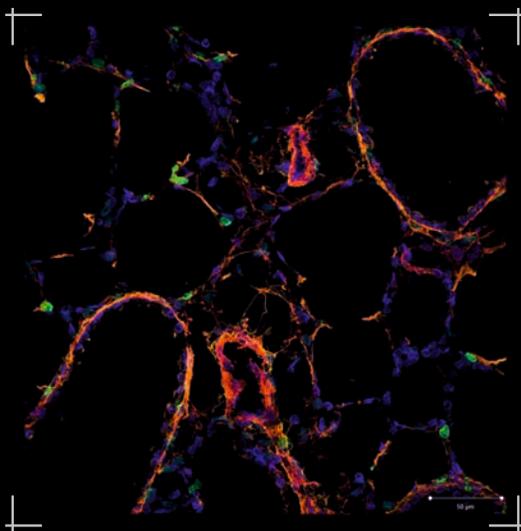


Die Rolle von Lungenfibroblasten bei der Alveolarisierung

FRIEDERIKE KLEIN



INAUGURALDISSERTATION im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erlangung
des Grades **Doktor der Naturwissenschaften** - Dr. rer. nat. -



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Untersuchungen zur Rolle von Lungenfibroblasten bei der Alveolarisierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche (Fachbereich 08 Biologie und Chemie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Friederike Klein

aus Gießen

Gießen 2013

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. Holger Zorn
Institut für Lebensmittelchemie, FB 08
Justus-Liebig Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Erstgutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Annegret Wilde
Institut für Mikro- und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. med. Werner Seeger
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Lungenzentrum der Universität Gießen (UGMLC)

Tag der Disputation: 17.01.2014

Akademiker sind eben doch wohl überschätzt..... (Loriot)

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs *International Max Planck Research School for Heart and Lung Research (IMPRS-HLR)* am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim in der Zeit von Juni 2009 bis Juli 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Annegret Wilde angefertigt. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. med. Werner Seeger bereitgestellt, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Aufbau der Lunge	8
1.2	Entwicklung der Lunge.....	9
1.2.1	Alveolarisierung.....	11
1.3	Platelet derived growth factors (PDGFs) und PDGF-A/PDGF Rezeptor α <i>Signalling</i>	13
1.3.1	Die Rolle von PDGF-A/PDGFR α in der Alveolarisierung	13
1.4	Lipo- und Myofibroblastendifferenzierung	14
1.5	Lungengerüsterkrankungen	16
1.6	Herstellung transgener Tiere mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.....	17
1.6.1	Zeit- oder ortsspezifische Cre-Expression	19
1.6.2	Das Tet-On/Tet-Off System	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Geräte	22
2.1.2	Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3	Puffer, Lösungen und sonstige Substanzen.....	25
2.1.4	PCR-Reagenzien	26
2.1.5	Primer für die Genotypisierung.....	27
2.1.6	Antikörper	28
2.1.7	Gele	30
2.1.7.1	Polyacrylamidgele.....	30
2.1.7.2	Agarosegele.....	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	31
2.2.1.1	Tamoxifen induzierbare Cre-Mauslinien	31
2.2.1.2	Doxyzyklin induzierbare Mauslinie.....	32
2.2.1.3	Reportermauslinie	33
2.2.1.4	Weitere transgene Linien	33
2.2.1.5	Tierversuchsgenehmigung	34
2.2.1.6	Tamoxifenapplikation	35
2.2.2	Zell- und Gewebeisolierung	35

2.2.2.1 Zellisolierung aus Lungenhomogenat	35
2.2.2.2 Isolierung von Lungengewebe	36
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	36
2.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.3.3 Gelelektrophorese	41
2.2.3.4 Proteinaufreinigung aus Gewebe und Konzentrationsbestimmung nach Lowry	41
2.2.3.5 Western Blot	41
2.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Gewebe	42
2.2.3.7 Histologische Färbung	43
2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS).....	44
2.2.5 Mikroskopie	44
2.2.6 Quantifizierungen.....	44
2.2.7 Statistik.....	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Charakterisierung von PDGFR α -exprimierenden Zellen	46
3.2 <i>Lineage tracing</i> der PDGFR α -exprimierenden Zellen	56
3.3 <i>Lineage tracing</i> glatter Muskelzellen/Myofibroblasten	62
3.4 <i>Lineage tracing</i> von Lipofibroblasten	66
3.5 <i>ADRP Knockout</i>	71
4 Diskussion.....	75
4.1 Transgenes Tiermodell	75
4.2 Charakterisierung PDGFR α -positiver Zellen	76
4.3 Myofibroblastendifferenzierung	79
4.4 Lipofibroblastendifferenzierung	81
4.5 <i>ADRP Knockout</i>	85
4.6 Ausblick.....	86
5 Zusammenfassung.....	88
6 Summary	89
7 Anhang I.....	90
8 Anhang II	104

8.1	Literaturverzeichnis	104
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	111
8.3	Tabellenverzeichnis	112
8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	113
8.5	Eidesstattliche Erklärung	117
8.6	Danksagung	118

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Lunge

Die Lunge ist das Atmungsorgan vieler Vertebraten, welches dem Gasaustausch zwischen Umwelt und Blut dient. Sie besitzt zwei Lungenflügel, welche sich ihrerseits in Lungenlappen unterteilen. Die menschliche Lunge besitzt links zwei und rechts drei Lungenlappen, bei der Maus sind es einer links und rechts vier¹. Die eingeatmete Luft gelangt durch den Nasen-/Rachenraum über den Kehlkopf (*Larynx*) in die Luftröhre (*Trachea*). Die Trachea verzweigt sich in die beiden Hauptbronchien, die sich vielfach in die *Bronchioli* unterteilen. Diese wiederum gehen in die *Bronchioli terminales* über, an deren Enden die Alveolen (*Alveoli pulmonales*) stehen (Abbildung 1). Diese, von der Trachea ausgehenden vielfachen Verzweigungen, bezeichnet man als Bronchialbaum. Dieser dient ausschließlich der Weiterleitung der Atemgase, hier findet kein Gasaustausch statt. An den Endaufzweigungen des Bronchialbaums befinden sich die Alveolargänge und Alveolarsäckchen (*Ductuli alveolares* und *Sacculi alveolares*), zusammen oft als *Acini* bezeichnet. Der Mensch besitzt etwa 300 Millionen Alveolen², was einer respiratorischen Oberfläche von etwa 100 m² gleichkommt. Über das dünnwandige, einschichtige Epithel der Alveolen findet der Gasaustausch statt^{3, 4}. Verzweigungen der Lungenarterie (Kapillaren) führen sauerstoffarmes Blut zu den Alveolen, Äste der Lungenvene führen das sauerstoffreiche Blut zurück zum Herzen, von wo aus es in den ganzen Körper verteilt wird. Die innere Oberfläche der Alveolen wird von einem aus Proteinen und Lipiden bestehenden Flüssigkeitsfilm (*Surfactant*) überzogen. Dieser setzt die Oberflächenspannung herab und verhindert dadurch ein Kollabieren der Alveolen³.

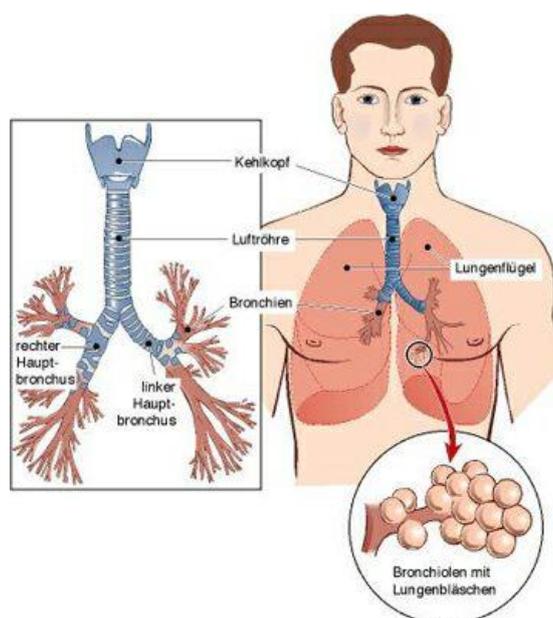


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lungenanatomie.

Die Luftröhre verzweigt sich in den rechten und linken Hauptbronchus, die sich in die *Bronchioli* bis hin zu den *Bronchioli terminales* unterteilen. Links: Vergrößerung des Bronchialbaums. Rechts: Übergang der Bronchien in das Lungengewebe (Alveolen). Quelle: Springer Medizin (<http://www.springergesundheit.de>)

Die Zelltypen des Lungenepithels unterscheiden sich zwischen proximalen und distalen Bereichen. Das proximale Epithel besteht hauptsächlich aus basalen, sekretorischen, neuroendokrinen und cilientragenden Zellen, während das distale Epithel Typ I und Typ II Pneumozyten enthält⁵.

1.2 Entwicklung der Lunge

Die Lunge der Vertebraten entsteht als eine Ausstülpung des Vorderdarms. Die Lungenentwicklung wird in drei chronologische Abschnitte unterteilt: Eine embryonale Phase, in welcher die meisten Organe angelegt werden, die eigentliche fetale Phase und eine postnatale Phase, in welcher sich die Lunge zu ihrer adulten Form entwickelt (Abbildung 2). Die fetale Phase wird weiterhin unterteilt in pseudoglanduläre, kanalikuläre und sakkuläre Phase, die postnatale Lungenentwicklung wird auch alveoläre Phase genannt.

