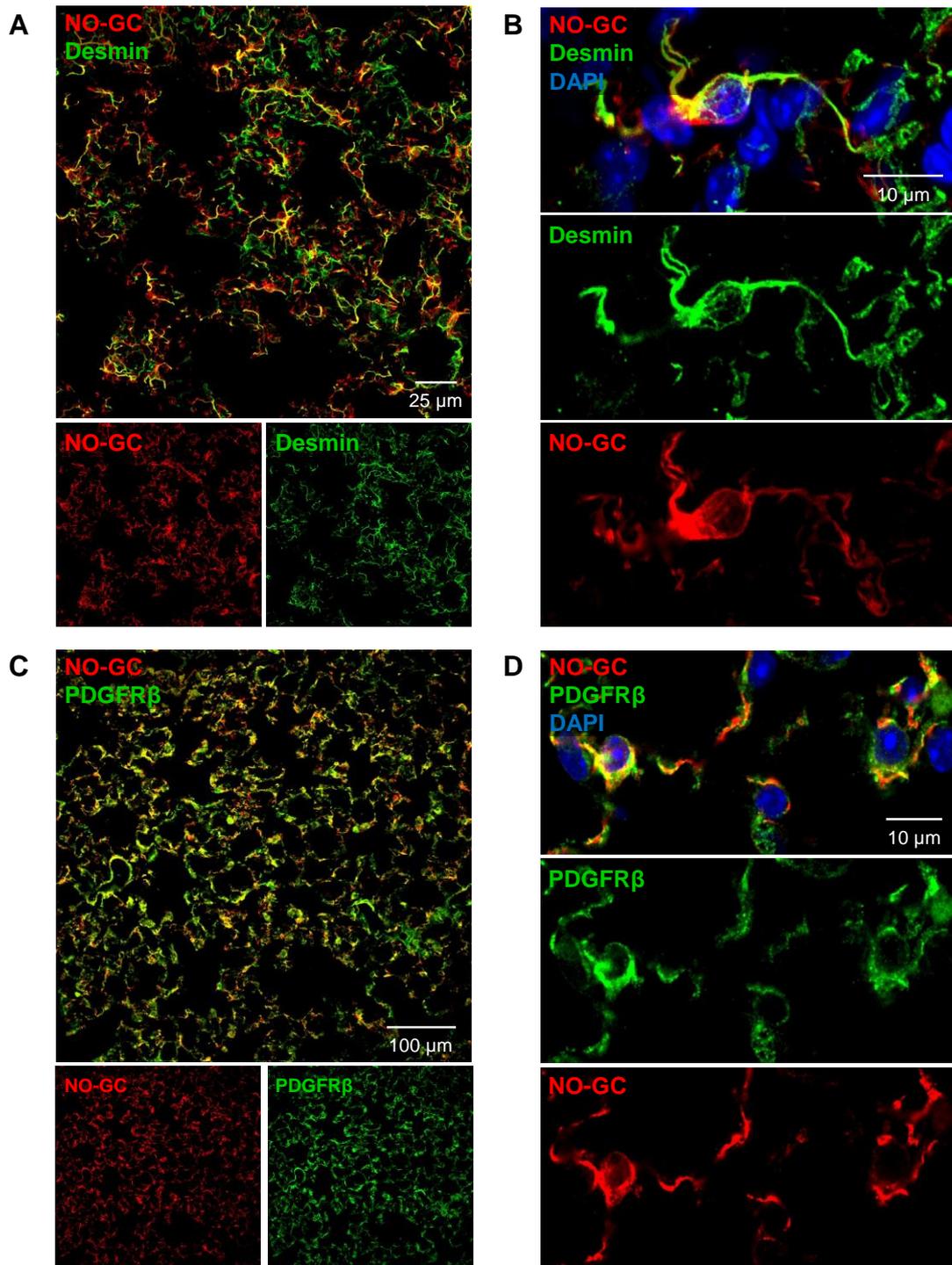
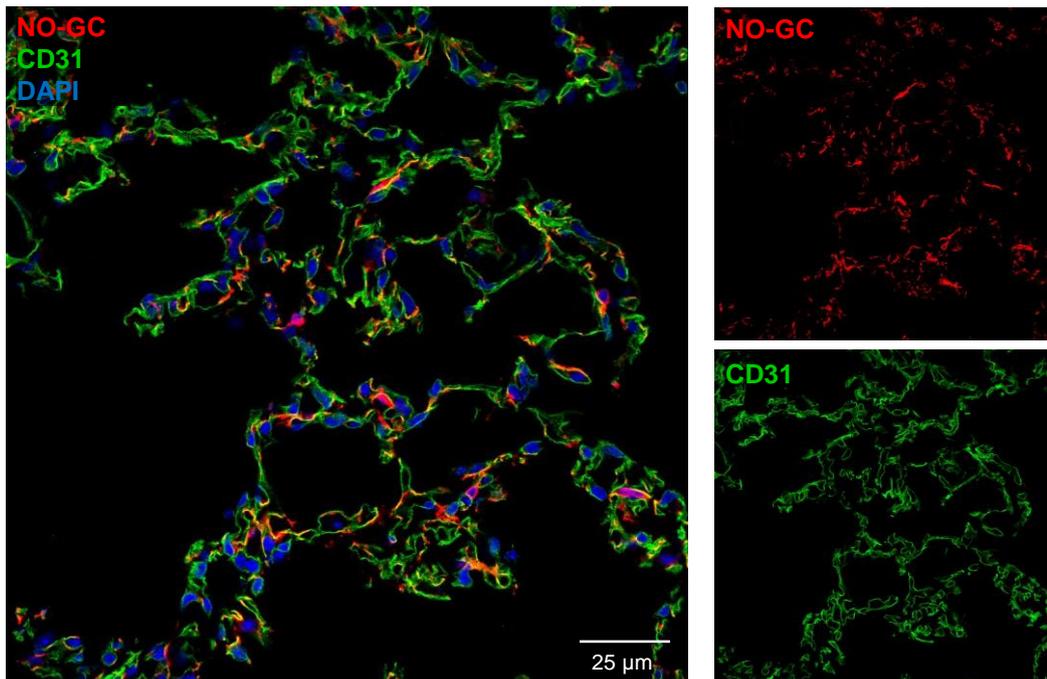


Abbildung 6: Expression der NO-GC in der murinen Lunge

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

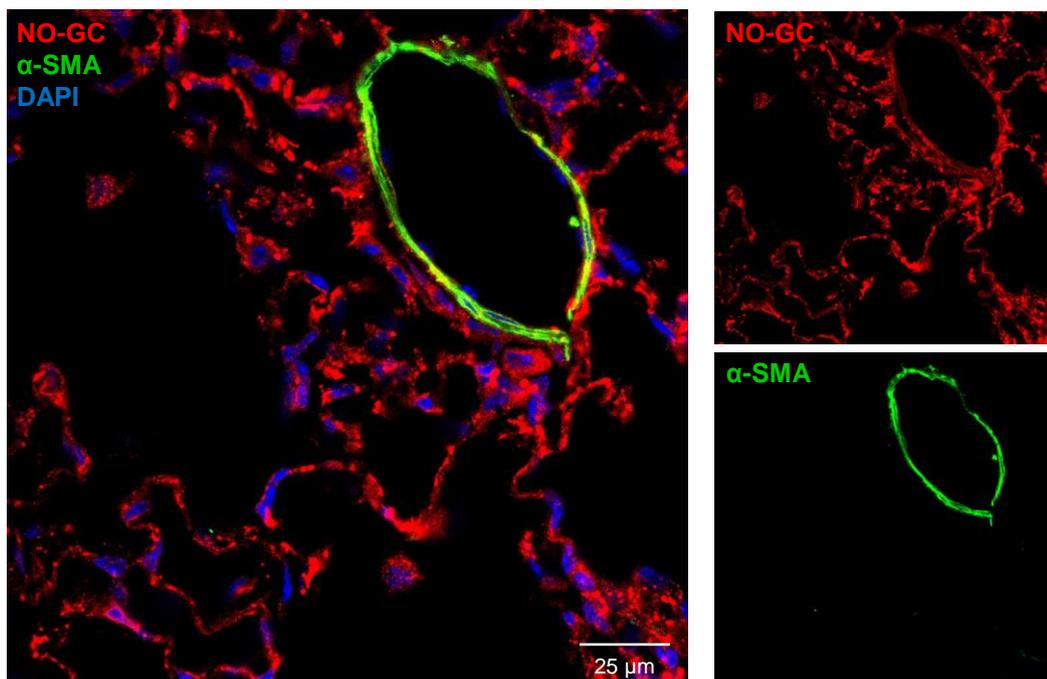
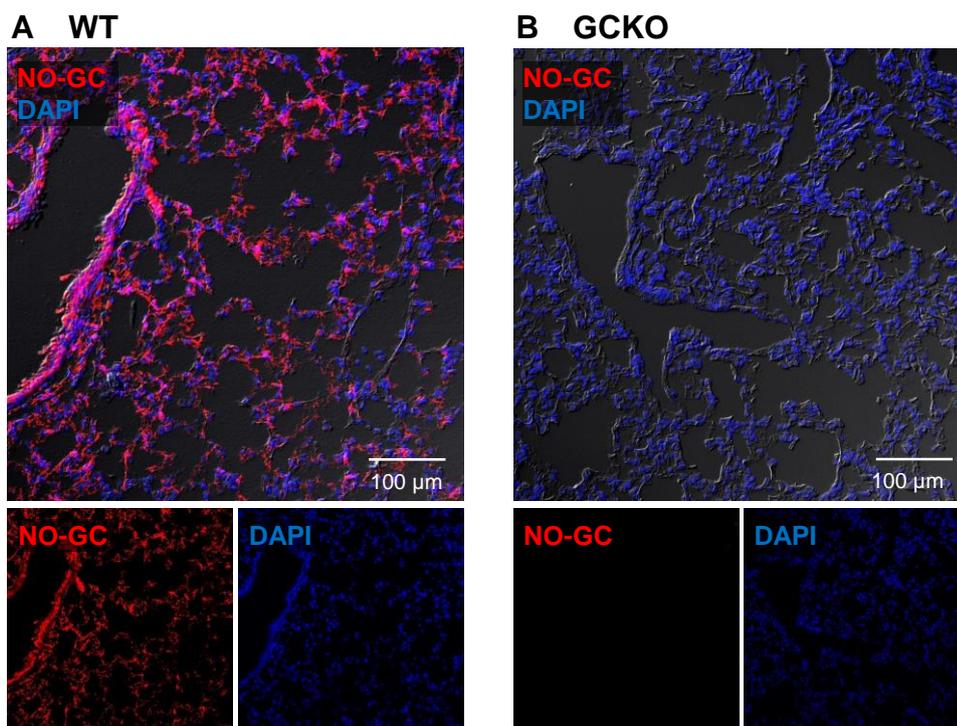


Abbildung 7: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der Lunge

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).



C

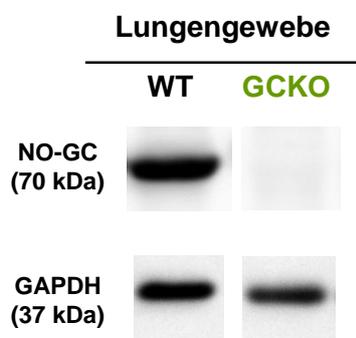


Abbildung 8: Deletion der NO-GC in murinem Lungengewebe

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).

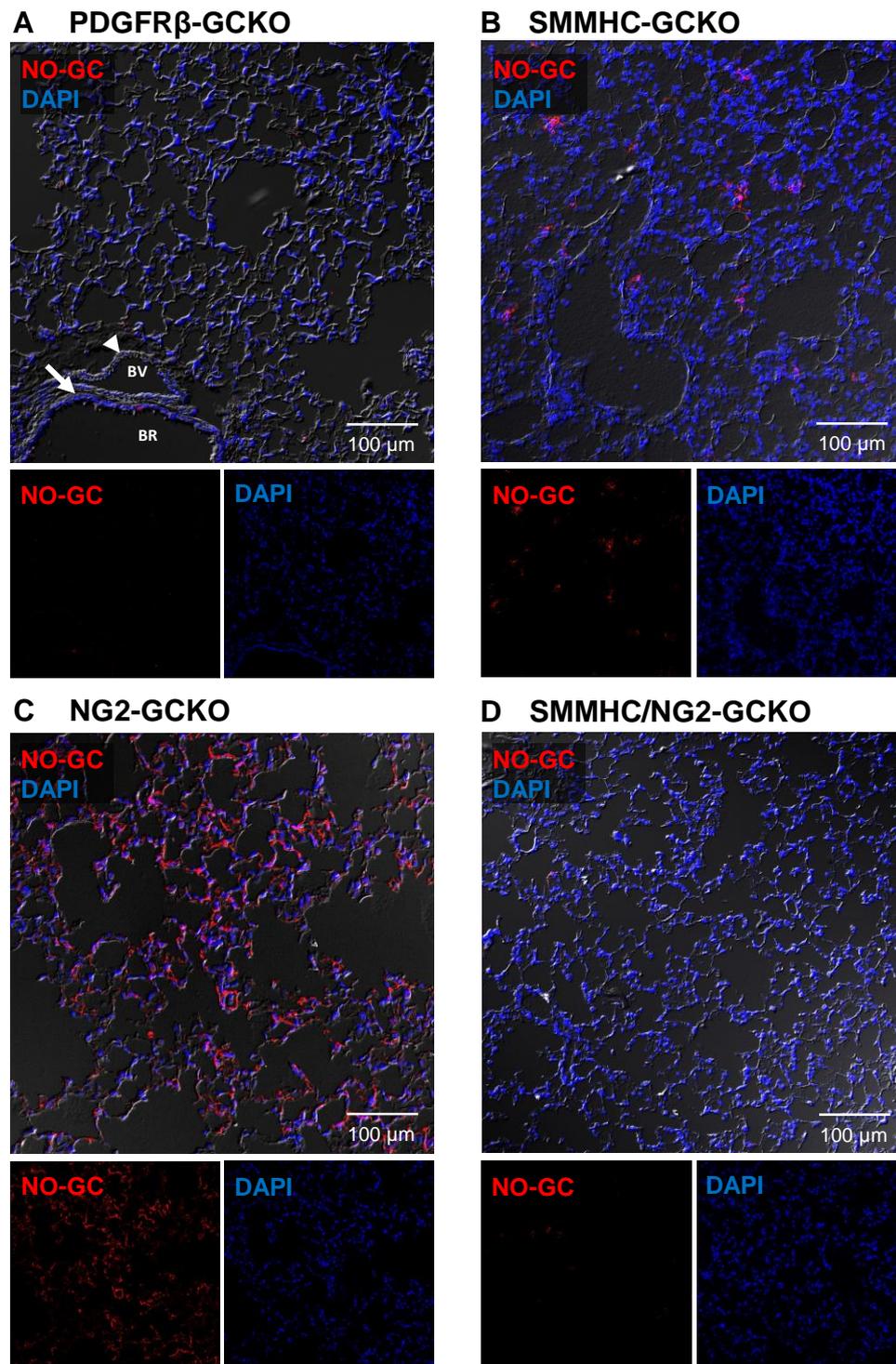


Abbildung 9: Promotor-spezifische Deletion der NO-GC in murinen Lungenperizyten

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.

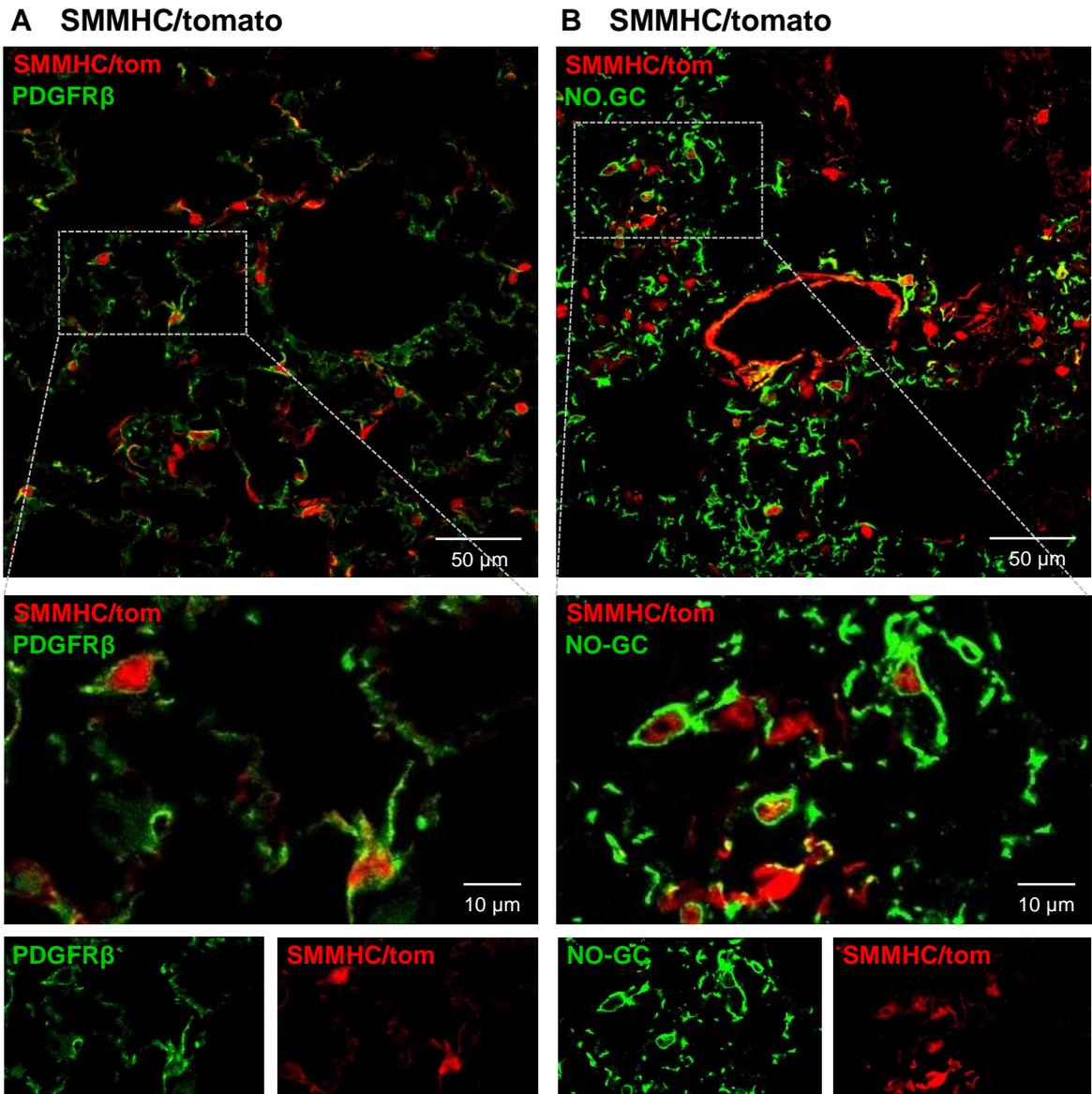
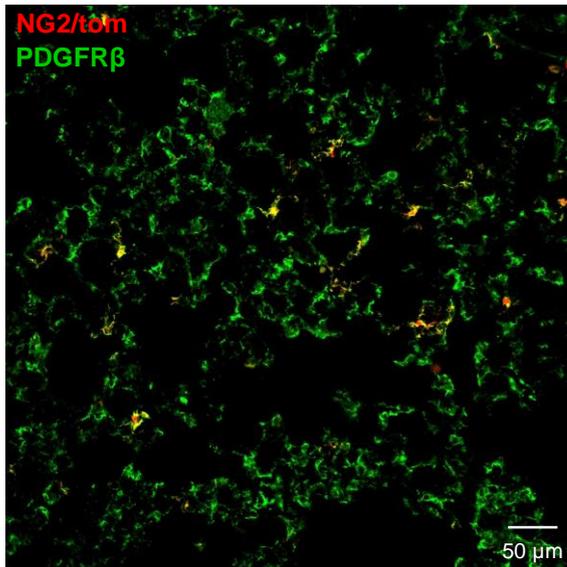


Abbildung 11: Lineage Tracing von SMMHC-positiven Zellen in der gesunden Lunge

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

A NG2/tomato



B NG2/tomato

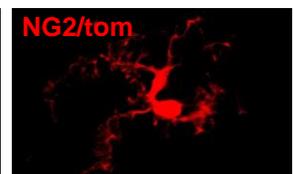
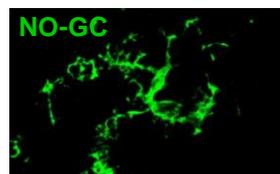
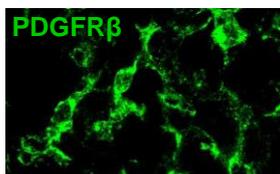
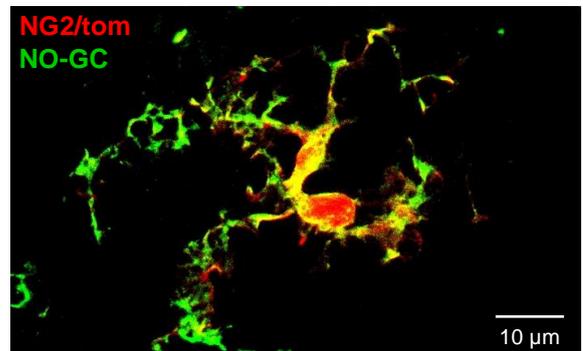
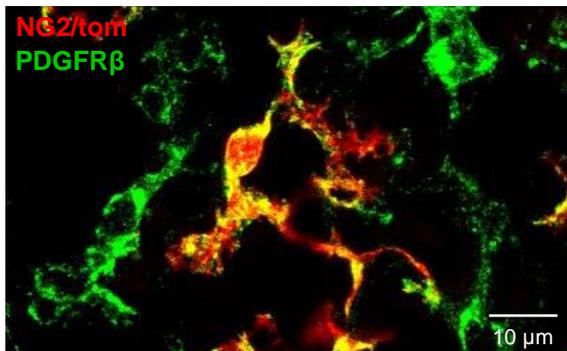
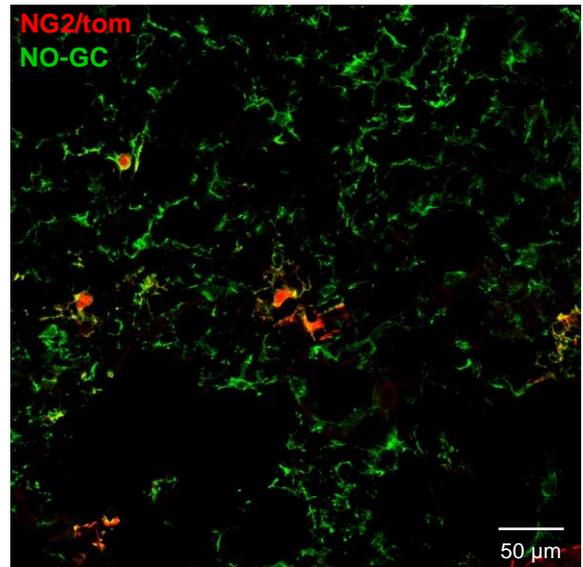
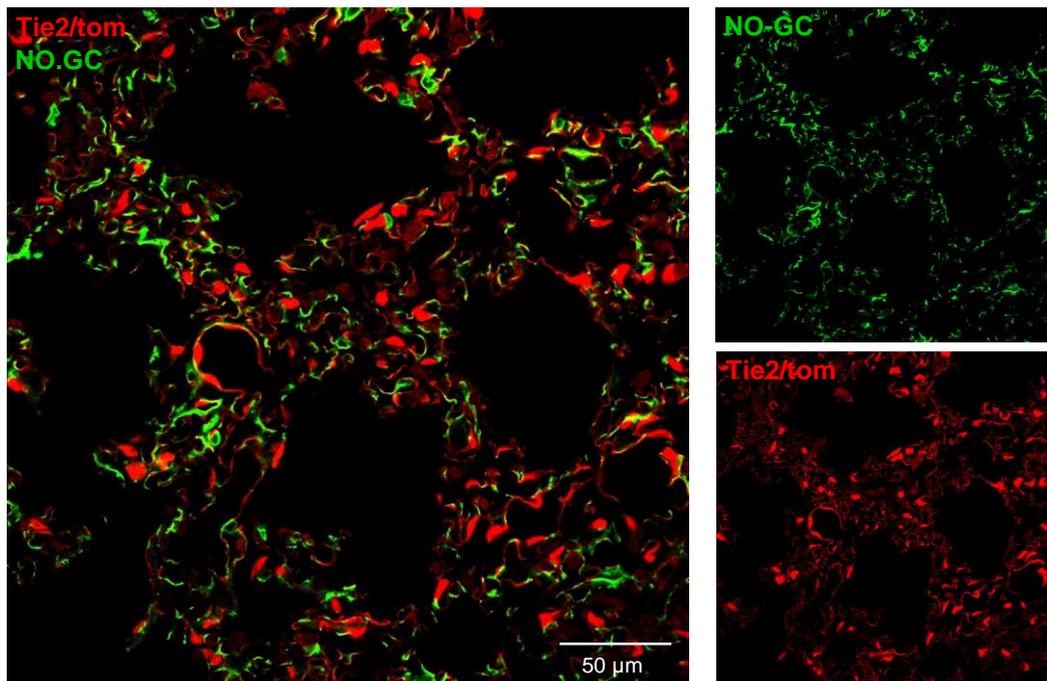


Abbildung 12: Lineage Tracing von NG2-positiven Zellen in der gesunden Lunge

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).

A Tie2/tomato



B Foxd1/tomato

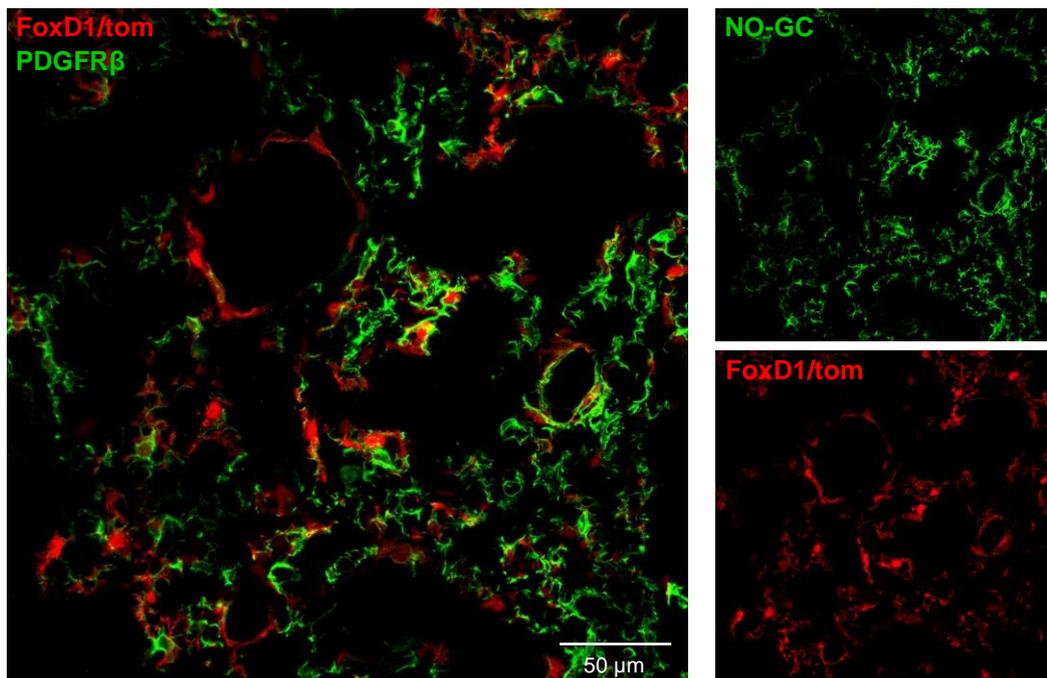


Abbildung 13: Lineage Tracing von Tie2- und Foxd1-positiven Zellen in der gesunden Lunge
Lungenschnitte von Tie2/tomato-Reporterermäusen (A) und FoxD1/tomato-Reporterermäusen (B) wurden mit dem spezifischen Antikörper gegen die NO-GC gefärbt. Eine starke Expression von tdTomato (PDGFRβ/tom; rot) ist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

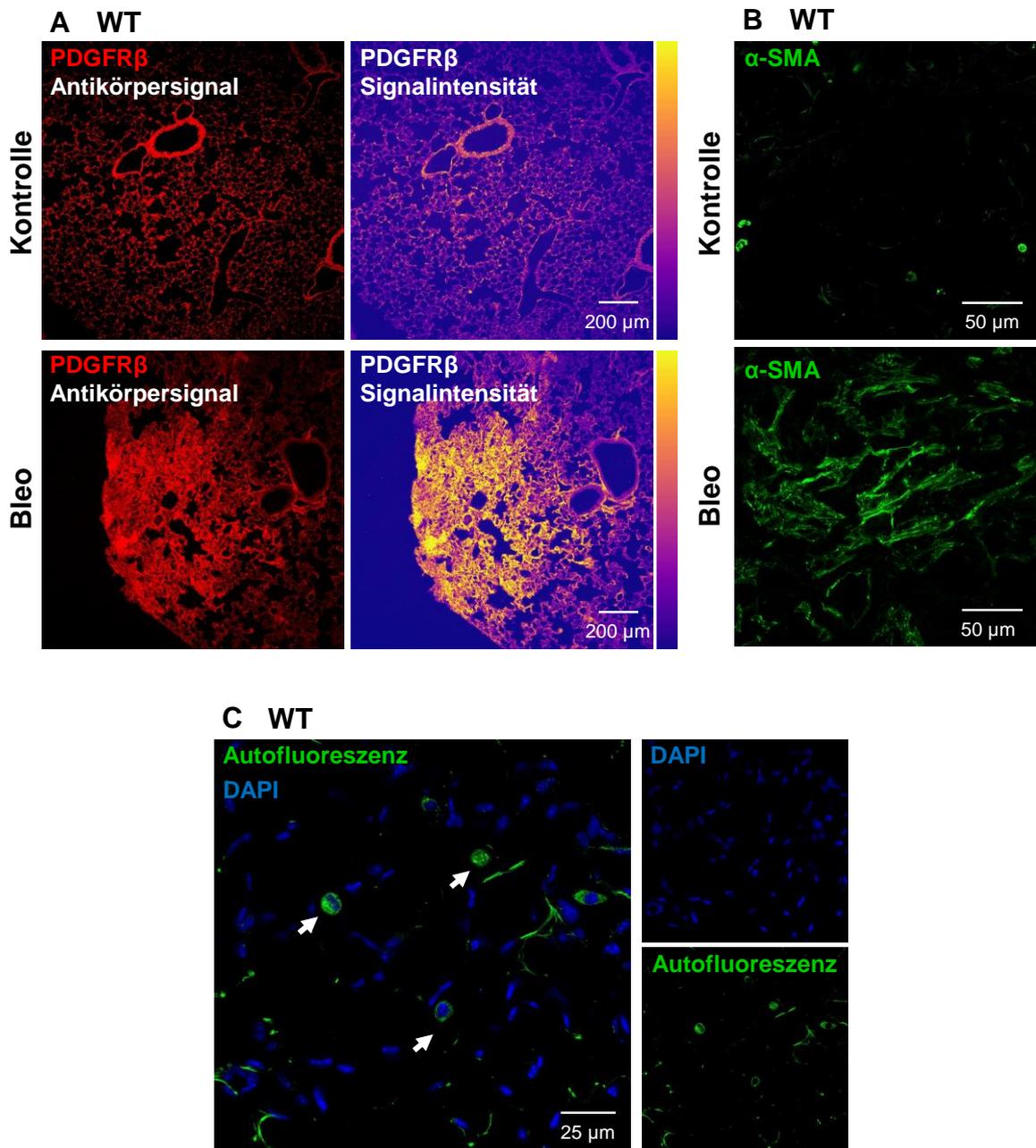


Abbildung 14: Bleomycin-induzierte Lungenfibrose der Maus

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 PDGFRβ (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).