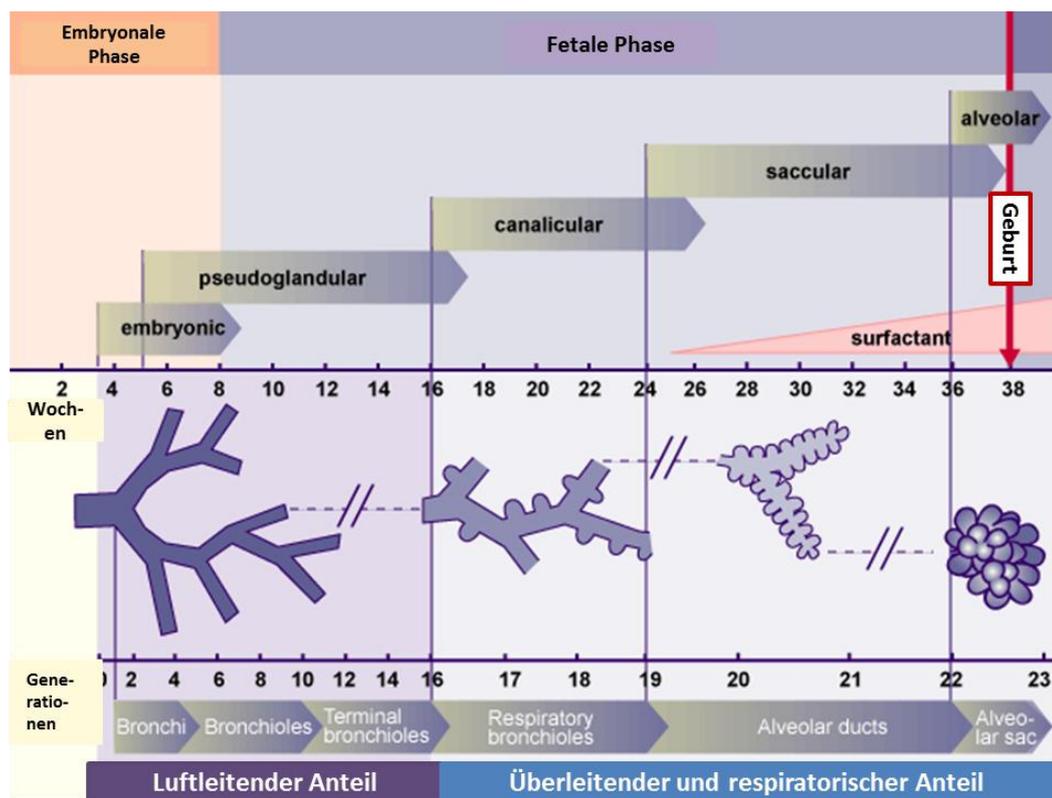


Abbildung 2: Übersicht über die vorgeburtliche Lungenentwicklung.

Die Lungenentwicklung unterteilt sich in fünf Phasen. Während der embryonalen und pseudoglandulären Phase bildet sich der konduktive Abschnitt, von der Luftröhre bis hin zu den *Bronchioli terminales*. Während der kanalikulären, sakkulären und alveolären Phase bildet sich der respiratorische Abschnitt, ausgehend von den *Bronchioli respiratorii* bis zu den Alveolen. Verändert nach <http://www.embryology.ch> ⁶.

Die embryonale Phase beginnt mit der Bildung einer Rinne im ventralen unteren Pharynx, dem *Sulcus laryngotrachealis*. Aus dem unteren Teil bildet sich wenige Tage später eine Knospe, die eigentliche Lungenanlage. In der folgenden pseudoglandulären Phase wird der gesamte luftleitende Bronchialbaum bis zu den *Bronchioli terminales* angelegt. Im respiratorischen Teil erscheinen die ersten lungenspezifischen Zellen, die Pneumozyten Typ II. Während der kanalikulären Phase sprossen die *Canaliculi* aus, die den respiratorischen Teil der Lunge, das Lungenparenchym ausmachen. Das Hauptmerkmal dieser Phase ist die Veränderung des Epithels und des umgebenden Mesenchyms. Die Kapillaren ordnen sich entlang der Lufträume an und bilden so die Grundlage zum späteren Gasaustausch. Zusätzlich vergrößert sich das Lumen der Tubuli und die Epithelzellen werden flacher. Aus den kubischen Pneumozyten Typ II entwi-

ckeln sich abgeflachte Pneumozyten Typ I. In der sakkulären Phase bilden sich Aussackungen an den terminalen Endungen des Lungenbaums. Die primären Septen zwischen den *Sacculi* sind noch dick und bestehen aus einer kapillaren Doppelschicht. Die letzte Phase der Lungenentwicklung ist die Alveolarisierung, in der die Gasaustauschfläche durch weitere Septierung der Lufträume vergrößert wird ⁷.

Tabelle 1: Phasen und Zeitpunkte der Lungenentwicklung, verändert nach Kinane 2007 ⁸

	Embryonale Phase	Pseudoglanduläre Phase	Kanalikuläre Phase	Sakkuläre/ Alveoläre Phase
Alter des Menschen	0-7 Wochen	8-18 Wochen	17-26 Wochen	>27 Wochen
Alter der Maus	9.5-14 Tage	14-16.5 Tage	16.5-17.5 tage	>17.5 Tage
Ereignisse	Bildung des Sulcus laryngotrachealis Erste Teilungsvorgänge	Bildung des luftleitenden Systems	Bildung der respiratorischen Bronchioli Verdünnung des Mesenchyms Frühe Gefäßstrukturen	Bildung der Aussackungen, der Alveolargänge und der Alveoli Vollentwickelte Kapillaren in Nachbarschaft zu Alveolen

1.2.1 Alveolarisierung

Eine funktionierende Lunge benötigt folgende morphologische Eigenschaften: Eine große Gasaustauschfläche, eine dünne Blut-Luft-Schranke, ein Surfactant-System, einen luftleitenden Bronchialbaum und Gefäße, welche die Lunge mit sauerstoffarmen Blut speisen und das mit Sauerstoff angereicherte Blut zum Herzen leiten. Die Alveolarisierung stellt in der Lungenentwicklung einen wichtigen Schritt dar⁹. Beim Menschen beginnt dieser Prozess bereits pränatal, zum Zeitpunkt der Geburt besitzt die Lunge zwischen 0 und 50 Millionen Alveolen¹⁰. Bis ins Erwachsenenalter kann sich die Gasaustauschfläche um das 20-fache vergrößern⁹. Bei Mäusen beginnt die Bildung von Alveolen zwischen dem 3.

und 5. Tag postnatal und etwa 14 Tage nach Geburt ist die Lungenstruktur mit der einer adulten Lunge vergleichbar¹¹.

Die Bildung neuer sekundärer Septen beginnt mit der Ausstülpung einer der beiden Kapillarschichten der primären Septen. An der Spitze der neuen Septen sind elastische und kollagenhaltige Fasern lokalisiert. Die zunächst leichten Erhebungen der sekundären Septen dehnen sich zügig aus und unterteilen so die größeren *Sacculi* in kleinere Einheiten, die Alveolen¹¹ (Abbildung 3).

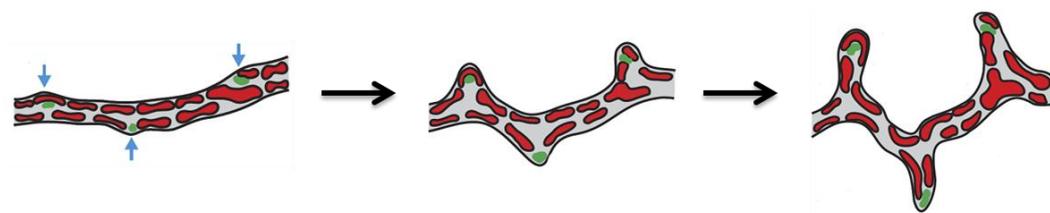


Abbildung 3: Bildung neuer Septen.

An der Stelle, an der sich das neue Septum erhebt, lagern sich Kollagenfasern und elastische Fibrillen ab (blaue Pfeile). Anschließend stülpt sich eine Schicht der kapillaren Doppelschicht aus, unterteilt den bestehenden Luftraum und bildet so eine neue Alveole. Verändert nach Schittny *et al.*¹².

Während der mikrovaskulären Reifung wird die kapillare Doppelschicht zu einer Einzelschicht reduziert. Diese Struktur scheint funktionelle Vorteile gegenüber der unreifen Form zu haben. Septen mit kapillarer Doppelschicht finden sich beispielsweise in Lungen von Amphibien und Eidechsen, welchen der letzte Reifungsschritt offensichtlich fehlt⁹. Säugetiere, welche bei Geburt ein unreifes mikrovaskuläres System besitzen, sind meist Nesthocker, während Nestflüchter mit reifen Septen geboren werden¹³.

Die Reduzierung der beiden Kapillarschichten zu einer einzelnen, geschieht vermutlich durch Verschmelzung beider Schichten, kombiniert mit einer Ausdehnung dieser Bereiche durch bevorzugtes Wachstum. So können große Bereiche des Lungenparenchyms innerhalb kürzester Zeit in eine reife Form übergehen⁹.

1.3 Platelet derived growth factors (PDGFs) und PDGF-A/PDGF Receptor α Signalling

Die Familie der *platelet derived growth factors* (PDGFs) besteht aus den Liganden A, B, C und D und den Rezeptor-Tyrosinkinasen α und β . Alle vier Liganden bilden Dimere, A und B sind in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden (AA, AB oder BB), während C und D nur als Homodimere existieren. PDGF-A bindet und agiert nur über den *platelet derived growth factor receptor α* (PDGFR α), -B und -C über PDGFR α und β , -D ausschließlich über PDGFR β ¹⁴.

PDGFs wirken als Mitogene auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen und verschiedene andere Zelltypen. Ihre Aktivierung stimuliert Zellwachstum, bewirkt aber auch Veränderungen in Form und Beweglichkeit der Zellen. Außerdem bedingen sie einen Umbau des Aktinfilamentsystems und stimulieren die Chemotaxis. PDGFs und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, wie z. B. bei der Gastrulation¹⁵, der kardiovaskulären Entwicklung^{16,17} und bei der Entwicklung der Nierenglomeruli^{18, 19}. Die Synthese der PDGFs kann durch externe Stimuli erhöht werden, wie beispielsweise niedriger Sauerstoffpartialdruck²⁰, Thrombin²¹ oder die Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen. Eine vermehrte Expression kann durch erhöhte Zellproliferation zu Atherosklerose und Fibrose führen²².

1.3.1 Die Rolle von PDGF-A/PDGFR α in der Alveolarisierung

Obwohl der Mechanismus, welcher die Formierung neuer Septen reguliert, bislang nicht komplett entschlüsselt ist, ist doch bekannt, dass Wechselwirkungen verschiedener Wachstumsfaktoren, einschließlich *hepatocyte growth factors* (HGFs)²³, *fibroblast growth factors* (FGFs)²⁴⁻²⁶, *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) und *platelet derived growth factors* (PDGFs)^{13, 27} eine wichtige Rolle spielen.

In der Lunge ist PDGF-A für die Proliferation und die distale Verteilung von PDGFR α -positiven Zellen¹³ notwendig. Ein Fehlen dieses Liganden verhindert die Differenzierung von alveolären Myofibroblasten und hemmt die sekundäre Septierung²⁷. Das gezielte Ausschalten von PDGFR α und damit aller Signalwe-

ge, die über diesen Rezeptor laufen (durch Bindung der Wachstumsfaktoren PDGF-A, -B und -C), führt zu vermindertem Lungenwachstum, jedoch nicht zu Einschränkungen der frühen Teilungsvorgänge. Die Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand scheinen vielmehr wichtig für die Proliferation oder das Überleben spezifischer PDGFR α -positiver Stammzellen zu sein, welche später zu alveolären glatten Muskelzellen (Myofibroblasten) werden²⁸. Diese essentielle Rolle der PDGF-Signalwege während der Alveolarisierung konnte durch andere Arbeiten bestätigt werden. Lau *et al.* zeigten, dass eine Inhibierung der PDGF-Signalwege zu einem frühen Zeitpunkt der Alveolarisierung dauerhafte Veränderungen in der Lungenarchitektur zur Folge hatte²⁹.

Die Verteilung PDGFR α -exprimierender Fibroblasten verschiebt sich zwischen den postnatalen Tagen 4 und 8 von der Basis zum ringförmigen Eingang der Alveolen. Dort akkumulieren diese Zellen α -smooth muscle actin (α SMA) noch bevor sich elastische Fasern bilden. Dadurch wird die Stabilität der Alveolen während der Atmung gewährleistet³⁰. Ab Tag 12 nach der Geburt nehmen die PDGFR α -positiven Zellen ab, was auf eine Zunahme der Apoptose und einen Rückgang an Proliferation zurückzuführen ist. Dadurch werden die Septen zwischen den Alveolen dünner, die kapillare Doppelschicht kann zu einer Einzelschicht verschmelzen³¹.

1.4 Lipo- und Myofibroblastendifferenzierung

In der sich entwickelnden Lunge sind zwei verschiedene Populationen interstitieller Fibroblasten bekannt, Lipo- und Myofibroblasten³². Interstitielle Myofibroblasten charakterisiert der Besitz von kontraktile Bestandteilen³³, sie exprimieren α SMA^{32, 34} und sind nicht mehr nachweisbar, wenn die Alveolarisierung abgeschlossen ist³⁵. Sie sind auf die Spitzen der sekundären Septen begrenzt und lagern dort Elastin ab^{36, 37}. Lipofibroblasten sind im Alveolarraum an der Basis der sekundären Septen³⁰ lokalisiert und werden durch den Besitz von zytoplasmatischen Lipideinlagerungen von anderen Fibroblasten unterschieden³⁶. Während der Alveolarentwicklung wirken sie bei der Kollagen- und Elastinsynthese mit und unterstützen Typ II Pneumozyten bei der Surfactantproduktion³⁸. Die Lipide bestehen zu 65 % aus Triglyceriden, zu 14 %

aus Cholesterolestern, zu 7% aus freien Fettsäuren und Cholesterol und zu 14 % aus Phospholipiden³⁸. Insgesamt ist wenig bekannt über die Proteine, welche sich auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen befinden. Als erstes wurde *Adipocyte differentiation-related protein* (ADRP) identifiziert, welches in der frühen Adipozytendifferenzierung exprimiert wird³⁹. Die Menge an ADRP-mRNA ist in adulten Mauslungen, nach Fettgewebe, am zweithöchsten⁴⁰. In humanem Gewebe wurde ADRP ebenfalls identifiziert und wird als Adipophilin bezeichnet⁴¹. Ausgelöst durch zyklische Dehnung wie bei der normalen Atmung wird *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) von Typ II Pneumozyten sekretiert. Dieses bindet an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Lipofibroblasten, wodurch der cAMP-abhängige, Protein Kinase A (PKA)-vermittelte lipogene Signalweg aktiviert wird. Dies führt zu einer Hochregulierung von *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) und dem nachgeschalteten ADRP, welches die Aufnahme von Triglyceriden durch die Lipofibroblasten ermöglicht⁴². Außerdem wird Leptin von den Lipofibroblasten abgegeben, was die *Surfactant*- und Proteinsynthese durch Typ II Pneumozyten stimuliert⁴³. Die von den Lipofibroblasten aufgenommenen Triglyceride werden dann an die Typ II Pneumozyten transferiert, wo sie als Substrat zur Surfactantsynthese dienen⁴⁴. Infektionen⁴⁵ oder Nikotin⁴⁶ können dieses Gleichgewicht stören, indem die PPAR γ Expression gestoppt wird, was zur Transdifferenzierung von Lipo- zu Myofibroblasten führt. Myofibroblasten sind der charakteristische Zelltyp der Lungenfibrose und im Gegensatz zu Lipofibroblasten nicht in der Lage das Zellwachstum und die Differenzierung von Typ II Pneumozyten zu unterstützen⁴⁷.

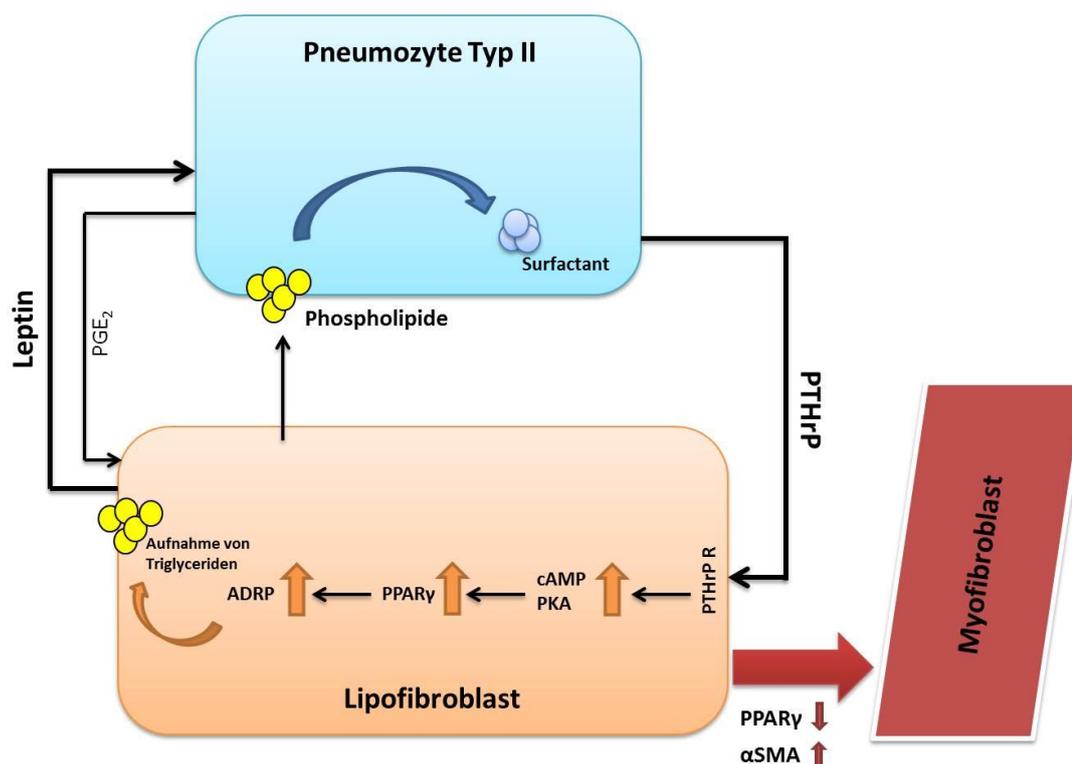


Abbildung 4: Alveoläre Homöostase.