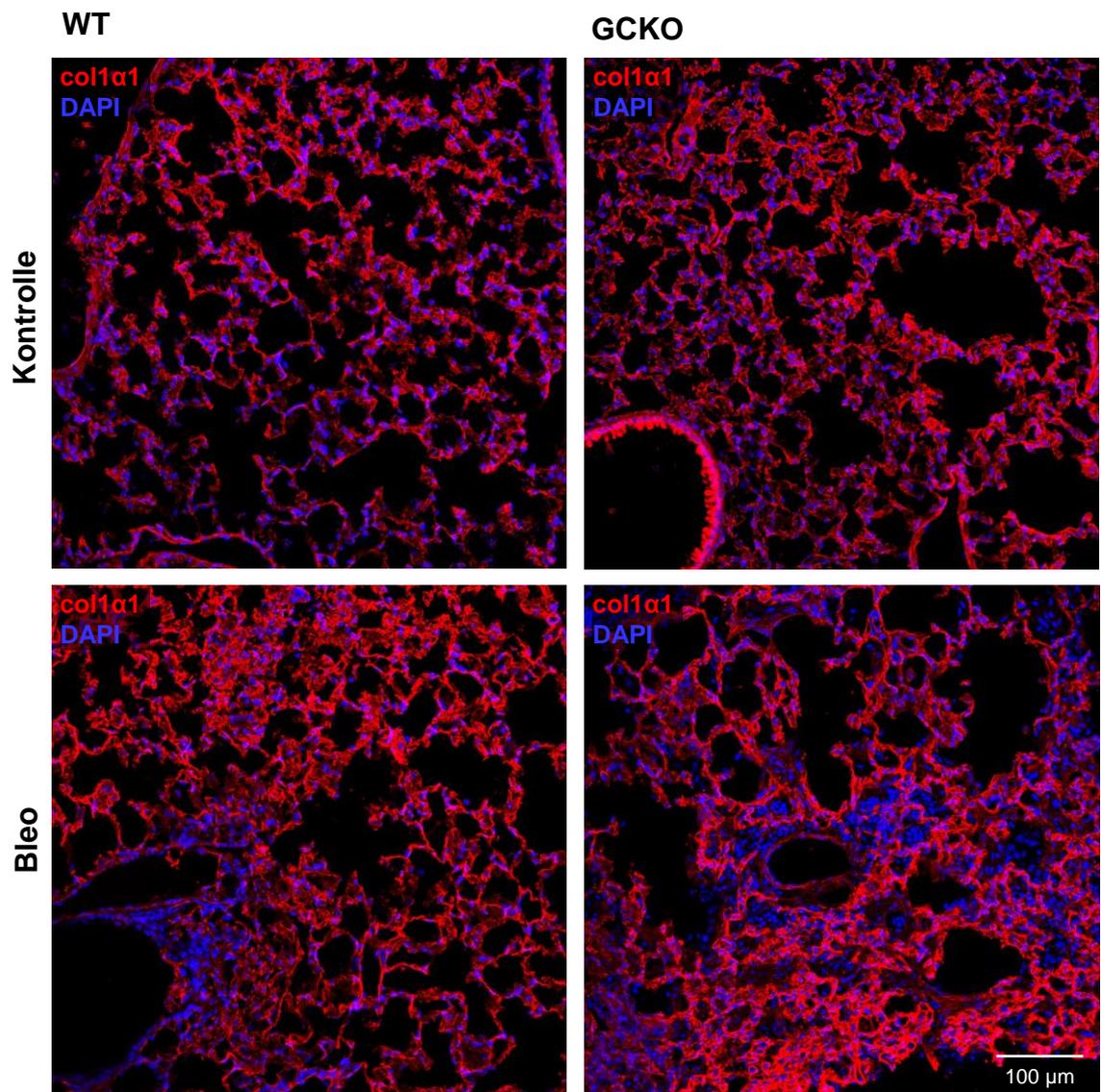
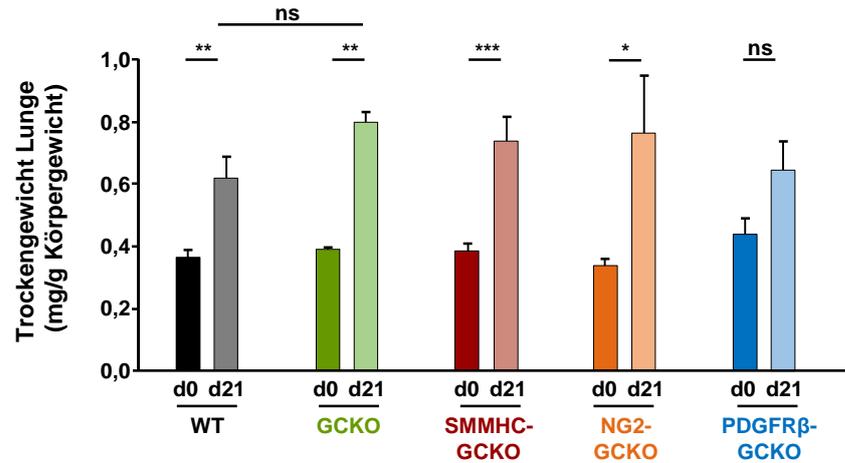


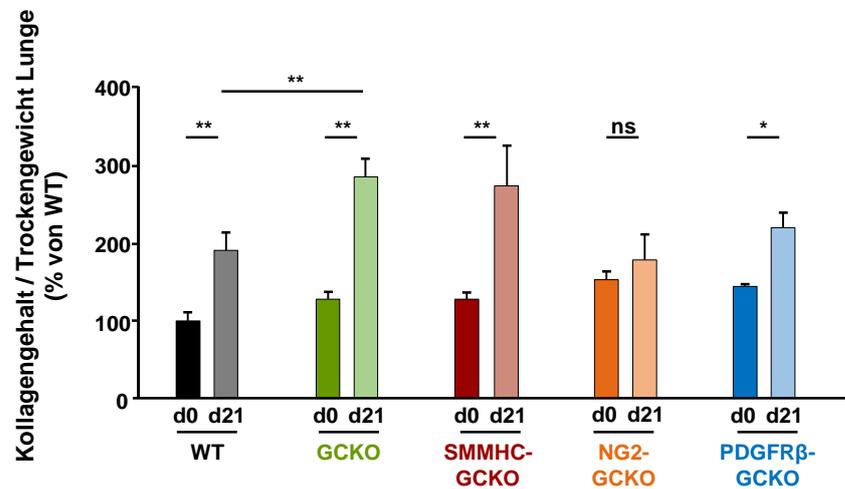
Abbildung 15: Kollageneinlagerung bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose der Maus

Immunhistochemische Analyse der Kollagen-Expression in unbehandelten und Bleomycin-behandelten Lungen. Lungenschnitte von WT- und GCKO-Tieren wurden mit Antikörper gegen col1α1 (rot) gefärbt. Lungen zeigen eine erhöhte Kollagen-Expression 21 Tage nach der Gabe von Bleomycin (Bleo). DAPI wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet (blau).

A



B



C

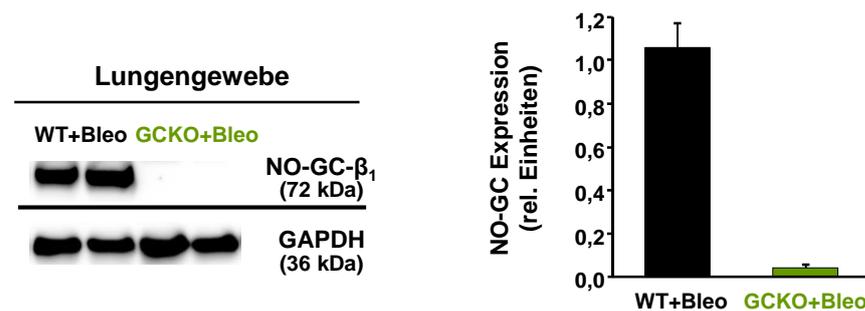


Abbildung 16: Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt

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).

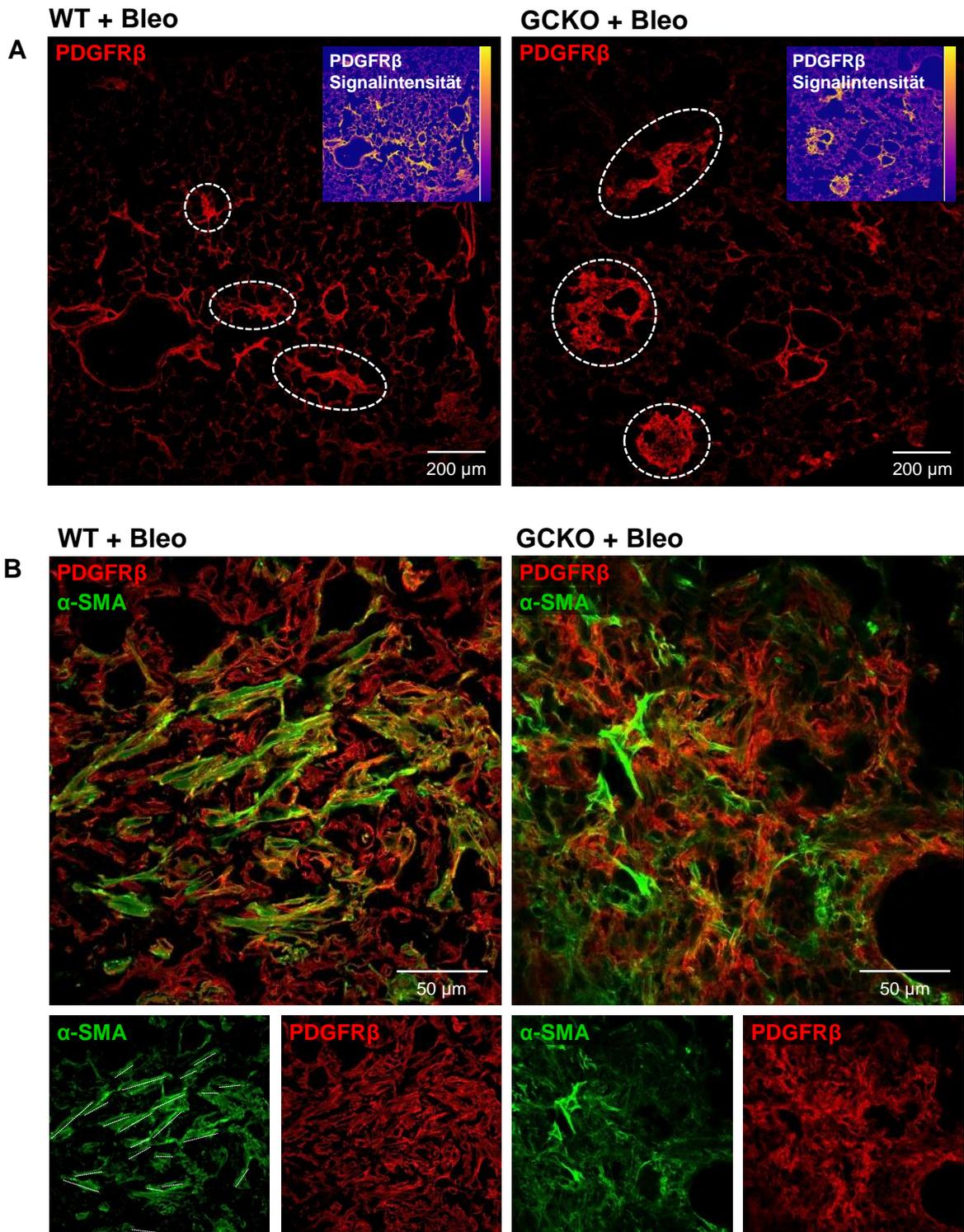


Abbildung 17: Bleomycin-induzierte Lungenfibrose in An- und Abwesenheit von NO-GC

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.

WT + Bleo

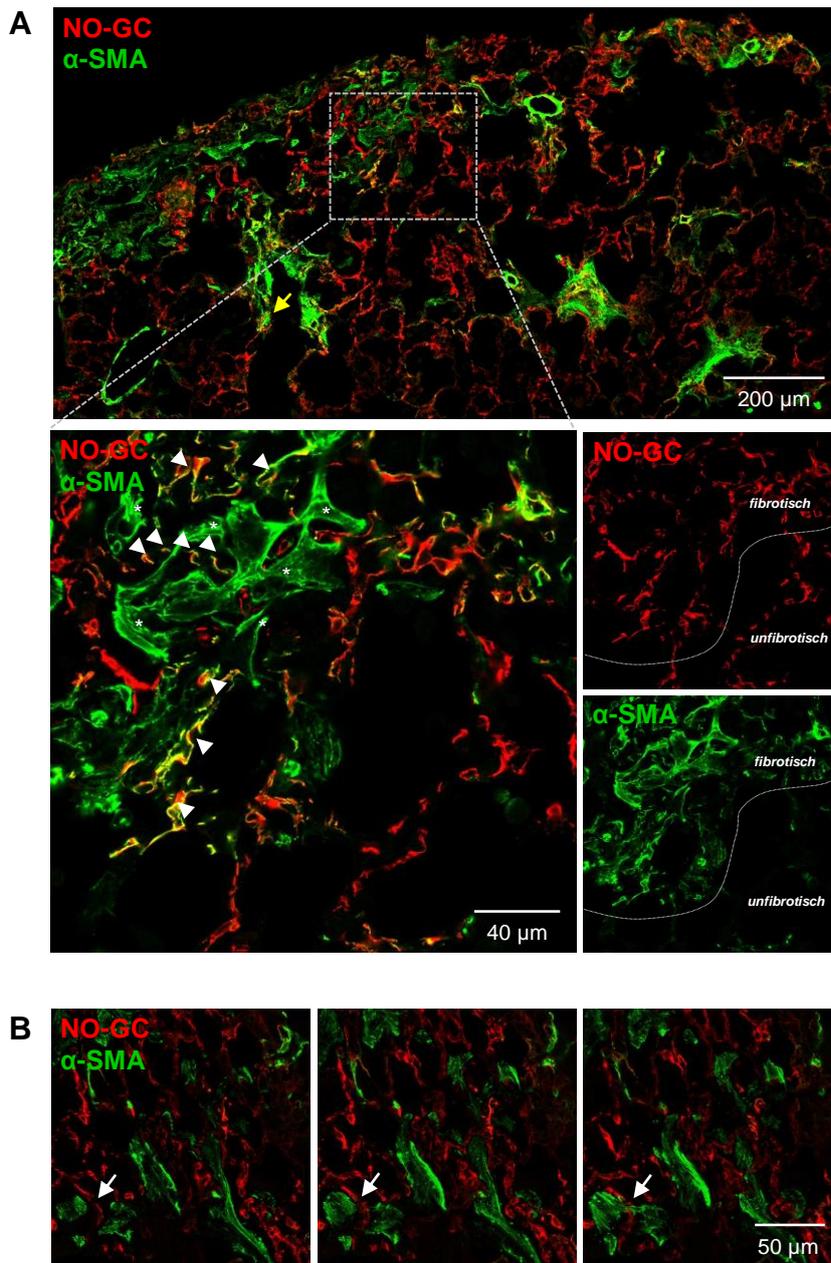


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in der fibrotischen Lunge
Zur Induktion der Lungenfibrose in WT-Tieren wurde Bleomycin (Bleo) einmalig intratracheal appliziert. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen NO-GC (rot) und α -SMA (grün) gefärbt. Es können zwei Typen von α -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