Alveoläre Typ II Zellen sekretieren Prostaglandin E₂ (PGE₂) und *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), welches an seinen Rezeptor am Lipofibroblasten bindet. Dadurch wird der cAMP-abhängige PKA-vermittelte lipogene Signalweg aktiviert, was zu einer Hochregulierung von PPAR γ und dem nachgeschalteten Gen ADRP führt. Dies führt zur vermehrten Aufnahme von Triglyceriden durch die Lipofibroblasten und einer Ausschüttung von Leptin, wodurch die Typ II Zellen zur Phospholipidaufnahme und Surfactantproduktion stimuliert werden. Modifiziert nach Rehan und Torday⁴⁸

1.5 Lungengerüsterkrankungen

Zwei Beschaffenheiten der Alveolarstruktur ermöglichen einen effizienten Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid: Zum einen ihre enorme Anzahl und feine Struktur und zum anderen eine dünne Blut-Luft Schranke.

Jegliche Störung dieser beiden wichtigen Aspekte hat einen verheerenden Einfluss auf den Gasaustausch und damit auf das Überleben des betroffenen Patienten.

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), einhergehend mit Emphysembildung, wird im Jahr 2020 erwartungsgemäß die dritthäufigste Todesursache der westlichen Welt sein⁴⁹. Sie zeichnet sich neben einer chronischen Bronchitis auch durch den Verlust der Alveolarsepten aus, wodurch die Gasaus-

tauschfläche drastisch reduziert wird⁵⁰. COPD/Emphysem wird verstärkt als eine systemische Erkrankung angesehen, einschließlich Osteoporose, Fehlfunktionen des Zwerchfells und systemischer Inflammation⁵¹.

An idiopathischer pulmonalen Fibrose (IPF) leiden etwa 500.000 Menschen in der westlichen Welt^{52, 53}. IPF zeichnet sich durch eine Beschädigung des Alveolarepithels, alveoläre Entzündungsreaktionen und eine starke Proliferation von Fibroblasten aus, wodurch die Gefäße und Kapillaren verloren gehen und die Lungenstruktur beschädigt wird. Eine verstärkte Bildung von Bindegewebe zwischen den Alveolen und den Blutgefäßen erschwert den Gasaustausch^{54, 55}. Die Überlebenszeit nach Diagnose beträgt etwa 2-3 Jahre⁵⁶, die einzige Behandlungsmöglichkeit liegt, wie auch bei COPD, in der Lungentransplantation.

Um regenerative oder gewebeprotective therapeutische Therapieansätze entwickeln zu können, ist es essenziell, die Regulation der Lungengewebshomöostase und die Bildung neuer Septen zu verstehen.

1.6 Herstellung transgener Tiere mit Hilfe des Cre/loxP-Systems

Transgene Tiere sind Organismen, deren Erbanlage gezielt verändert wurde. Dabei können fremde Gene zusätzlich eingeschleust werden (*Knock-in*) oder vorhandene Gene durch funktionslose Varianten ersetzt werden (*Knock-out*). Die Veränderung der Genanlage kann dazu führen, dass das transgene Tier einen anderen Phänotyp erhält. Anhand der Veränderungen können Rückschlüsse auf die Wirkweise der ausgeschalteten oder eingeschleusten Gene gezogen werden. Da das Mausgenom mit dem menschlichen Genom relativ große Übereinstimmungen besitzt und Mäuse eine kurze Generationszeit haben, eignen sie sich gut für gentechnische Studien. Die Herstellung transgener Tiere, insbesondere transgener Mäuse, hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer äußerst effizienten Methode der medizinisch-molekularbiologischen Grundlagenforschung entwickelt.

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem wurde in den 1980er Jahren von DuPont entdeckt und für die molekulargenetische Manipulation genutzt. Das Enzym Cre-Rekombinase stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1⁵⁷, analog

arbeitet die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁸. Die Cre-Rekombinase ist in der Lage, DNA-Abschnitte, die von sogenannten loxP-Sequenzen flankiert werden, herauszuschneiden und die verbleibende DNA wieder zu verknüpfen⁵⁹. LoxP-Stellen sind 34 Basenpaar (bp) große Sequenzen, bestehend aus einer 8 bp großen Kernsequenz, an der die Rekombination stattfindet, flankiert von jeweils 13 bp großen invertierten Wiederholungssequenzen. Die Orientierung und Lokalisation der loxP-Stellen bestimmen, ob die Cre-Rekombinase eine Deletion, Inversion oder chromosomale Translokation verursacht⁶⁰. Die meisten Cre/loxP-Mauslinien werden allerdings so designt, dass sie ein Herausschneiden von DNA bewirken. Normalerweise werden Cre- und loxP-Linien separat entwickelt und erst dann miteinander verpaart, um eine Cre/loxP-Linie zu kreieren⁶⁰ (Abbildung 5).

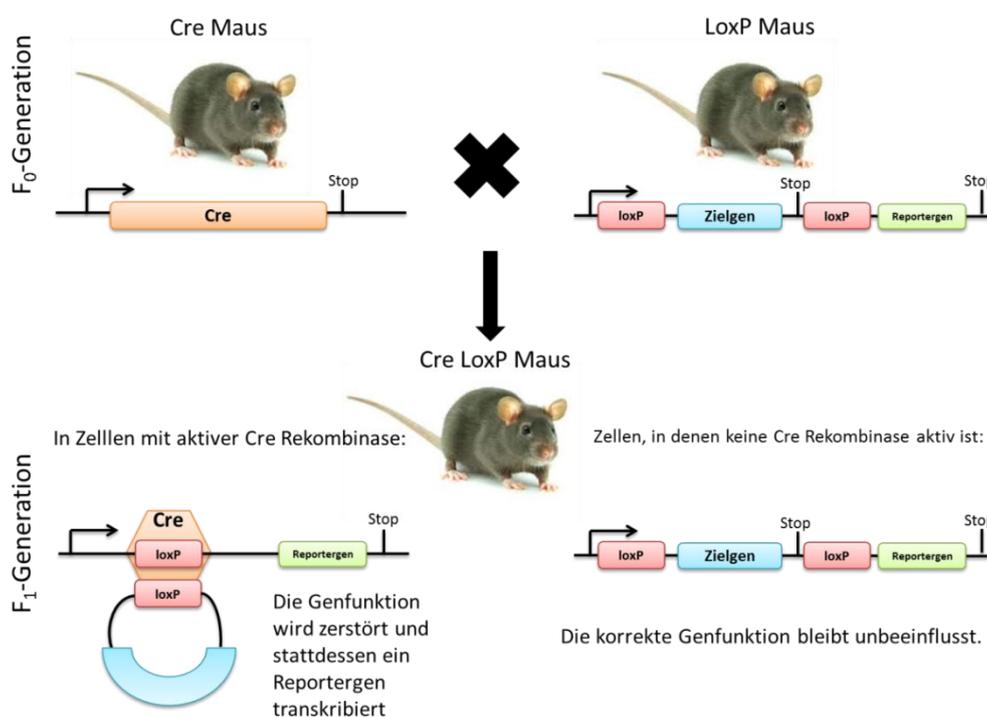


Abbildung 5: Das Cre/LoxP System

Die Cre-Rekombinase wird mit einem ubiquitären oder spezifischen Promotor als zusammenhängendes Transgen in das Mausgenom eingebracht. Die zweite Mauslinie besitzt ein von loxP-Stellen flankiertes Zielgen. Zusätzlich kann auch ein Reporter-Gen hinter die zweite loxP-Stelle gesetzt werden. Bei Nachkommen, welche beide genetischen Veränderungen in ihrem Erbgut tragen, bindet die Cre-Rekombinase an die loxP-Stellen und schneidet die zwischenliegende DNA-Sequenz aus.

1.6.1 Zeit- oder ortsspezifische Cre-Expression

Um ein gewebe- oder zellspezifisches *Knockout* bzw. eine Fluoreszenzmarkierung zu erreichen, wird ein Konstrukt erstellt, bei welchem die Cre-Rekombinase hinter einen zelltyp-spezifischen Promotor kloniert wird. Dieses Transgen wird dann in das Mausgenom eingebracht.

Verpaart man diese Maus mit einer anderen Linie, bei der das Zielgen von loxP-Stellen flankiert ist, erhält man ein *Knockout* in dem Gewebe, welches vorher mittels Promotor gewählt wurde.

Bei der konstitutiven Cre-Expression wird die Cre-Rekombinase immer dann gebildet, wenn auch der Promotor, hinter den sie gesetzt wird, aktiv ist. Viele Promotoren werden allerdings schon früh in der Embryonalentwicklung angeschaltet, wodurch das Zielgen bei einem *Knockout* schon früh ausgeschaltet wird. Dies kann je nach Gen zu erhöhter Lethalität führen.

Deshalb wurde eine Methode entwickelt, bei der die Cre-Rekombinase zeitlich steuerbar exprimiert wird⁶¹. Dabei wird die Cre-Rekombinase mit einer veränderten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, welche, statt körpereigenen Östrogens an synthetisches Tamoxifen, einem Antiöstrogen bindet. Ohne Bindung zum Liganden verbleiben die Rezeptoren und damit auch die Cre-Rekombinase im Zytoplasma der Zellen. Erst nach Gabe von Tamoxifen können Rezeptor und Ligand aneinander binden und in den Zellkern überführt werden. Dort erfolgt die Rekombination der loxP-flankierten Sequenzen durch die Cre-Rekombinase.

Eine andere Möglichkeit ist es, die Cre-Maus mit einer Reportermaus zu verpaaren, bei welcher durch Ausschneiden einer DNA-Sequenz ein Farbstoff (z. B. *green fluorescent protein*, GFP) exprimiert wird. Dadurch können einzelne Zelltypen oder Gewebearten gezielt markiert werden.