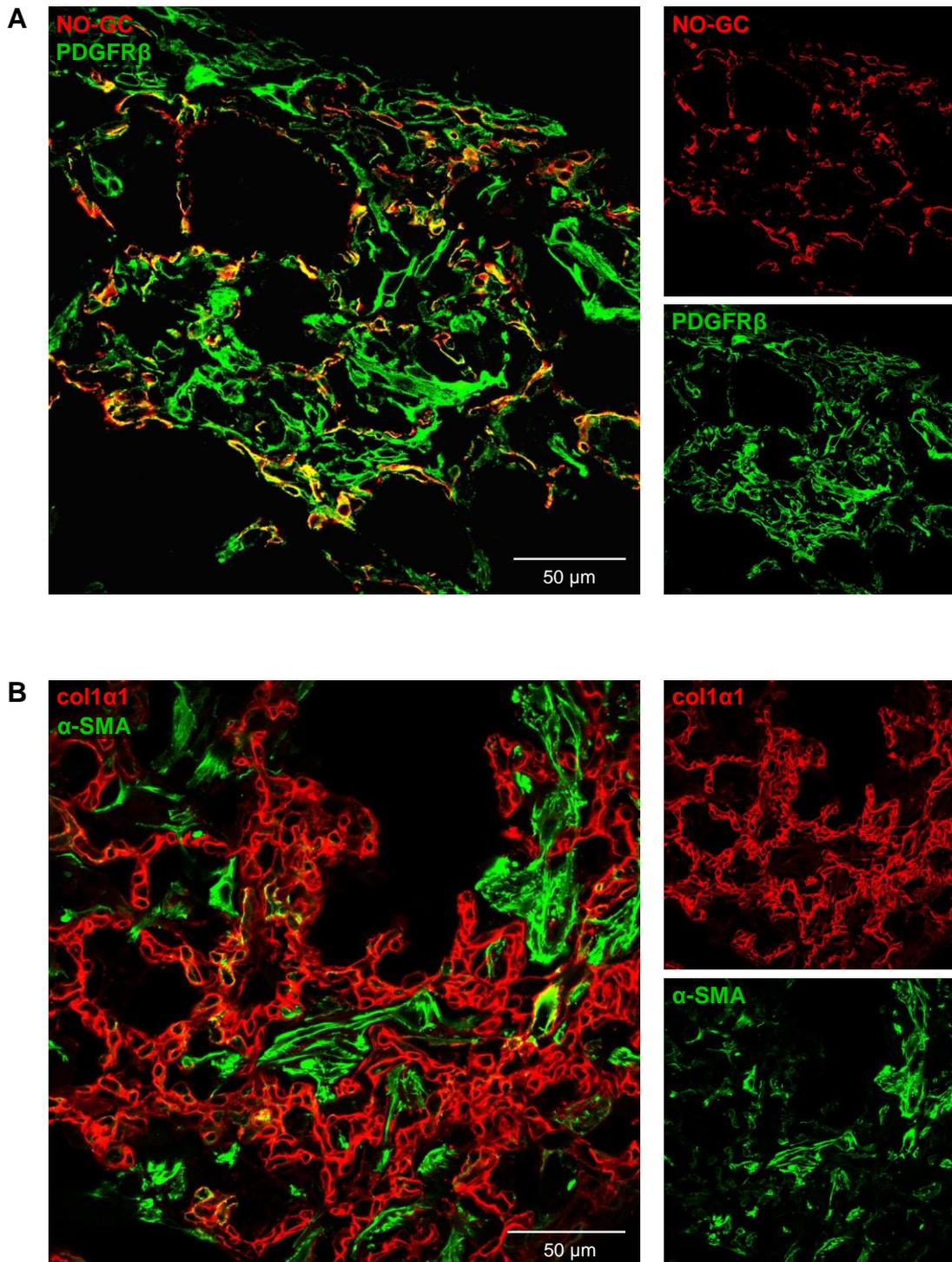


Abbildung 19: Herkunft und Lokalisation von Myofibroblasten-Subtypen

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).

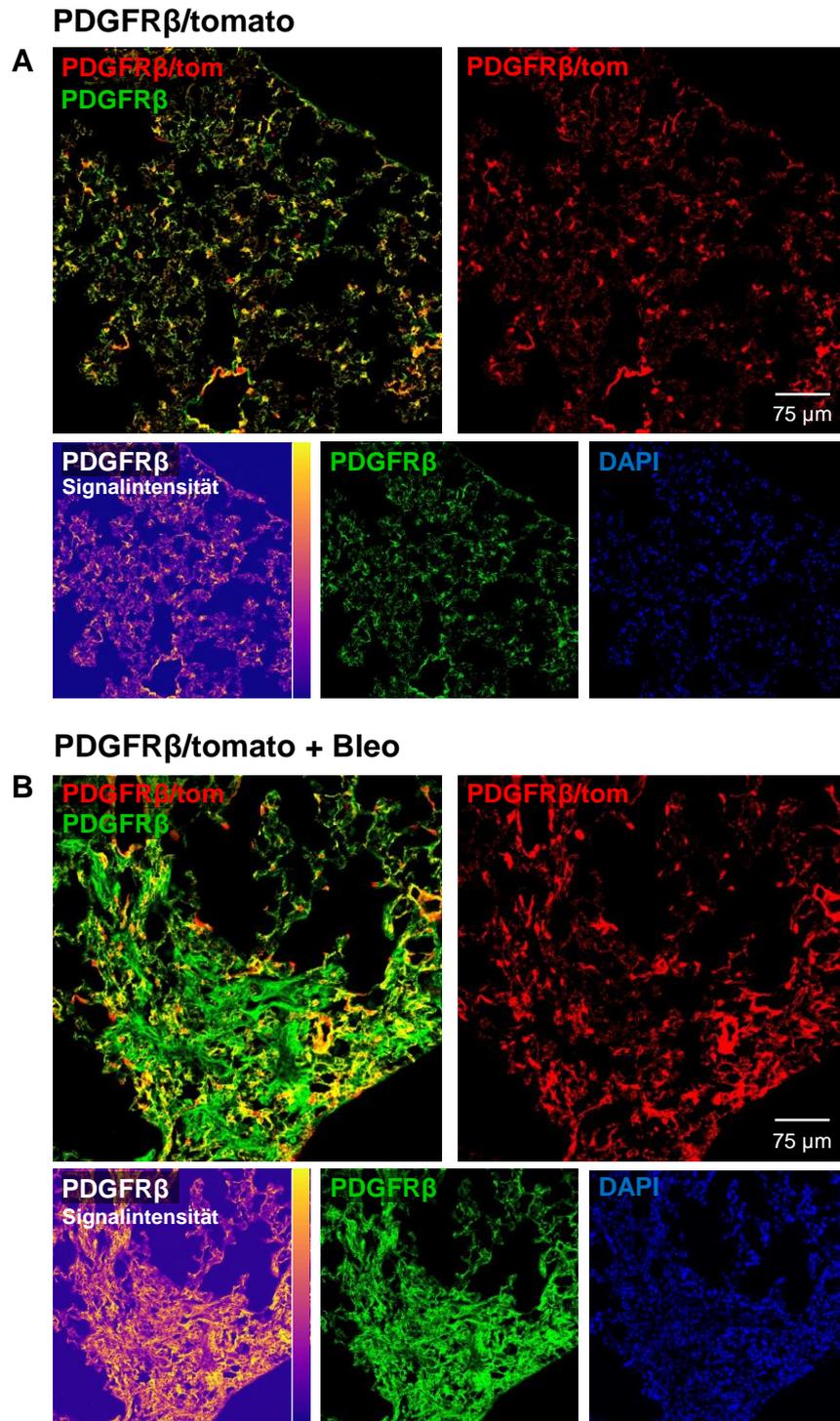


Abbildung 20: Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten in der gesunden und Bleomycin-behandelten Lunge

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

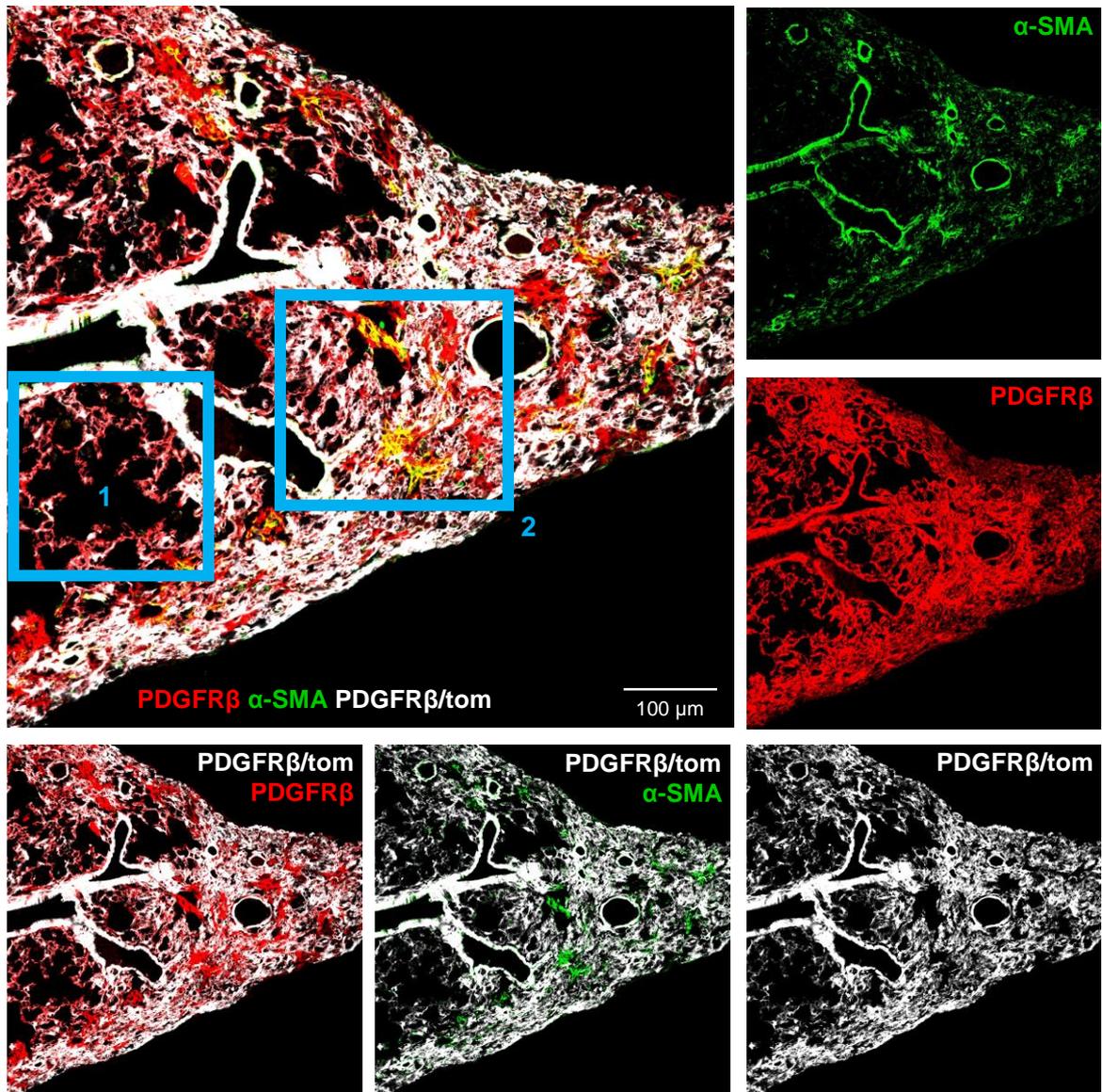


Abbildung 21: Lineage Tracing von PDGFR β -positiven Perizyten während der Lungenfibrose
Lungenschnitte von Bleomycin-behandelten Reporter-mäusen, die das fluoreszierende Protein tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β Promotors exprimieren (PDGFR β /tom; weiß) wurden zeitgleich mit Antikörpern gegen α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

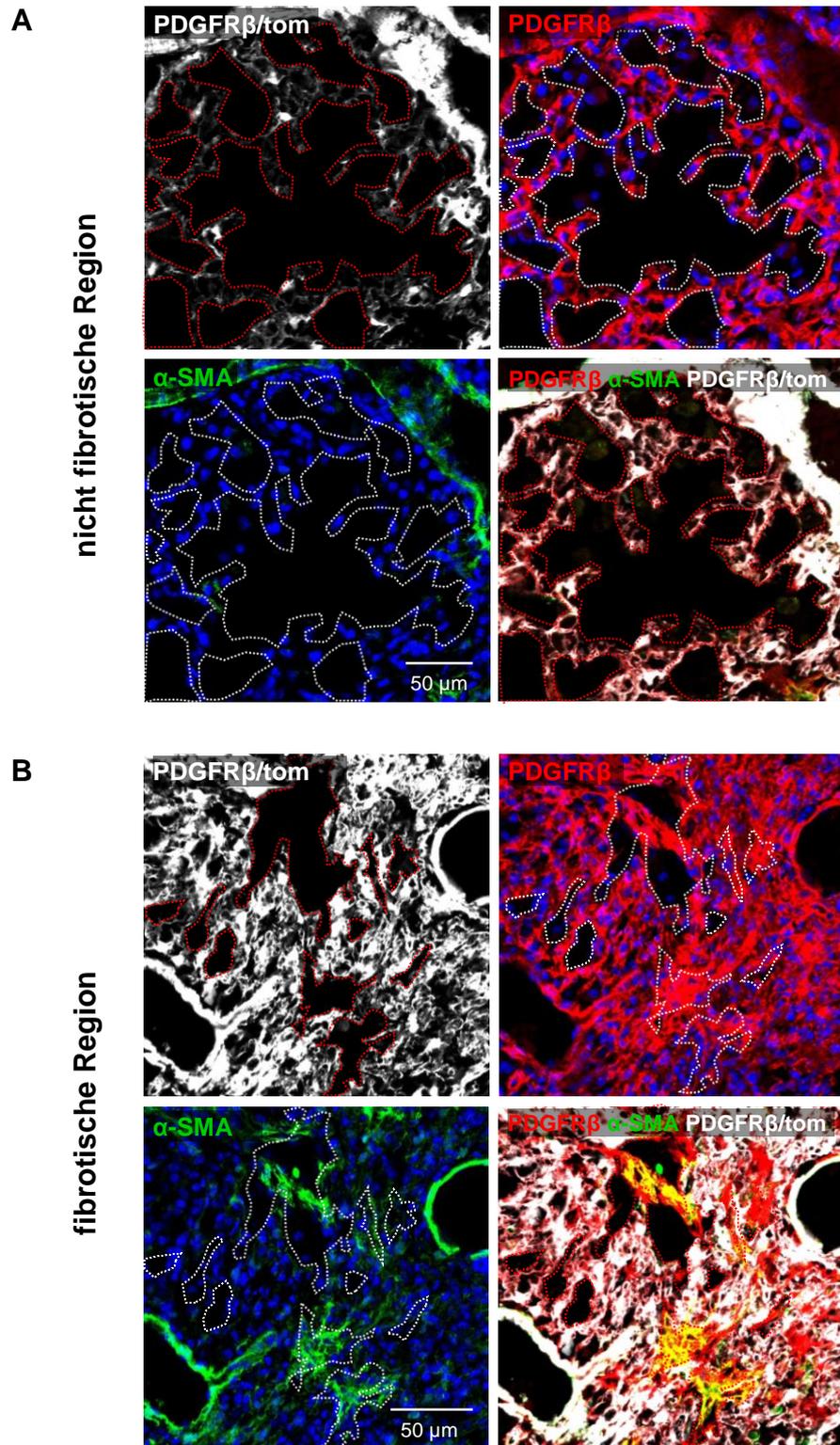


Abbildung 22: Identifizierung von unterschiedlichen Myofibroblasten-Populationen durch Lineage Tracing von Perizyten

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).