1.6.2 Das Tet-On/Tet-Off System

Ein ebenfalls häufig angewendetes System zum gezielten An- oder Abschalten bestimmter Gene ist das *Tet-On/Tet-Off* System. Das *Tet-Off* System wurde 1992 von Hermann Bujard und Manfred Gossen entdeckt⁶². Das *Tetrazyklin-Transaktivator-Protein* (tTA), fusioniert aus einem *Tetrazyklin-Repressor-*

Protein (TetR) aus *Escherichia coli* und der Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins aus *Herpes Simplex Virus* (HSV), ist in der Lage, an spezifische *Tet-Operator* (TetO)-Sequenzen der DNA zu binden. Diese Sequenzen sind meist in mehrfacher Wiederholung mit einem Minimal-Promoter fusioniert. Diese Einheit nennt sich *tetracyclin response element* (TRE). Bindet das tTA-Protein daran, wird die Expression der Gene strangabwärts des Promoters aktiviert. Durch die Gabe von Tetrazyklin kann die Expression der Gene unter Kontrolle des TRE gestoppt werden, indem eine Bindung von tTA an TRE-Sequenzen verhindert wird.

Das *Tet-On*-System funktioniert genau umgekehrt. Ist der *Tet-Operator* an Tetrazyklin gebunden, kann auch das tTA-Protein daran binden, was zur Transkription der nachfolgenden Gene führt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die zum Gasaustausch obligatorischen Alveolen entstehen durch Ausstülpungen der sekundären Septen, welche wiederum aus den primären Septen hervorgehen. Fibroblasten sind dabei von besonderem Interesse, da sie die extrazellulären Matrixkomponenten produzieren, welche das Gerüst zum Erhalt der alveolären Struktur bilden. Elastin ist ein wichtiger Bestandteil des strukturellen Gerüsts und Elastinfasern sind dort lokalisiert, wo neue Septen entstehen.

Lungenerkrankungen bedingen die Zerstörung der Gasaustauschareale und repräsentieren ein deutlich zunehmendes Problem der modernen Pneumologie. Um neuartige und regenerative Therapieansätze zu entwickeln, ist das Verständnis der Regulation des Lungenwachstums unabdingbar.

Alveoläre Fibroblasten sind notwendig für den Prozess der Alveolarisierung. Man nimmt an, dass sich PDGFR α -positive Vorläuferzellen in lipidhaltige Lipofibroblasten, sowie in Myofibroblasten der Alveolen differenzieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Differenzierungsprozesse der beiden Fibroblastensubtypen ausgehend von ihren potentiellen Vorläuferzellen zu untersuchen. Es sollen Antworten darauf gefunden werden, ob sie während der Alveolarisierung in Lipofibroblasten differenzieren und ob PDGFR α -positive Vorläuferzellen auch noch in der adulten Lunge existieren. Außerdem soll geklärt werden, ob

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Dako Pen Fettstift	Dako
Feinwaage	Denver Instruments
FACScalibur	BD Bioscience
Färbekammer	Roth
Heizblock	HLC
Heizschrank	Heraeus
Konfokalmikroskop	Zeiss
Kryostat	Leica/Microm
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific/Eppendorf
NanoZoomer	Hamamatsu
Neubauerzählkammer	Marienfeld
PCR Maschine	Biometra/Eppendorf
Photometer	Biorad
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab
Schüttler	Heidolph
Sezierbesteck	F.S.T. Fine Science Tools
Sterilbank	Nuaire
VersaDoc <i>Imaging System</i>	Biorad
Waage	AND
Western Blot Kammern	Biorad
Zentrifuge für Zytospin	Heraeus

2.1.2 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien

1,4 mm Precellys-Keramik-Kit	Peqlab
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 ml und 50 ml Röhrchen	Greiner bio-one
Aceton	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH
Collagenase B	Roche
DNase	SERVA
<i>DualMarker</i>	Biorad
Dulbecco's <i>Modified Eagle</i> Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline	PAA Laboratories GmbH
EDTA-Solution	Thermo Scientific
Eosin	Waldeck
Ethanol	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
FACS-Puffer	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Formaldehyd	Fluka
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich
Glycin 99 % p.A.	Roth
Haematoxilin	Waldeck
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH

Isopropanol	Roth
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
Methylbutan	Roth
Miglyol	Caesar & Loretz GmbH
Milchpulver	Roth
Mowiol	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxychololat	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nilrot	Sigma Aldrich
Nitrozellulosemembran	Pall Corporation
NP-40 Nonidet	Fluka
Objekträger	Thermo Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Petrischalen	Greiner bio-one
Polyacrylamid 30 %	Roth
Protease+Phosphatase Inhibitor Cock- tail	Thermo Scientific
Proteinase K	Roth
Protein-Assay Kit	Biorad
RIPA	Thermo Scientific
Saccharose	Sigma Aldrich

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity	Thermo Scientific
Tamoxifen	Sigma Aldrich
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich
X-Gal	Gibco
Zellsieb	BD Biosciences
Ziegenserum	PAA Laboratories GmbH

2.1.3 Puffer, Lösungen und sonstige Substanzen

10x PBS	Kaliumhydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid
10x TAE	0,4 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,2 M Essigsäure
1x Transferpuffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % v/v Methanol
Histopuffer	3 % BSA/PBS, 0,2 % Triton X 100

Laufpuffer	Tris, Glycin, 10 % SDS, Wasser pH 8,3
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS
PBS/T	1x PBS + 0,1 % Tween
T $\frac{1}{10}$ E	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA

2.1.4 PCR-Reagenzien

10x PCR Gold Puffer	Roche
Ampli Taq Gold DNA Polymerase	Roche
dNTP Mix 5x	Fermentas
<i>GeneRuler</i> 100bp DNA Ladder	Fermentas
<i>Immomix red</i>	Bioline
MgCl ₂ Lösung	Roche
Multiplex PCR Plus Kit (100)	QIAGEN

2.1.5 Primer für die Genotypisierung

Tabelle 2: Sequenzen der für die Genotypisierung der transgenen Tiere verwendeten Primer.

Transgen	Sequenz (5'→3')
ADRP ^{flox} (Plin2)	Adrp_for: GACAGTGTGAGGTTTGCTGTTTGG Adrp_rev: TTTTGGCCAGCACTGATTATCTGTC Adrp_reverse: TGAAGTATGATGGCGAGCTCAGACC
ADRP ^{CreERT2}	Adrp_taa_ki_s: AGCGCCTTCGGATCCACCTCT Adrp_taa_wt_as: TGCTCTGGTGACAAGGAGGGGT Adrp_taa_mCh_as: CTCGTGGCCGTTACGGAGC Adrp_taa_hERLb_s: TGCCCCTCTATGACCTGCTGCT
flp-deleter	flp gt_s: GTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGCCCAAG flp gt_as: CGCTAAAGAAGTATATGTGCCTACTAACGC
mT/mG	WT_for: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT WT_rev: CGAGGCGGATCACAAGCAATA Mut_rev: TCAATGGGCGGGGGTCGTT
PDGFR α ^{Cre}	Cre_for: TGCCACGACCAAGTGACAGCAATG Cre_rev: AGAGACGGAAATCCATCGCTCG
PDGFR α ^{CreERT2}	Cre up: CAGGTCTCAGGAGCTATGTCCAATTTACTGACC Cre low: GGTGTTATAACGAATCCCCAGAA
PDGFR α ^{GFP}	WT_for: CCCTTGTTGGTCATGCCAAAC WT_rev: GCTTTTGCCTCCATTACACTGG Mut_rev: ACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAC
SMMHC ^{CreERT2}	SMWT1: TGACCCCATCTCTTCACTCC SMWT2: AACTCCACGACCACCTCATC phCREAS1: AGTCCCTCACATCCTCAGGTT

2.1.6 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Western Blot (WB).

Primärantikörper	Verdünnung (Verwendungszweck)	Spezies	Firma
ADRP	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Kaninchen	Abcam
CD44	1:50 (IF)	Kaninchen	Abcam
CD45	1:100 (IF)	Ratte	BD Pharmigen
CD105	1:50 (IF)	Ratte	Abcam
Kollagen Typ I	1:70 (IF)	Kaninchen	Meridian Life Science
Zytokeratin	1:300 (IF)	Kaninchen	Dako
GFP-FITC-gekoppelt	1:300 (IF)	Ziege	Novus Biologicals
IgG Kaninchen	entsprechend des Primärantikörpers	Kaninchen	Cell signaling
IgG Maus	entsprechend des Primärantikörpers	Maus	Sigma Aldrich
IgG Ratte	entsprechend des Primärantikörpers	Ratte	BD Pharmigen
PDGFR α	1:100 (IF)	Ratte	Abcam
PECAM (CD31)	1:200 (IF)	Ratte	BD Pharmigen
Phospho-Histon-H3 Mitose Marker	1:100 (IF)	Kaninchen	Millipore
proSPC	1:800 (WB)	Kaninchen	Millipore
Vimentin-Cy3-gekoppelt	1:500 (IF)	Maus	Sigma Aldrich
α -Smooth muscle	1:500 (IF)	Maus	Sigma

actin-Cy3-gekoppelt			Aldrich
α -Smooth muscle actin	1:500 (IF)	Maus	Sigma Aldrich
β -Aktin	1:5000 (WB)	Maus	Sigma Aldrich
Sekundärantikörper			
Alexa Fluor® 555 (Kaninchen)	1:500 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor® 555 (Ratte)	1:500 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor® 647 (Kaninchen)	1:500 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor® 647 (Ratte)	1:500 (IF)	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor® 680 (Maus)	1:500 (IF)	Ziege	Invitrogen
POD Kaninchen	1:3000 (WB)	Ziege	Millipore Chemicon
Kernfarbstoffe			
Sytox blue	1:500 (IF)		Invitrogen
Topro 3	1:1000 (IF)		Invitrogen

2.1.7 Gele

2.1.7.1 Polyacrylamidgele

Tabelle 4: Herstellung von Polyacrylamid-Trenngelen

Konzentration	dH ₂ O	30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Tris- Puffer, 1,5 M, pH 8,8	10 % SDS	10 % APS	TEMED
8 %	9,3 ml	5,3 ml	5,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,012 ml
10 %	7,9 ml	6,7 ml	5,0 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,008 ml

Tabelle 5: Herstellung eines Polyacrylamid-Sammelgels

Konzentration	dH ₂ O	30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Tris- Puffer, 1,5 M, pH 8,8	10 % SDS	10 % APS	TEMED
5 %	2,7 ml	0,67 ml	0,5 ml	0,04 ml	0,04 ml	0,004 ml

2.1.7.2 Agarosegele

Tabelle 6: Herstellung eines Agarose-Gels

Gel	Substanz	Menge
Agarose-Gel 1 %	Agarose	1,5 g
	TAE-Puffer	150 ml
	Ethidiumbromid 1%	3 µl

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit gleichen Zyklen von 12 Stunden Licht sowie Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.2.1.1 Tamoxifen induzierbare Cre-Mauslinien

Ap2Cre^{ERT2}:

Diese Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nach Applikation von Tamoxifen (intraperitoneal oder oral) nur in Adipozyten, bzw. in Zellen, welche *fatty acid binding protein 4* (FABP 4) exprimieren. FABP 4 oder *adipocyte protein* (AP 2) ist ein zytosolisches Lipidchaperon und ist an der Regulierung von ER- (Endoplasmatisches Retikulum) Stress in Makrophagen beteiligt. Diese Mauslinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun (MPI Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt.

PDGFR α ^{CreERT2}:

Diese Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nach Applikation von Tamoxifen nur in Zellen, in denen der Promotor des Plättchen-Wachstumsfaktorrezeptor alpha (PDGFR α) aktiv ist⁶³. Diese interstitiellen Zellen dienen in der Lunge als Fibroblastenverläufer und sind bislang nicht vollständig charakterisiert. Der *Knockout* dieses Rezeptors führt zur Blockade der weiteren Differenzierung dieser Vorläuferzellen und zu einer Verhinderung des postnatalen Lungenwachstums²⁷. Diese Mauslinie wurde exklusiv für die durchgeführten Untersuchungen von Prof. Dr. William Richardson (UC London) zur Verfügung gestellt.

SMMHC^{CreERT2}:

Diese Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase nach Applikation von Tamoxifen in glatten Muskelzellen unter dem *smooth muscle myosin heavy chain* (SMMHC) Promoter⁶⁴. Sie wird zur Identifizierung/Kennzeichnung von Myofibroblasten der Lunge genutzt, welche ebenfalls SMMHC exprimieren. Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Offermanns (MPI Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt.

ADRP^{CreERT2/mCherry}.

Bei dieser Mauslinie wurde das Transgen über fusionierte homologe Bereiche in den endogenen *Locus* des ADRP (*adipocyte differentiation related protein*) Gens integriert. ADRP definiert einen speziellen Fibroblastensubtyp, der lipidhaltig ist (Lipofibroblast) und eine wichtige, aber im Detail unbekannt Rolle beim Lungenwachstum einnimmt. Die exogenen Komponenten des Konstrukts sind Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreERT2) sowie rote Fluoreszenz (mCherry). Diese Komponenten wurden am Ende des endogenen Gens eingefügt und durch „Lesebrücken“ (T2A-Segmente) verbunden. Dadurch wurde das ursprüngliche Gen nicht zerstört und blieb auch bei homozygoter Zucht voll funktionsfähig. Die zur Selektion der ES-Zell-Klone benötigte Neomycin-Kassette wurde später durch Verpaarung mit einer *flip-deleter* Maus entfernt.

Diese Mauslinie wurde im Zuchtbetrieb von Prof. Dr. T. Braun (MPI Bad Nauheim) von Dr. Marten Szibor und Isabelle Salwig für diese Arbeit neu generiert. Genkarten und Southern Blot-Analysen befinden sich im Anhang unter Abbildung 26 und 27.

2.2.1.2 Doxyzyklin induzierbare Mauslinie**ADRP^{tTA/YFP}.**

Bei dieser Linie wurde das Transgen über fusionierte homologe Bereiche in den endogenen *Locus* des ADRP Gens integriert. Dieses Transgen trägt im Exon 8 die kodierende Sequenz für einen gelben Fluoreszenzfarbstoff (*yellow fluorescent protein*, YFP) und außerdem das durch Doxyzyklin in seiner Transkriptionsaktivierung steuerbare Tetracyklin-Transaktivator-Protein (tTA). Vor und hinter der YFP-Kassette befinden sich T2A-Sequenzen, die eine getrennte Expression des Fluoreszenzfarbstoffs und des tTA auf Proteinebene garantieren. Die zur Selektion der Klone benötigte Neomycin-Kassette kann durch Verpaarung mit einer *flip-deleter* Maus entfernt werden.

Diese Mauslinie wurde im Zuchtbetrieb von Prof. Dr. T. Braun (MPI Bad Nauheim) von Dr. Marten Szibor und Isabelle Salwig für diese Arbeit neu generiert. Genkarten und Southern Blot-Analysen befinden sich im Anhang unter Abbildung 26 und 27.

2.2.1.3 Reportermauslinie

Gt(ROSA)26Sor^{tm4}(ACTB-tdTomato,-EGFP)^{Luo}/J (mT/mG):

Diese Linie exprimiert das rote *in vivo* Fluorochrom *mTomato* in allen Zellmembranen, nach Expression der Cre-Rekombinase wechselt dieses Fluorochrom zu einem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Dies ermöglicht die genaue mikroskopische Abgrenzung einzelner Zellen und somit die Identifizierung der Zelltypen in komplexen Gewebestrukturen. Diese Mäuse tragen eine loxP-flankierte tdTomato (mT)-Kassette gefolgt von einer GFP-Kassette im *Rosa26* Genlocus. Nach der Kreuzung dieser Linie mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie, wird bei den doppelt transgenen Nachkommen in Cre-Rekombinase exprimierenden Geweben die mT-Kassette deletiert, wodurch eine Expression der nachgelagerten „membranständigen GFP“ (mG)-Kassette ermöglicht wird. Der ACTB-Promoter dieser Linie gewährleistet eine stärkere und längerwährende Expression des fluoreszierenden Proteins (besonders in adulten Zellen) verglichen mit dem endogenen *Gt(Rosa)-Locus* allein. Dieses Doppel-fluoreszenzsystem ermöglicht eine Echtzeitvisualisierung von rekombinanten als auch nicht-rekombinanten Zellen. Es eignet sich zur internen Kontrolle bei phänotypischen Analysen bei Cre-Rekombinase-induzierten Mosaikmutanten und bietet zwei Möglichkeiten der Markierung bei Zelldifferenzierungsstudien. Durch die Lokalisierung des fluoreszierenden Proteins in der Zellmembran können Aussagen über die Zellmorphologie getroffen, sowie zelluläre Prozesse besser analysiert werden. mT/mG-Mäuse können als Cre-Reporterstamm genutzt werden. Hierbei kann eine rote Fluoreszenz vor und eine grüne Fluoreszenz nach der Cre-Rekombinase induzierten Rekombination in vielen Geweben und Zelltypen detektiert werden⁶⁵. Diese Mauslinie stammt aus dem Zuchtbetrieb *The Jackson Laboratory*, USA.

2.2.1.4 Weitere transgene Linien

ADRPflox (*Plin2*):

Diese Mauslinie wurde aus ES-Zellen (EUCOMM) im Zuchtbetrieb von Prof. Dr. Thomas Braun hergestellt. Sie exprimiert unter dem endogenen ADRP-Promotor ein Konstrukt, bestehend aus einer von FRT-Stellen flankierten Neomycin/ β -Galaktosidase-Kassette und einem von loxP-Stellen flankierten Exon (Exon 4). Durch die Insertion der Neomycin/ β -Galaktosidase-Kassette ist das Gen bereits funktionslos, befindet sich die Kassette also auf beiden Allelen, entspricht dies einem

2.2.1.6 Tamoxifenapplikation

Tamoxifen wurde als Stocklösung in den Konzentrationen 20 mg/ml (für adulte Mäuse) und 16 mg/ml (für postnatale Mäuse) in Miglyol gelöst. Adulten Mäusen wurden 50 µl (1 mg/Tier) und postnatalen Mäusen 25 µl (0,4 mg/Tier) der jeweiligen Stocklösung intraperitoneal für 1-3 Tage gespritzt.

Nach der Injektion standen die Tiere unter regelmäßiger Beobachtung durch die Tierpfleger.