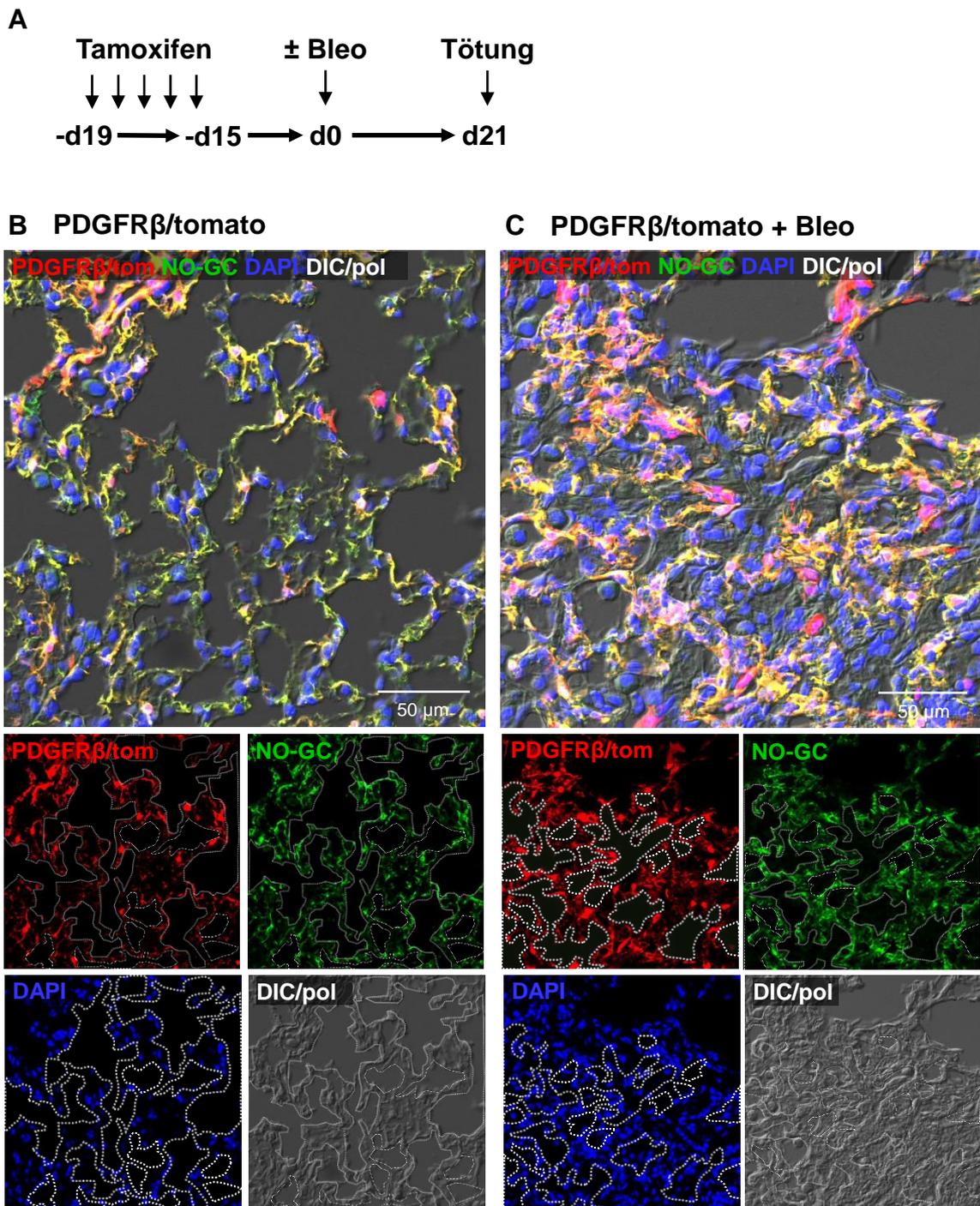
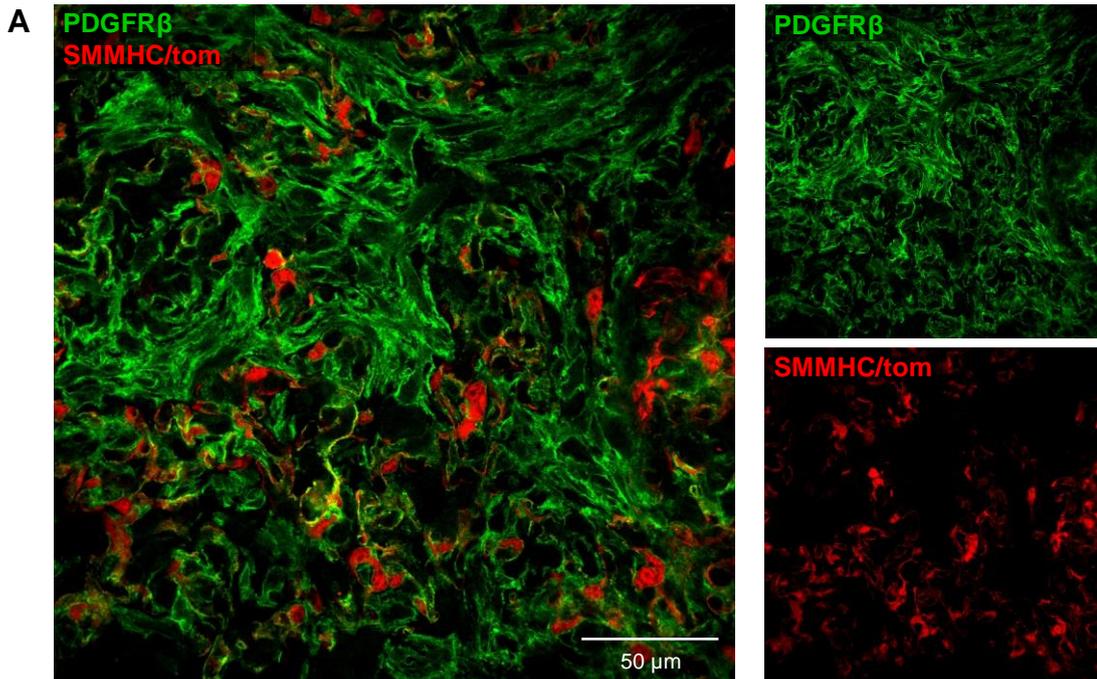


Abbildung 23: Immunhistochemische Analyse der NO-GC-Expression in PDGFRβ/tomato-Reporter-mäusen während der Lungenfibrose

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 + Bleo



NG2/tomato + Bleo

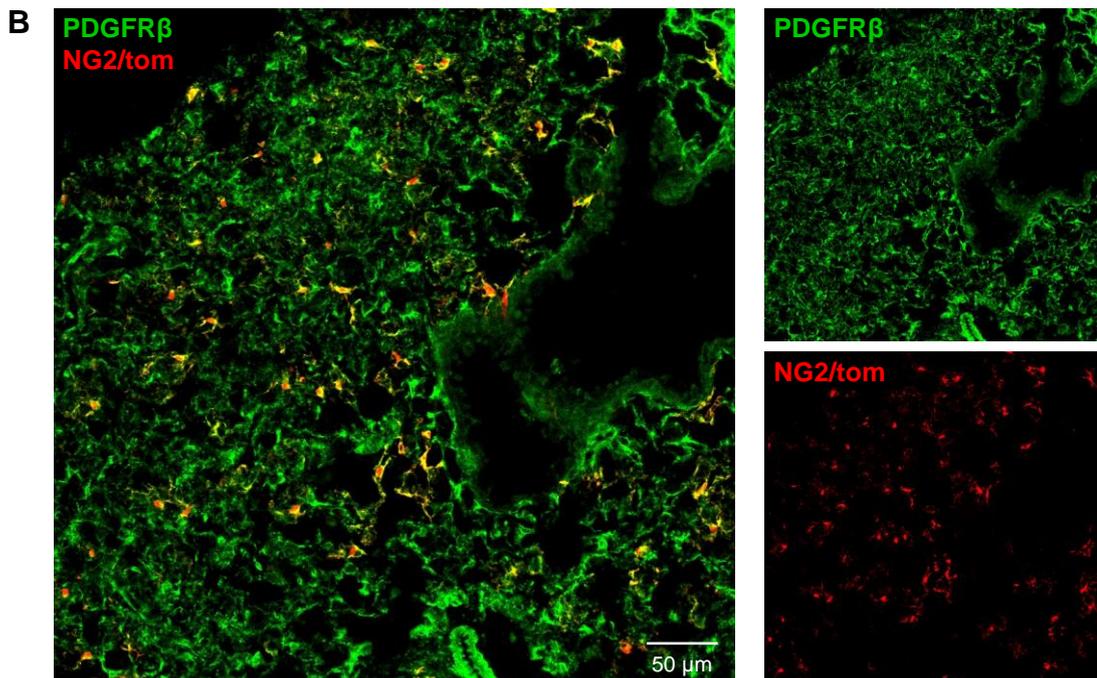


Abbildung 24: Lineage Tracing von SMMHC- und NG2-positiven Perizyten während der Lungenfibrose

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

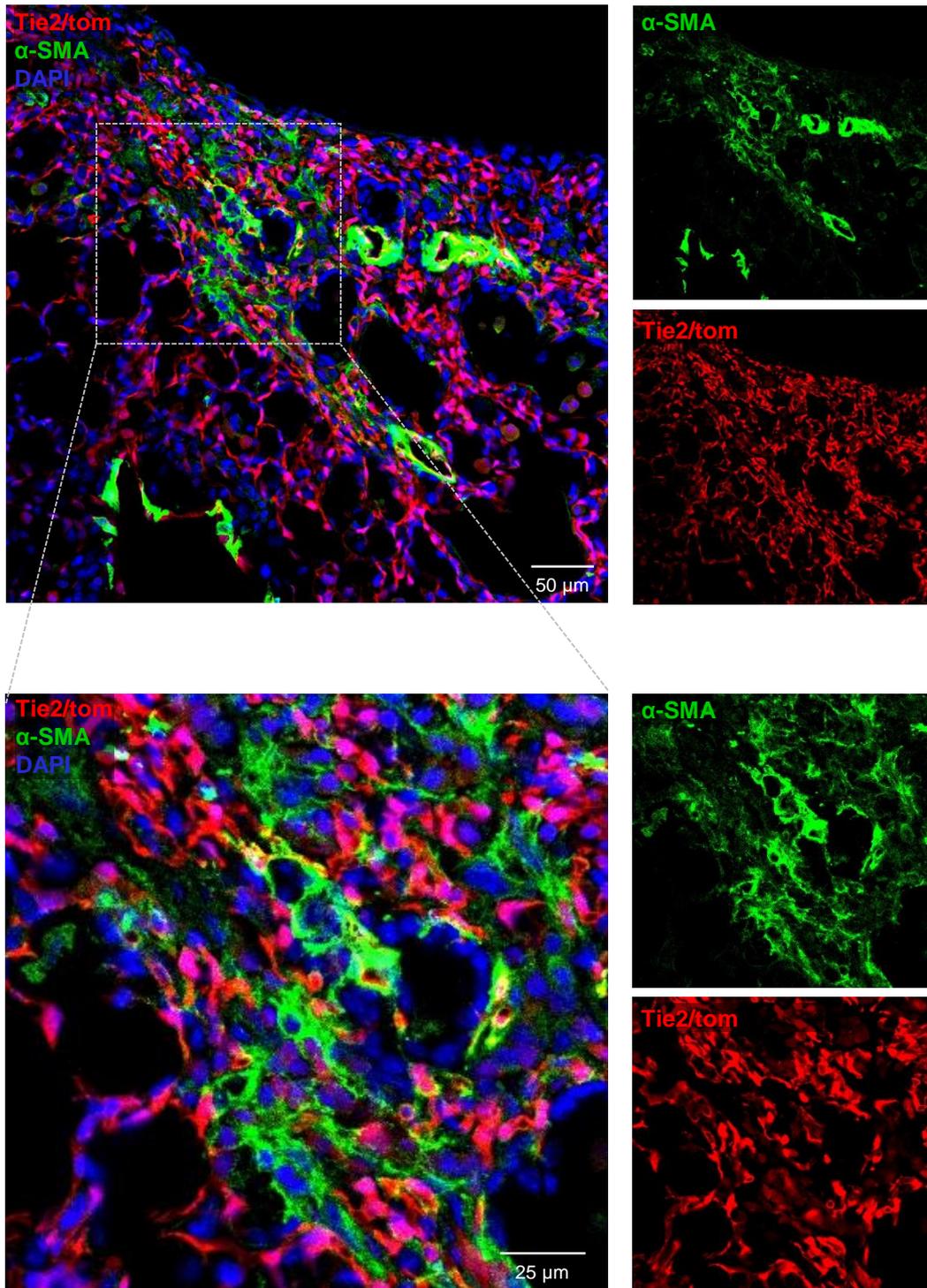


Abbildung 25: Lineage Tracing von Tie2-positiven Zellen während der Lungenfibrose

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

WT + Bleo

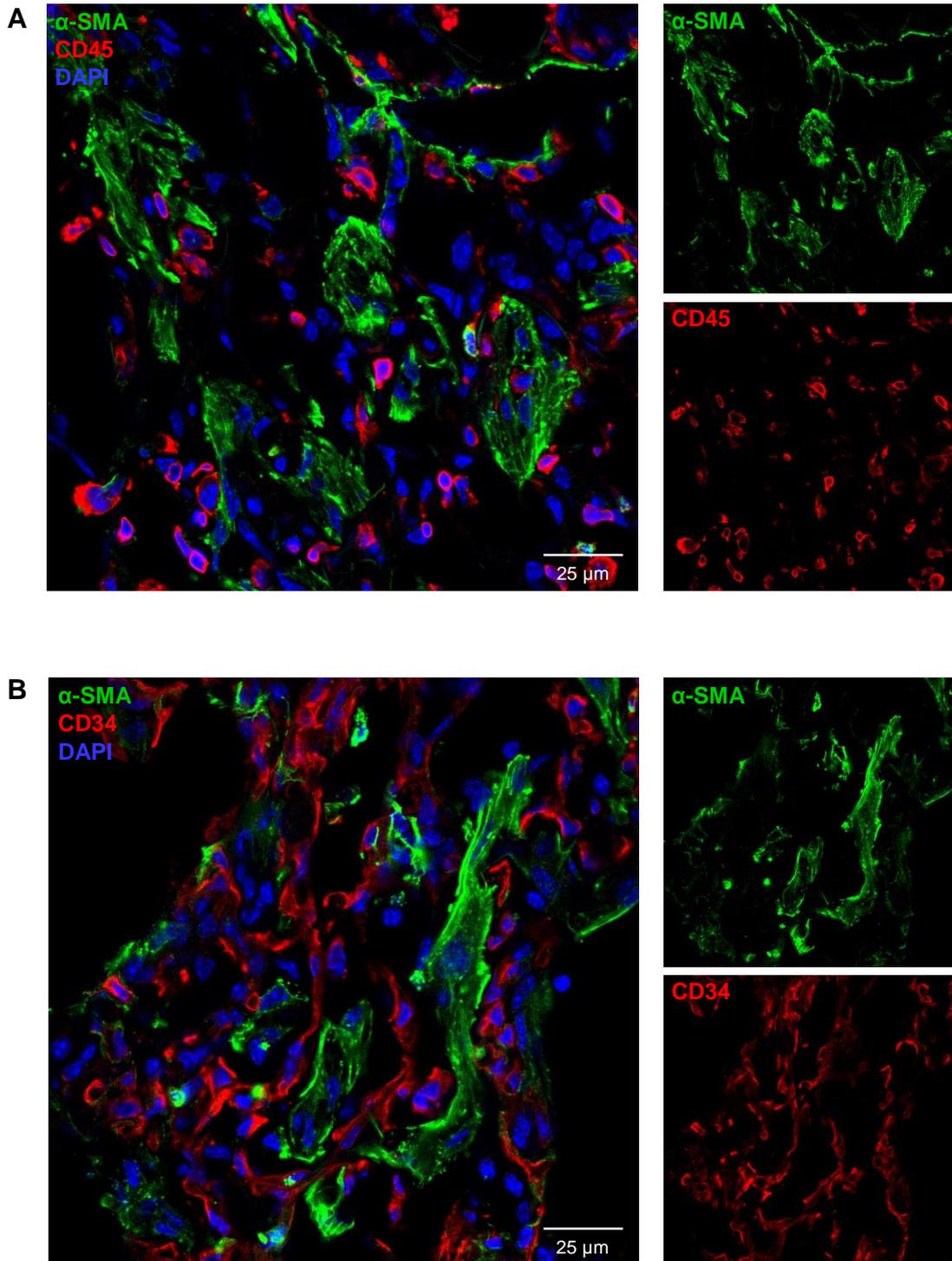


Abbildung 26: Expression von Fibrozytenmarkern in der fibrotischen Lunge

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).