2.2.2 Zell- und Gewebeisolierung

2.2.2.1 Zellisolierung aus Lungenhomogenat

Zur Entnahme der Lungen wurden die Mäuse bis Tag P5 durch rasche Dekapitation mit einer Schere getötet. Tiere ab einem Alter von 7 Tagen wurden mit einer Dosierung von > 5 % des Inhalationsnarkotikums Isofluran bis zum Erreichen der Schnappatmung und Durchtrennung der abdominalen *Vena cava inferior* getötet. Danach wurde die Lunge über die rechte Herzkammer mit 1x PBS gespült, um sie von überschüssigem Blut zu befreien. Die Lungen wurden entnommen und mit Hilfe eines Skalpell in einer Petrischale homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebe für zweimal 20 Minuten (Min) bei 37 °C verdaut (Verdaulösung: 9 ml DMEM, 1 ml Trypsin, 100 µl DNase, 500 µl Collagenase B), dazwischen wurde mehrfach resuspendiert. Nach dem Verdau wurde die Reaktion mit 1 ml FCS abgestoppt. Um die Zellen zu vereinzeln und von unverdaulichem Gewebe zu befreien, wurde die Suspension durch ein 40 µm Zellsieb gefiltert. Die Zellsuspension wurde 5 Min bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend in 1-2 ml PBS resuspendiert. Zellen, welche aus der PDGFR α ^{GFP}-Maus isoliert wurden, konnten in diesem frischen Zustand für Zytospin verwendet werden. Dagegen mussten Zellen aus mT/mG-Mäusen zusätzlich fixiert werden, um das membrangebundene GFP-Signal zu erhalten. Dazu wurden die Zellen erneut für 5 Min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 % PFA in PBS für 20 Min auf Eis aufgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS konnten die Zellen bis zur weiteren Verwendung in PBS im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.2.2 Isolierung von Lungengewebe

Das Töten der Mäuse und das Spülen der Lunge erfolgten wie in 2.2.2.1. beschrieben. Danach wurde die *Trachea* freipräpariert und mit einem lockeren Knoten aus Bindfaden umschlungen. Oberhalb des Knotens wurde ein kleines Loch in die *Trachea* geschnitten, durch das eine Kanüle eingeführt wurde. Durch eine Spritze wurde die Lunge anschließend entweder mit 50 % Tissue Tek/PBS (PDGFR α ^{GFP}) oder mit 1 % PFA in PBS (mT/mG) aufgebläht. Nach raschem Entfernen der Kanüle wurde die *Trachea* mit dem Bindfaden zugeknotet und die Lunge vorsichtig aus dem *Thorax* präpariert. Lungen, welche mit 50 % Tissue Tek/PBS fixiert wurden, konnten direkt in das Einbettmedium überführt werden. Die Lungen, welche mit PFA fixiert wurden, wurden über Nacht in 1 % PFA gelagert und erst nach weiteren 24 Stunden in 20 % Saccharose in Tissue Tek eingebettet. Zum schnellen Gefrieren wurde Methylbutan auf Trockeneis verwendet. Anschließend wurde das Gewebe bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Um den Genotyp transgener Mäuse bestimmen zu können, muss die DNA aus einem Stück Gewebe isoliert werden. In den meisten Fällen wird dazu ein kleiner Teil vom Schwanz abgeschnitten.

Dieser wurde über Nacht in 500 μl Lysepuffer plus 5 μl Proteinase K aufgelöst. Am nächsten Tag wurde das Lysat für 10 Min bei 130000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Überstand wurde mit 500 μl Isopropanol gemischt, um die DNA zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation (10 Min, 13000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für ca. 30 Min bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 50 μl T $\frac{1}{10}$ E aufgenommen.

2.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erfolgte für das jeweilige Transgen über folgende Schritte:

ADRPflox (Plin2):

Schritt	Zeit
1. Denaturierung 95 °C	3 Min
2. Denaturierung 95 °C	30 Sek
3. Primeranlagerung 62 °C	30 Sek
4. Elongation 72 °C	30 Sek
5. Final-Elongation 72 °C	3 Min
6. Pause 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 35 Wiederholungen

Produktgröße: Wildtyp: 358 Basenpaare (bp), Mutante: 304 bp; Polymerase:
Immunmix red

ADRP^{CreERT2}:

Schritt	Zeit
1. 95 °C	3 Min
2. 95 °C	20 Sek
3. 56 °C	30 Sek
4. 72 °C	35 Sek
5. 72 °C	7 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 40 Wiederholungen

Produktgröße: Wildtyp: 441 bp, 3': 315 bp, 5': 584 bp; Polymerase: *Ampli Taq Gold*
DNA Polymerase

flp-deleter:

Schritt	Zeit
1. 95 °C	3 Min
2. 95 °C	20 Sek
3. 61 °C	40 Sek
4. 72 °C	60 Sek
5. 72 °C	10 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 40 Wiederholungen

Produktgröße: 741 bp; Polymerase: *Immunmix red*

mT/mG:

Schritt	Zeit
1. 95 °C	15 Min
2. 94 °C	30 Sek
3. 61 °C	1 Min
4. 72 °C	1 Min
5. 72 °C	2 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 35 Wiederholungen

Produktgröße: Wildtyp: 330 bp, Mutante: 250 bp; Polymerase: *Immunmix red*

PDGFR α ^{Cre}:

Schritt	Zeit
1. 94 °C	2 Min
2. 94 °C	30 Sek
3. 56 °C	30 Sek
4. 72 °C	1,5 Min
5. 72 °C	5 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 35 Wiederholungen

Produktgröße: 374 bp; Polymerase: Ampli Taq Gold DNA Polymerase

PDGFR α ^{CreERT2}:

Schritt	Zeit
1. 94 °C	10 Min
2. 94 °C	30 Sek
3. 61 °C	45 Sek
4. 72 °C	1 Min
5. 72 °C	10 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 40 Wiederholungen

Produktgröße: 500 bp; Polymerase: *Immumix red*

PDGFR α ^{GFP}:

Schritt	Zeit
1. 94 °C	3 Min
2. 94 °C	30 Sek
3. 65 °C	1 Min
4. 72 °C	1 Min
5. 72 °C	2 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 35 Wiederholungen

Produktgröße: Wildtyp: 451 bp, Mutante: 242 bp; Polymerase: Ampli Taq Gold DNA
Polymerase

SMMHC^{CreERT2}:

Schritt	Zeit
1. 95 °C	5 Min
2. 95 °C	45 Sek
3. 58 °C	45 Sek
4. 72 °C	2 Min
5. 72 °C	10 Min
6. 4 °C	

Zyklen: Schritt 2-4, 30 Wiederholungen

Produktgröße: Interne Positivkontrolle: 324 bp, Transgen: 287 bp; Polymerase:
Immunmix red

2.2.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Dies geschieht der Größe und Ladung nach über eine Gelmatrix. Für die Auftrennung und Identifizierung von PCR-Produkten wurden 1 %ige Agarosegele (in 1x TAE-Puffer), versetzt mit einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung, verwendet. Da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, können die Produkte im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Standard wurde ein 100-bp-Marker verwendet.

Beispielbilder der Gelelektrophorese zu jeder Genotypisierung befinden sich im Anhang unter den Abbildungen 28-35.

2.2.3.4 Proteinaufreinigung aus Gewebe und Konzentrationsbestimmung nach Lowry

Das Lungengewebe wurde nach Entnahme zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Aufreinigung von Proteinen wurden je 80 g Lungengewebe mit 500 µl RIPA-Puffer plus *Protease+Phosphatase Inhibitor* (10 µl/ml) und *EDTA-Solution* (10 µl/ml) versetzt. Dann wurde das Gewebe mit Hilfe des Precellys-Keramik-Kit homogenisiert (3 x 20 Sek, Raumtemperatur). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15 Min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Proteinkonzentration aus dem Überstand bestimmt.

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Lowry-Methode⁶⁸ ermittelt. Durch die Biuretreaktion, wobei eine Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und zweiwertigen Kupferionen erfolgt, kommt es zu einem violetten Farbumschlag. Anschließend wird dieses Kupfer(II)ion zum Kupfer(I)ion reduziert, welches dann das gelbliche Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdän reduziert. Die daraus resultierende Blaufärbung wurde zur photometrischen Bestimmung (750 nm) der Proteinkonzentration genutzt. Als Kontrolle diente der jeweilige Puffer, in dem die Proben vor der Homogenisierung aufgenommen wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5 Western Blot

Durch die sogenannte SDS-PAGE⁶⁹ (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden einzelne Proteine eines Proteingemisches entsprechend ihrer

Molmasse aufgetrennt. Um die Proteine zu denaturieren, wurden sie zunächst mit 10x Laemmli-Puffer versetzt und danach für 20 Min bei 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben auf das vorbereitete Gel aufgetragen und ihrer Größe nach aufgetrennt (100 V, 400 mA, 1-2 Stunden (Std), Raumtemperatur). Als Standard wurde der *DualMarker* von Biorad verwendet.

Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten *Western Blot* Kammer (Kühlblock, 1 Std, 100 V, 400 mA). Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die Membran für 1 Std mit 5 % Milchpulver/PBST geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in 3 % Milchpulver/PBST. Danach wurde die Membran 3 x 15 Min mit PBS/T gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (in 3 % Milchpulver/PBST) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem *Super-Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat* und dem *VersaDoc Imaging System*. Um eine quantitative Aussage zum Proteingehalt der Banden zu machen, erfolgte die Analyse mit der Software *Multi Gauge V3.0*, wobei die Bandendichte gemessen und in Verhältnis zum Referenzgen (β -Aktin) gesetzt wurde.

2.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Gewebe

Das Lungengewebe wurde mit einem Kryostat zu 10 μ m dicken Schnitten verarbeitet und auf Objektträgern über Nacht angetrocknet. Diese Schnitte konnten bis zur Färbung bei -20 °C gelagert werden.