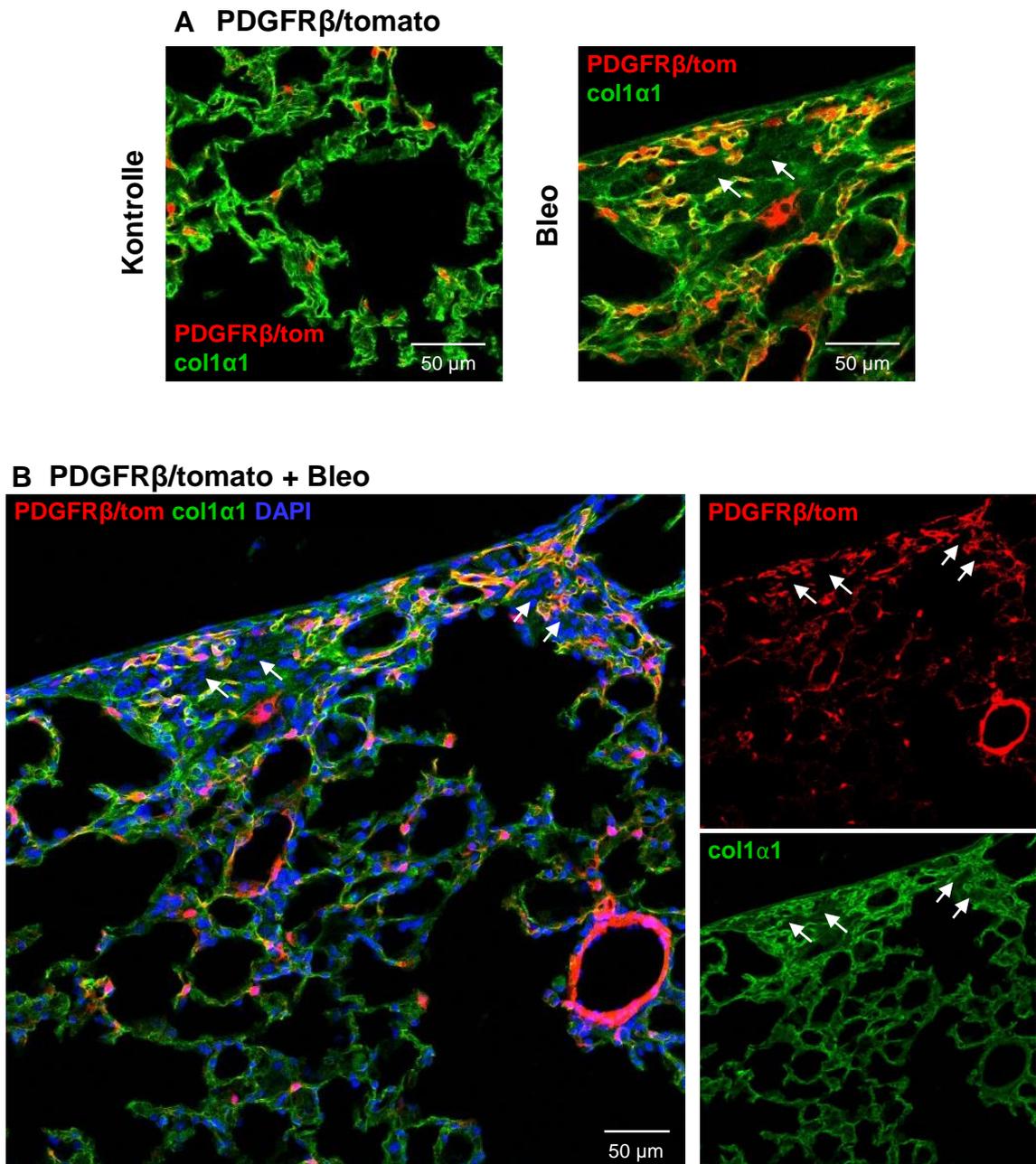
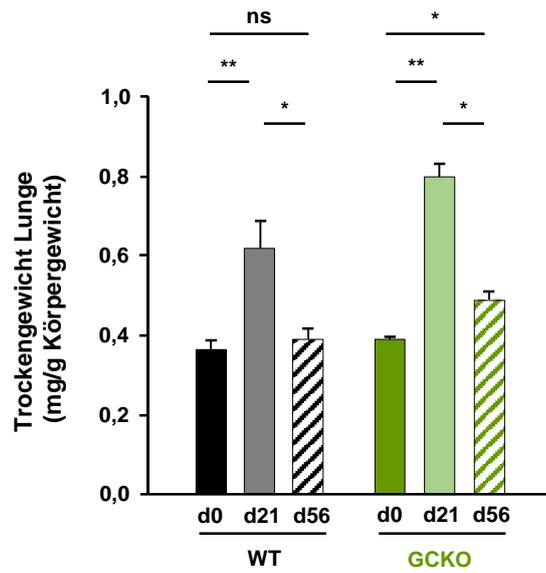


Abbildung 27: Kollageneinlagerung in der Bleomycin-behandelten Lunge

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).

A



B

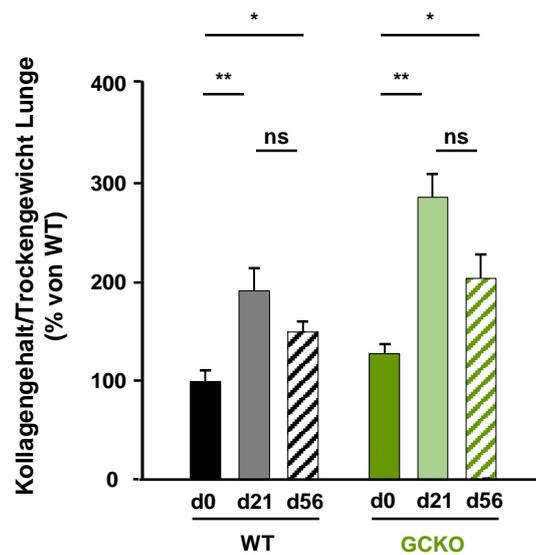
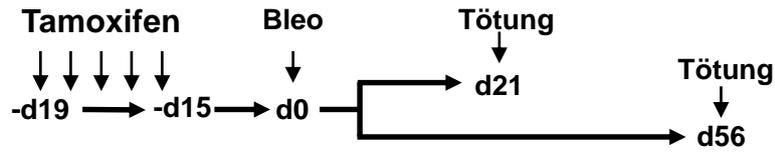


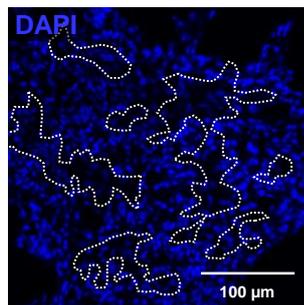
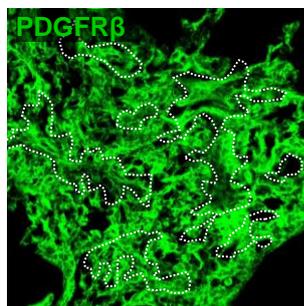
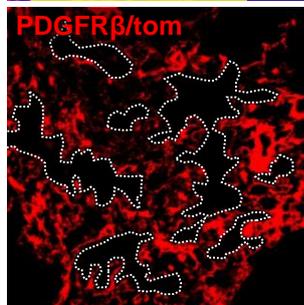
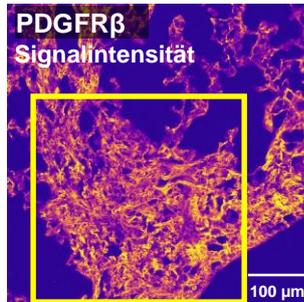
Abbildung 28: Messung von Trockengewicht und Kollagengehalt 56 Tage nach Bleomycin-Behandlung

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; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$).

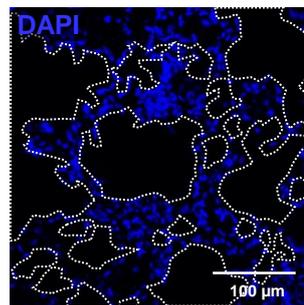
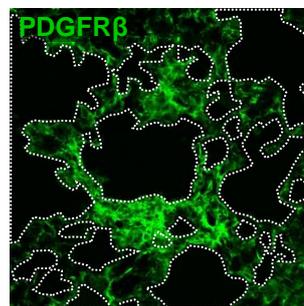
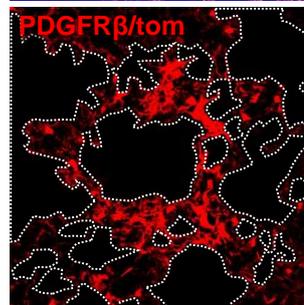
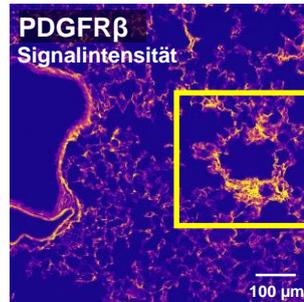
A PDGFR β /tomato



B d21



C d56



D d56

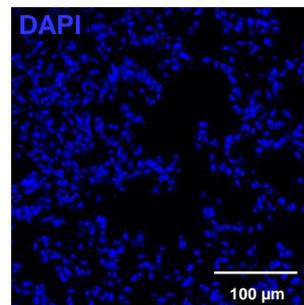
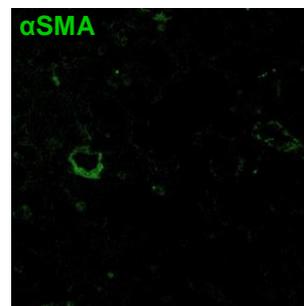
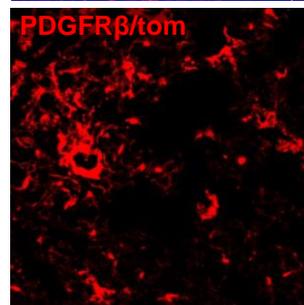
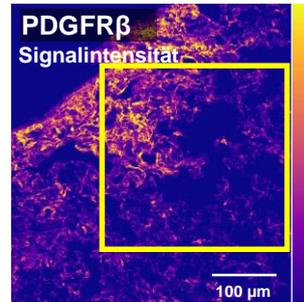
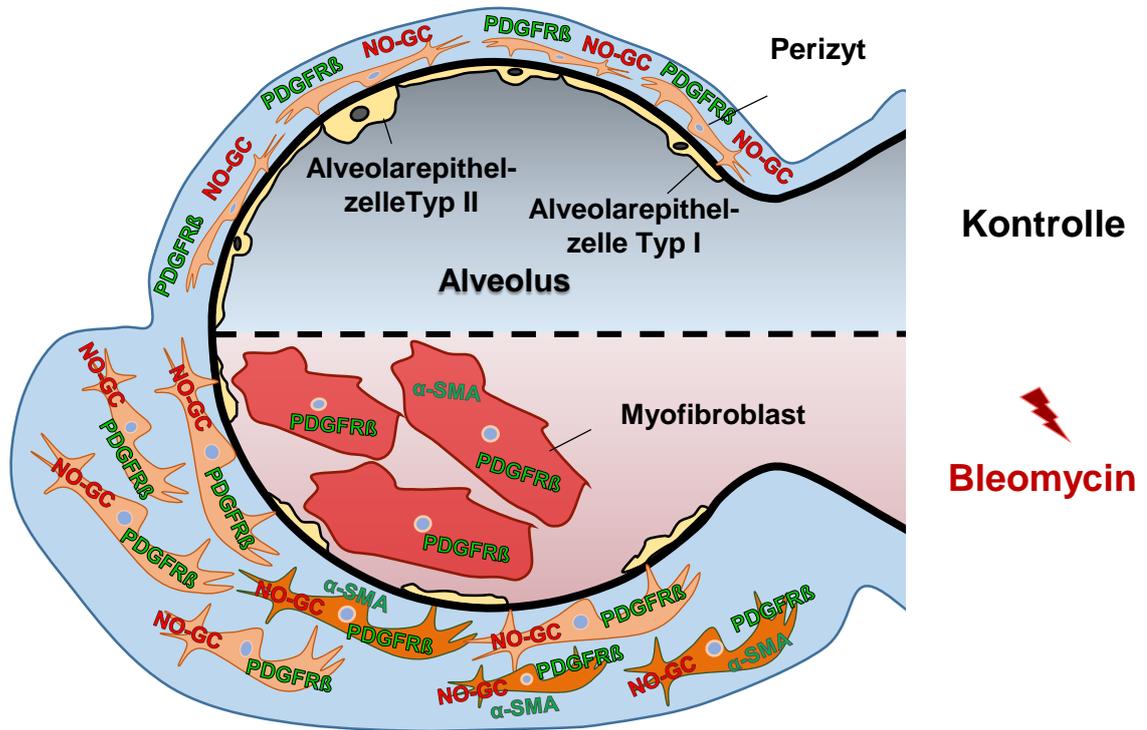


Abbildung 29: Auflösung fibrotischer Veränderungen der Lunge

(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).



Interstitielle Myofibroblasten

Intra-alveoläre Myofibroblasten

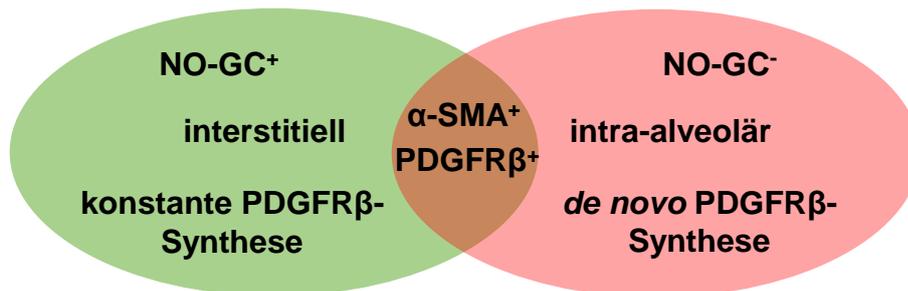


Abbildung 30: Differenzierung von zwei Myofibroblasten-Subtypen

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.

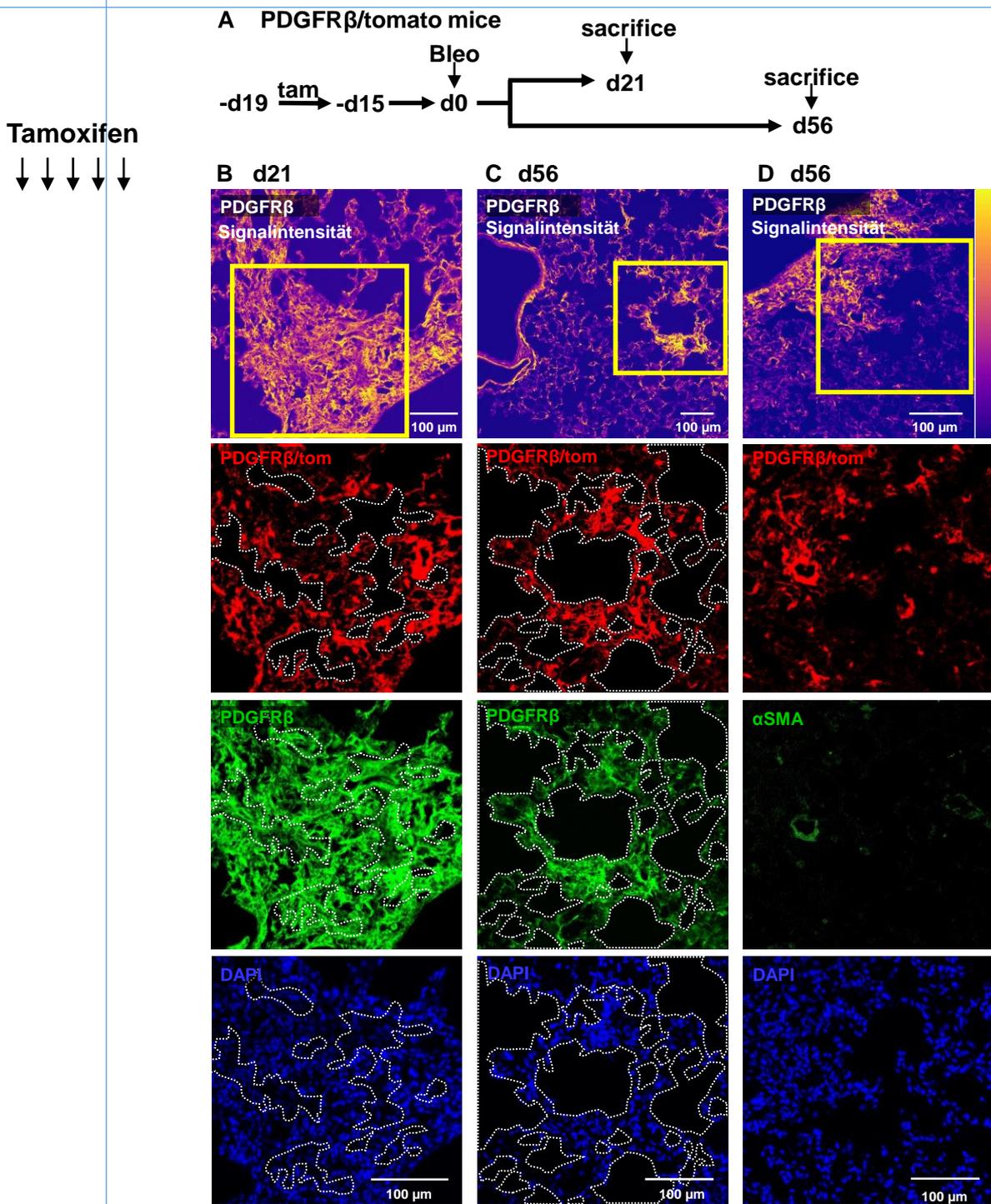
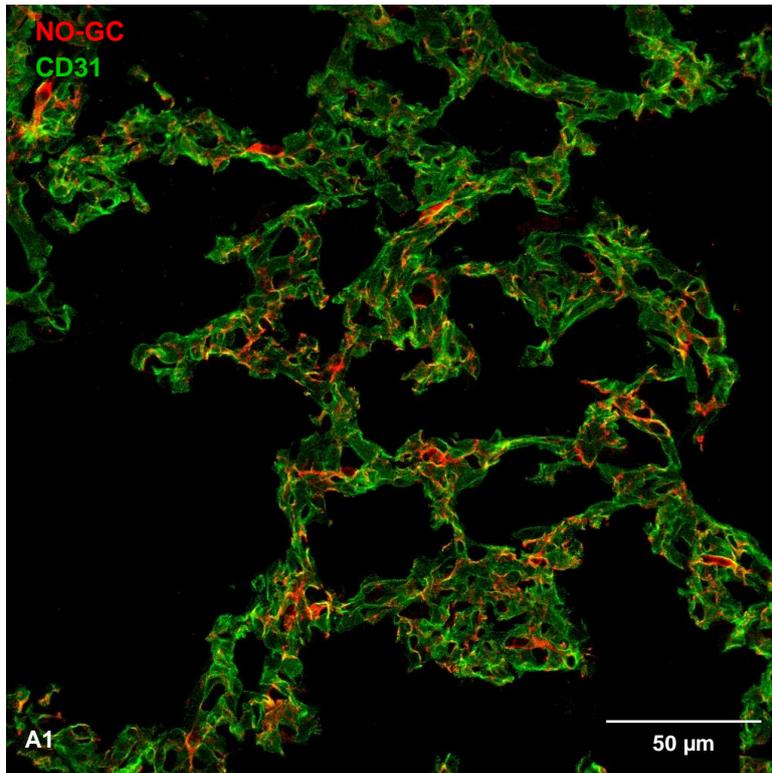


Abbildung 24: Auflösung fibrotischer Veränderungen der Lunge

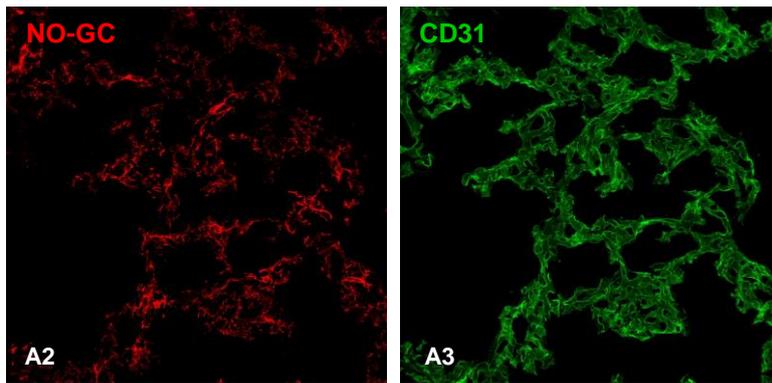
(A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. PDGFR β /tomato Reporterermäusen wurde Tamoxifen (tam) an 5 aufeinander folgenden Tagen gespritzt, um die Expression von tdTomato unter Kontrolle des PDGFR β Promotors (PDGFR β /tom; rot) zu induzieren. 15 Tage später (=d0) wurden Mäuse mit Bleomycin (Bleo) behandelt. Lungen wurden 21 oder 56 Tage später (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).

A

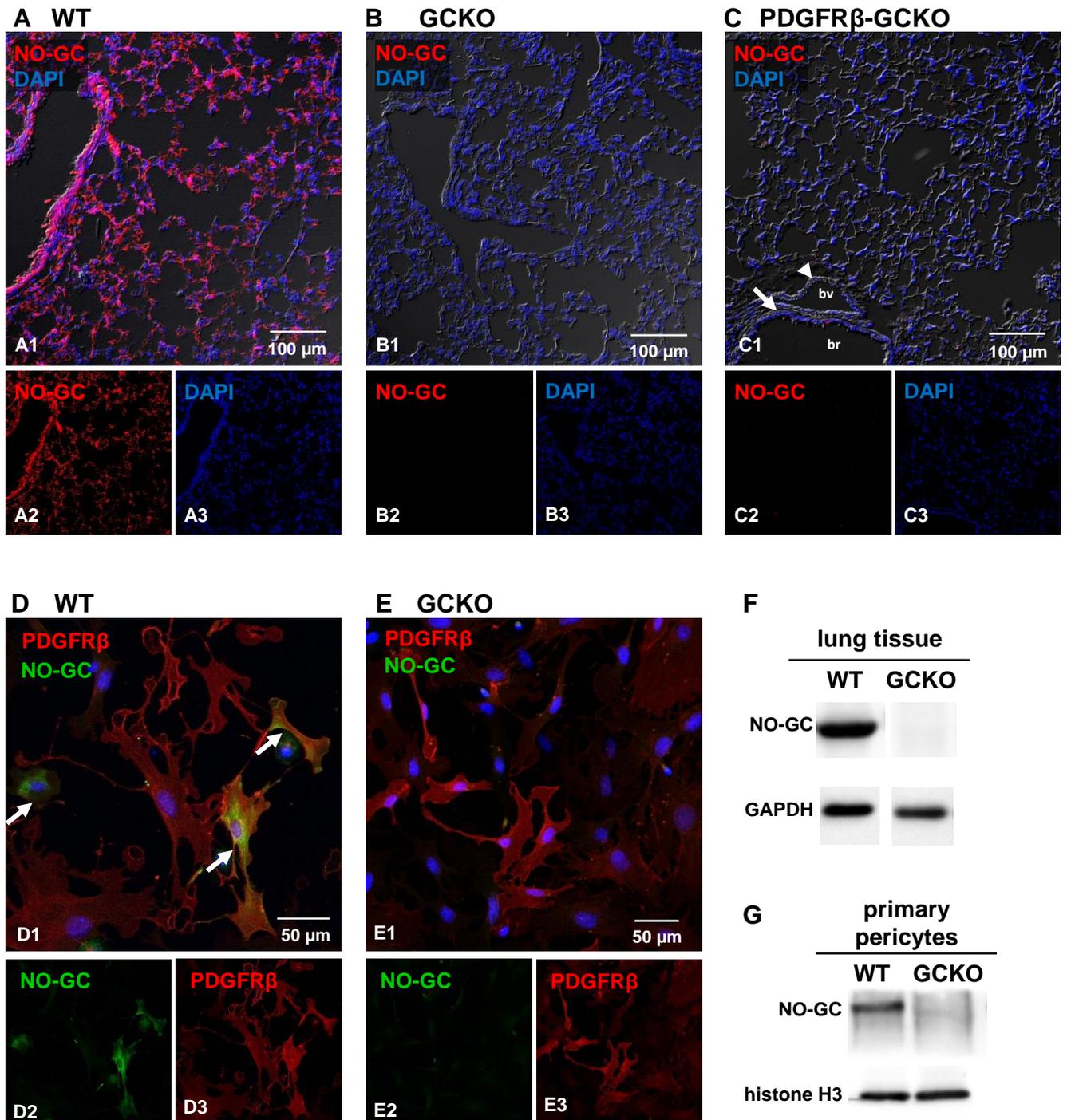


Supplemental Figure 1: NO-GC is not expressed in lung endothelium

Lung from WT mice was double stained with antibodies against NO-GC (red) and CD31 (green). In addition to Fig. 1C, this Z stack (7.7 μm) shows spatial separation of NO-GC and CD31; clearly, NO-GC⁺ pericytes wrap around endothelial cells. Single channels are shown in A2/A3.



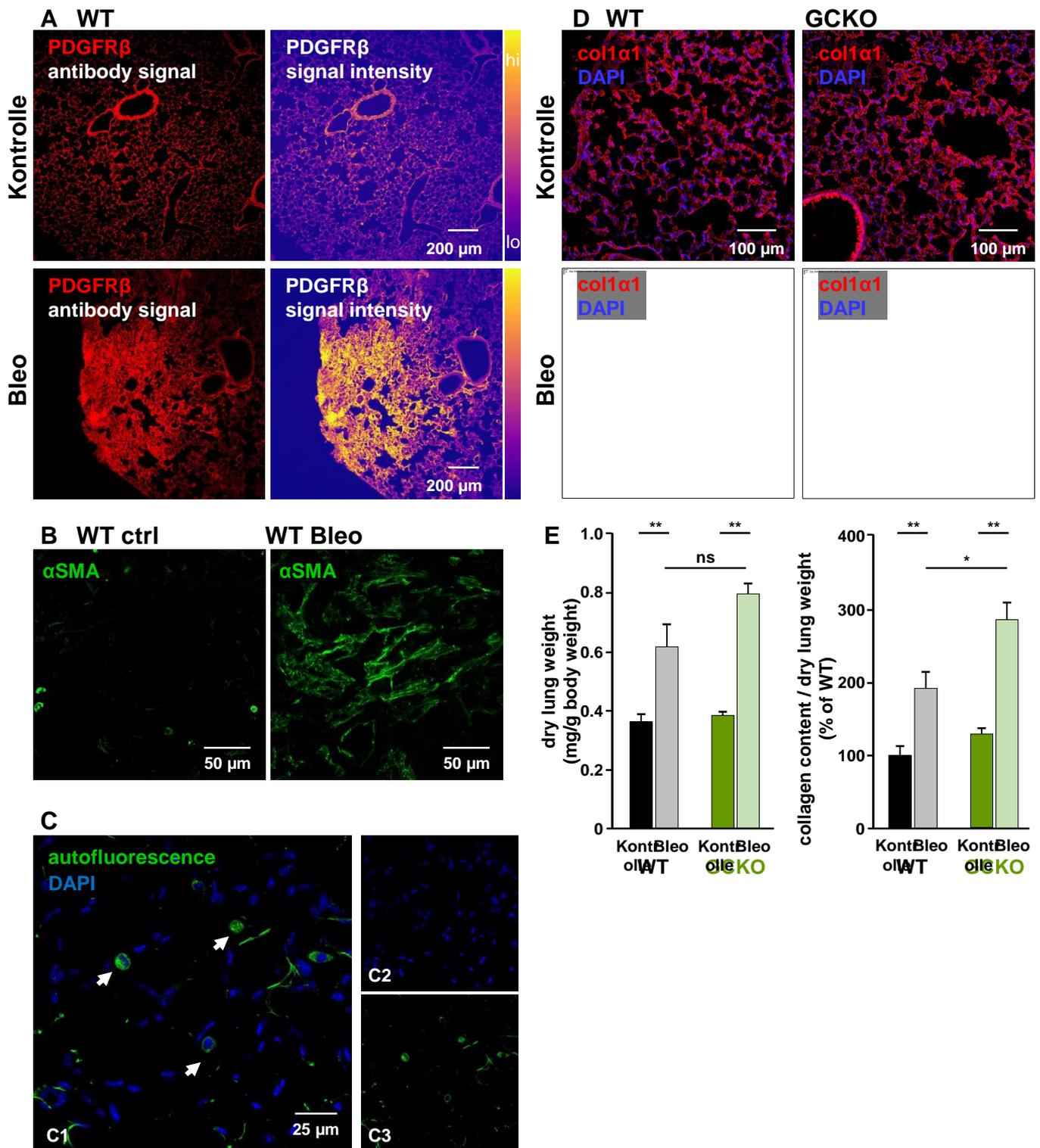
Suppl. Fig. 1



Supplemental Figure 2: Deletion of NO-GC from murine lung pericytes

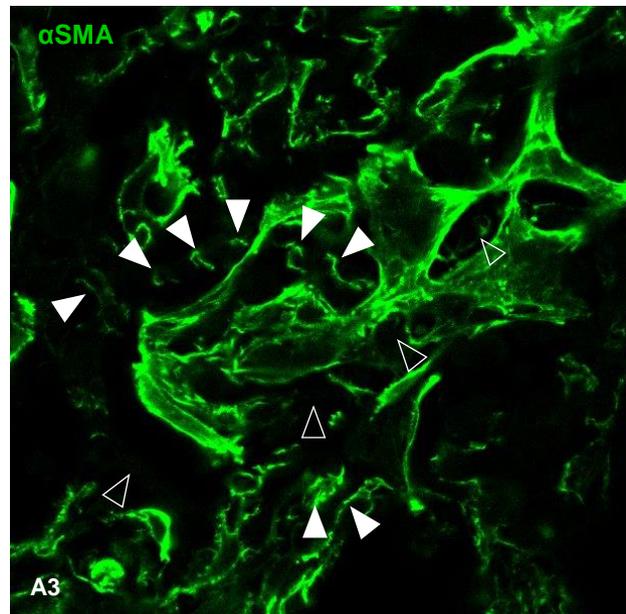
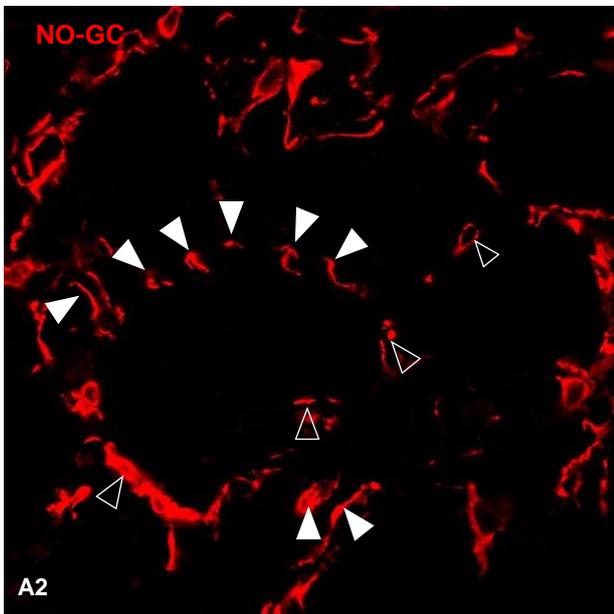
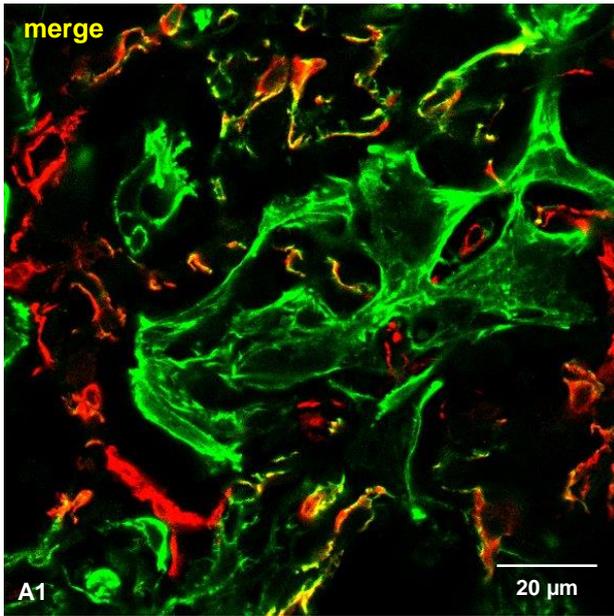
Lungs from WT, GCKO and PDGFR β -GCKO mice were stained with an antibody against NO-GC. In WT lung, NO-GC⁺ cells (red) are found in the alveolar wall and in SMC of bronchi and blood vessels (A). In GCKO lung, NO-GC signals were absent (B). Deletion of NO-GC using Cre recombinase expressed under control of the tamoxifen-inducible PDGFR β promoter resulted in the loss of NO-GC-specific staining in pericytes as well as SMC of blood vessels (arrowhead) and airways (arrow). DAPI was used to stain nuclei (blue). Single channels are shown in A2/A3, B2/B3 and C2/C3. br, bronchiolus; bv, blood vessel.

Western blot of lung tissue from WT and GCKO animals show absence of NO-GC in the knockout strain. GAPDH is shown as loading control (F). Cultured pericytes isolated from WT lung (D) showed co-expression of NO-GC (green) and PDGFR β (red). Specific signals for NO-GC were absent in pericytes from GCKO lung (E). DAPI was used to stain nuclei (blue). Single channels are shown in D2/D3 and E2/E3. Western blot analysis of NO-GC expression in cultured pericytes from WT and GCKO mice. Histone H3 was used as loading control (G).



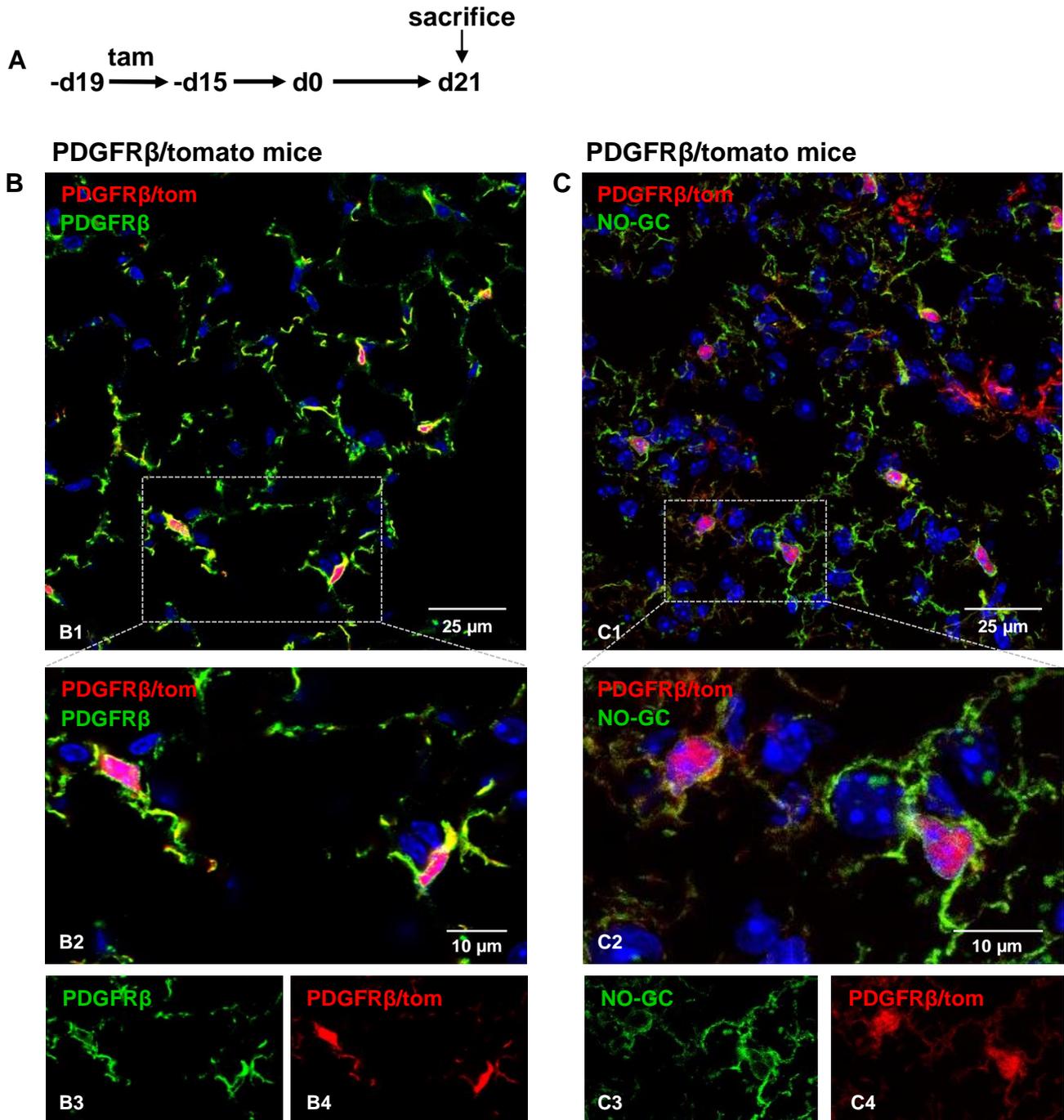
Supplemental Figure 3: Bleomycin-induced lung injury in mice

Bleomycin (Bleo) was instilled intratracheally to induce lung injury and mice were sacrificed 21 days later. (A) Confocal images of untreated and Bleomycin-treated WT lung stained with PDGFR β antibody. Signal intensity is displayed by pseudocolors ranging from yellow (high signal intensity) to purple (low intensity). (B) Confocal images of WT lung showing the presence of α SMA⁺ cells 21 days after Bleomycin treatment. (C) Lung from WT animals without antibody treatment shows autofluorescent macrophages at 488 nm. DAPI was used to stain nuclei (blue). Single channels are shown in C2/C3. (D) Immunohistochemical analysis of collagen expression in control and Bleomycin-treated murine lung. Lungs of WT and GCKO mice were stained with an antibody against col1 α 1 showing increased collagen expression at d21. DAPI was used to stain nuclei (blue). (E) Dry lung weight and collagen content of WT and GCKO mice. Data shown are mean \pm SEM of n=5-11 per genotype (n.s., not significant; *p<0.05; **p<0.01).



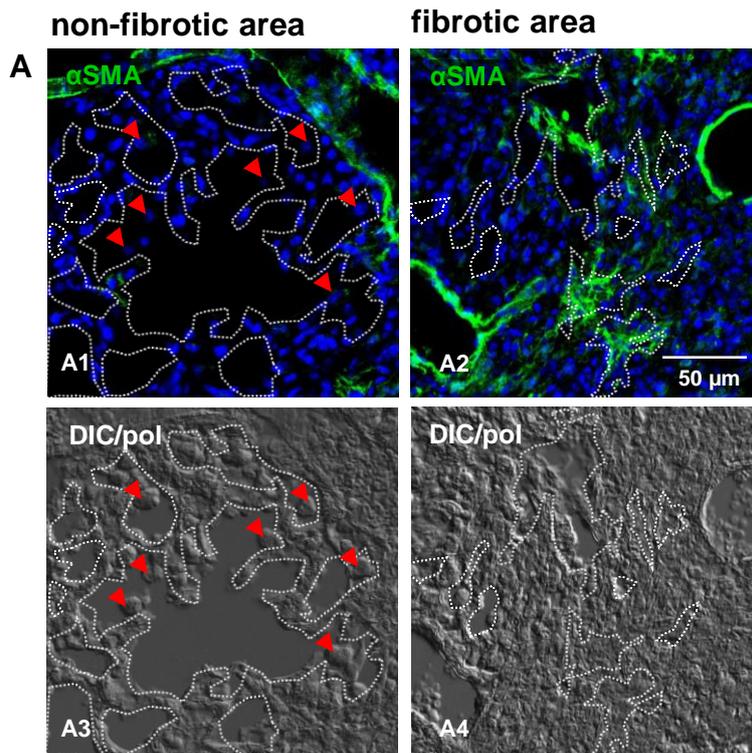
Supplemental Figure 4: Two types of myofibroblasts can be differentiated by NO-GC expression and extra/intra-alveolar localization.

Enlargement of the fibrotic area from Fig. 3A. Two different types of myofibroblasts could be differentiated based on NO-GC expression and localization: a subset of α SMA⁺ cells of the alveolar wall expresses NO-GC (indicated by filled arrowheads). Large multipolar myofibroblast are found to fill the former alveolar space; this type of myofibroblasts is negative for NO-GC. Note that not all NO-GC⁺, α SMA⁻ pericytes (marked with unfilled arrowheads) transform to myofibroblasts. Single channels are shown in A2/A3.



Supplemental Figure 5: Lineage tracing of pericytes in the healthy murine lung

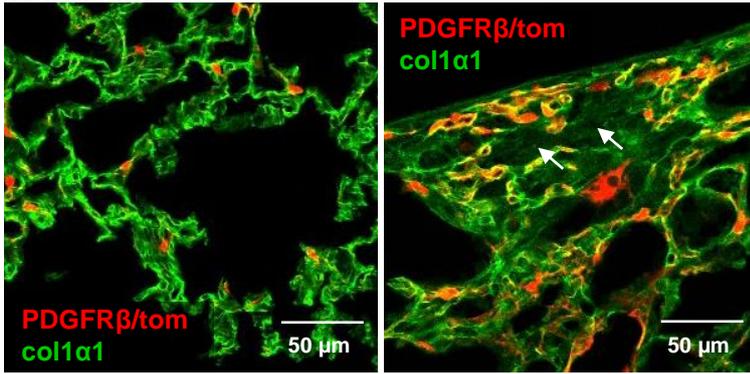
(A) Schematic illustration of the experimental setup. PDGFR β /tomato reporter mice expressing the fluorescent dye tdTomato under control of the PDGFR β promoter received tamoxifen (tam) on five consecutive days and were sacrificed 36 days later. High amounts of tdTomato (PDGFR β /tom; red) were detected in the nuclei whereas cytosolic expression was relatively low. Lungs of reporter mice were co-stained with antibodies against PDGFR β (B) or NO-GC (C). All PDGFR β ⁺ cells (green) expressed tdTomato (red). Similarly, all cells positive for NO-GC (green) co-expressed tdTomato (red). DAPI was used to stain nuclei (blue). B2 and C2 show enlargements from B1 and C1, respectively. Single channels are shown in B3/B4 and C3/C4.



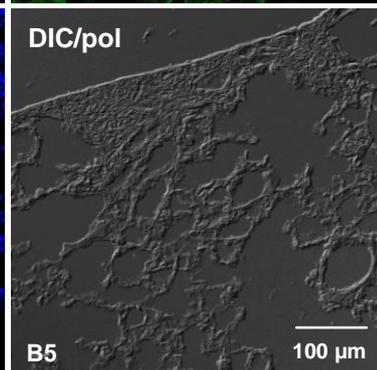
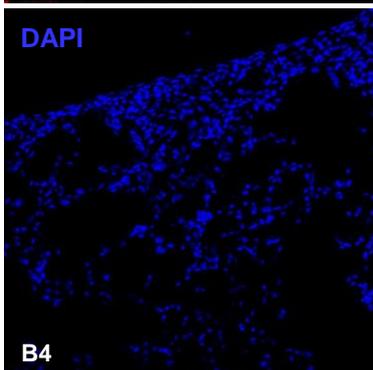
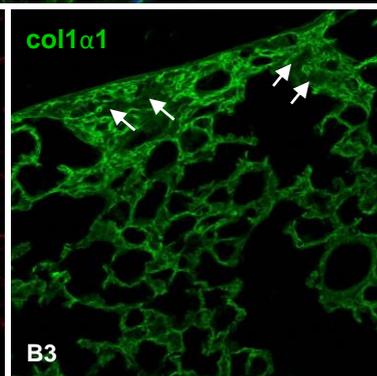
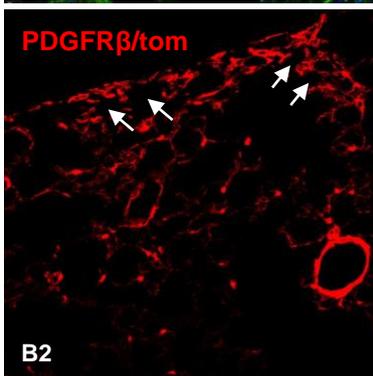
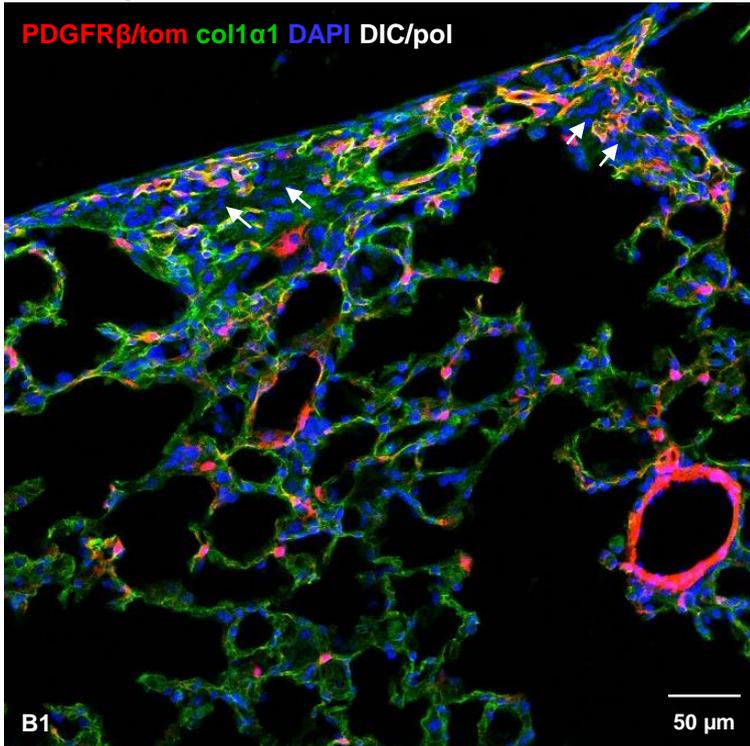
Supplemental Figure 6: Macrophages in alveoli of untreated mice

DAPI staining in Fig. 5 showed single nuclei within the alveoli of untreated mice (red arrowheads within areas marked by dotted lines). Shape and location indicate them to be alveolar macrophages. Upper panels: DAPI stain, lower panels: DIC/pol filter.

**A PDGFR β /tomato mice
Kontrolle**

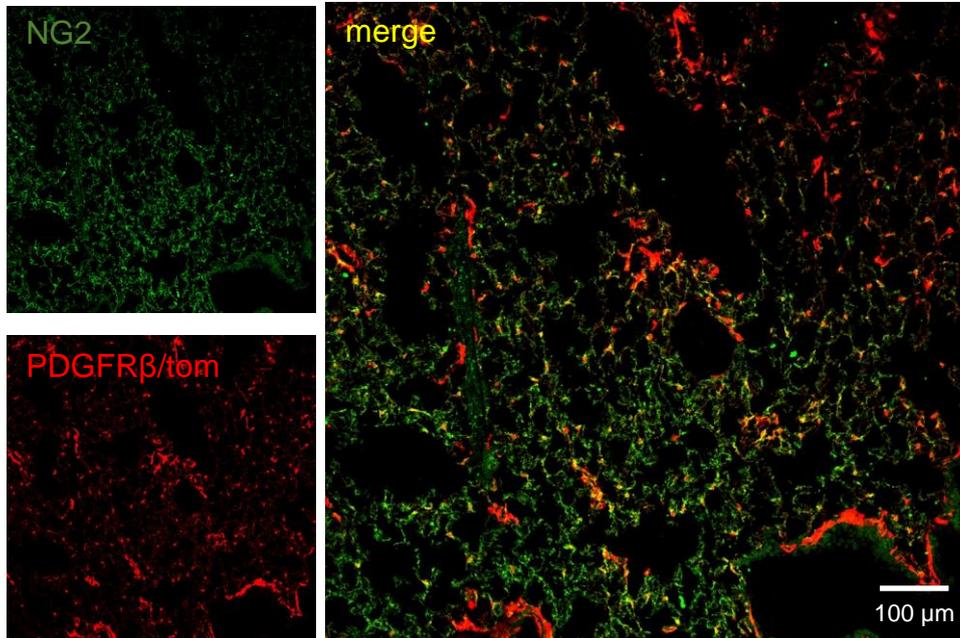


B PDGFR β /tomato mice + Bleo

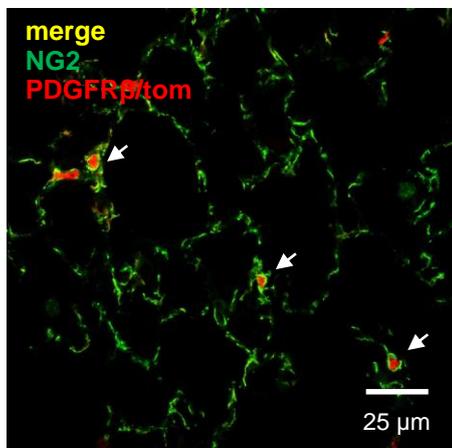


Supplemental Figure 7: Both types of myfibroblasts produce collagen after Bleomycin injury

PDGFR β /tomato reporter mice were treated with tamoxifen and Bleomycin as shown in Fig. 6A. (A) Lungs expressing the fluorescent dye tdTomato (red) were co-stained with an antibody against col1 α 1 (green). Co-staining of PDGFR β /tom and col1 α 1 (yellow) in fibrotic areas indicates ECM deposition by myfibroblasts of the alveolar wall whereas green staining in gaps indicates collagen production by intra-alveolar myfibroblasts (arrows). Single channels are shown in B2/B3. DAPI was used to stain nuclei (blue; B4). DIC/pol illustrates tissue structure (B5).



63x



Backup Folie