Isolierte Zellen wurden mit Hilfe der Zytospin-Apparatur (Heraeus) auf Objektträger vereinzelt. Dazu wurden je 100 μ l der Zellsuspension verwendet und durch leichtes zentrifugieren (5 Min, 500 rpm, Raumtemperatur) auf die Objektträger gebracht und angetrocknet. Die weitere Bearbeitung erfolgte bei Zellen und Gewebe identisch.

Als erster Schritt erfolgte eine Fixierung mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch (kalt). Danach wurden die Schnitte bzw. das Gewebe mit einem Fettstift umrandet und für 1 Std mit Ziegen Serum geblockt. Danach erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers für 1-3 Std. Nach einem Waschschrift (3 x 5 Min in PBS) erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für 1 Std. Nach abermaligem Waschen wurden abschließend die Kerne gefärbt (20 Min) und die Schnitte bzw. die Zellen mit Mowiol eingedeckelt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

2.2.3.7 Histologische Färbung

2.2.3.7.1 β -Galaktosidasefärbung

Tabelle 7: Mengenangaben und Reagenzien zur Durchführung einer β -Galaktosidasefärbung

Fixierung	
dH ₂ O	3,98 ml
20 x PBS	0,25 ml
37 % Formaldehyd	0,135 ml
25 % Glutaraldehyd	0,04 ml
10 % NP 40	0,1 ml
1 % Natrium-Desoxycholat	0,5 ml
Färbung	
1 x PBS	4,045 ml
20 x PBS	0,03 ml
MgCl ₂ 100 mM	0,1 ml
K ₃ Fe(CN) ₆ 500 mM	0,05 ml
K ₄ Fe(CN) ₆ 500 mM	0,05 ml
X-Gal (40mg/ml)	0,125 ml
10 % NP 40	0,1 ml
1 % Natrium-Desoxycholat	0,5 ml

Die β -Galaktosidase Färbung erfolgte ebenfalls auf 10 μ m Kryoschnitten. Diese wurden zunächst für 5 Min bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert und danach 3 x 5 Min mit PBS gewaschen. Danach wurde die frisch angesetzte Färbelösung auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und analysiert.

2.2.3.7.2 Hämatoxilin und Eosin Färbung (H&E)

Die H&E Färbung erfolgte auf Kryoschnitten. Diese wurden zunächst für 5 Min mit dH₂O gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für 10 Min in Hämatoxilin, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit dH₂O bis das Wasser klar war. Anschließend wurden die Schnitte 6 Min in Eosin inkubiert und abschließend vorsichtig mit Ethanol gewaschen bis die überschüssige Farbe verschwunden war. Die Schnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt und analysiert.

2.2.3.7.3 Nilrot Färbung

Die Nilrot-Färbung erfolgte auf Kryoschnitten mit einer Gebrauchslösung von 500 µg/ml (10 µl Stocklösung [25 mg/ 50 ml Aceton] in 1 ml PBS + 0,2 % Triton X). Dazu wurde das Gewebe zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Min mit 4 % PFA fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/0,2 % Triton X wurden die Schnitte für 10 Min in Nilrot inkubiert. Dieser Schritt musste im Dunkeln erfolgen, da die Fluoreszenz sehr schnell verblich. Abschließend wurde ein weiteres Mal mit PBS/0,2 % Triton X gewaschen, die Kerne gefärbt und die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Aufbereitung der Lungen für die FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Analyse erfolgt wie in 2.2.2.1 beschrieben. Allerdings wurde zum Waschen der Zellen 0,3 % BSA/PBS verwendet. Nachdem die Zellen durch ein 40 µm Zellsieb vereinzelt wurden, wurden sie in FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung und Bearbeitung der Daten wurde die Software *BD FACSDiva* verwendet.

2.2.5 Mikroskopie

Alle verwendeten Präparate wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (Zeiss) bzw. des NanoZoomer (Hamamatsu) analysiert.

2.2.6 Quantifizierungen

Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des JAVA-basierenden Programms *STEPanizer stereology tools, Version 1.0*.

2.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die *Graph Pad Prism 5 Software* verwendet. Es wurde die *1-way ANOVA* mit anschließendem *Newman Keuls Post-hoc-Test* angewendet. Alle Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of mean*) angeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von PDGFR α -exprimierenden Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit sollten zunächst die potentiellen Fibroblasten-Vorläuferzellen (PDGFR α -exprimierende Zellen) charakterisiert werden. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen auf Lungengewebe von PDGFR α ^{GFP} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen und postnatalen Entwicklung, sollte sowohl die Lokalisation von PDGFR α -GFP-positiven Zellen, als auch die Menge und Intensität der Expression bestimmt werden. Um die Hypothese, dass PDGFR α -exprimierende Zellen Vorläufer von Myo- und Lipofibroblasten sind zu untermauern, wurde zusätzlich auf eine Kolokalisation mit ADRP (als Marker für Lipofibroblasten) und/oder α SMA (als Marker für Myofibroblasten) untersucht.

Abbildung 8 zeigt die endogene PDGFR α -GFP-Expression in Kombination mit einer Antikörperfärbung für glatte Muskelzellen (*alpha smooth muscle actin*, α SMA) und Endothelzellen (*platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM).

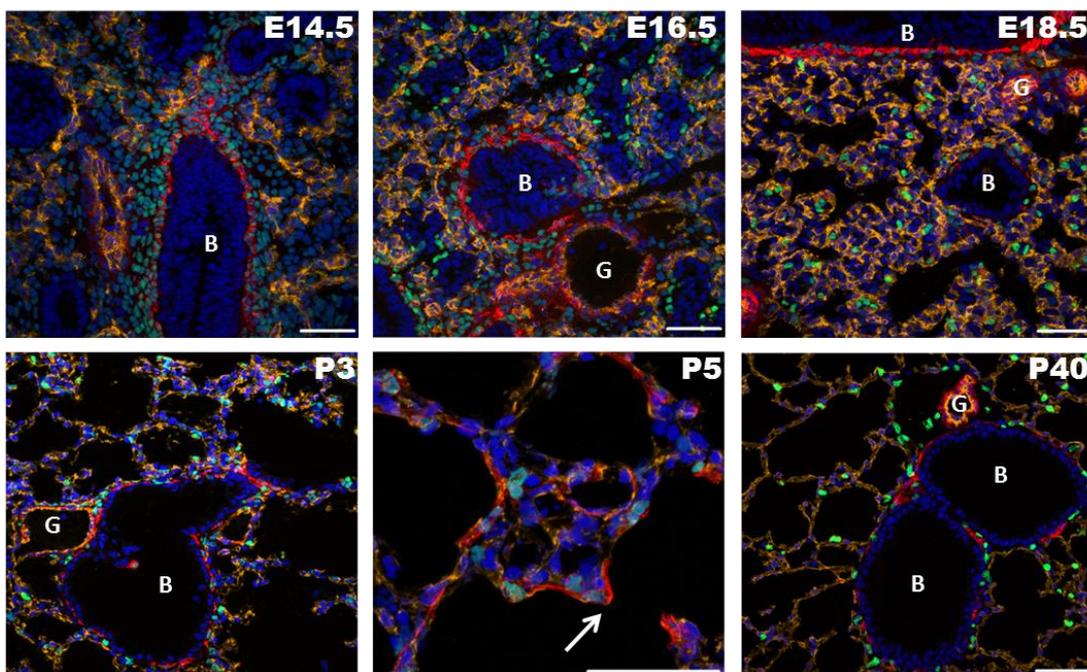


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der PDGFR α ^{GFP} Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.

Rot: α SMA-Cy3/glatte Muskelzellen; orange: PECAM/Endothelzellen; grün: GFP-Expression unter dem endogenen PDGFR α Promotor; blau: Sytoxblau/Zellkerne. B= Bronchus, G= Gefäß. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Der Pfeil weist

auf eine Koexpression der endogenen PDGFR α -GFP-Expression und α SMA hin. Maßstab= 50 μ m. IgG-Kontrollen befinden sich im Anhang unter Abbildung 36.

Während die PDGFR α -GFP-positiven Zellen zum Zeitpunkt E14.5 hauptsächlich um die großen Bronchien lokalisiert waren, fand sich an E16.5 eine schwächere GFP-Expression um die bereits muskularisierten Bronchien und eine stärkere Expression um die kleineren, nicht-muskularisierten Bronchien. Zum Zeitpunkt E18.5 zeigten sich schwach PDGFR α -GFP-exprimierende Zellen sowohl in den glatten Muskelzellen der großen Bronchien, als auch um die kleineren Bronchien. Ab diesem Zeitpunkt waren auch Zellen mit stärkerer PDGFR α -GFP-Expression im Mesenchym zu finden. Die glatten Muskelzellen der Gefäße waren jedoch PDGFR α -GFP-negativ. Postnatal war die stärkste PDGFR α -GFP-Expression im Alveolarraum zu beobachten. Eine Kolokalisation von PDGFR α und α SMA konnte bis zum Zeitpunkt P3 nur in den peribronchialen glatten Muskelzellen beobachtet werden. Um Tag P5 startet in der Lungenentwicklung der Maus die alveoläre Phase. Ab diesem Zeitpunkt zeigten auch viele Zellen in den Spitzen der sekundären Septen eine Koexpression des endogenen PDGFR α -GFP-Signals und α SMA (Pfeil, Abbildung 8). In adulten Mauslungen waren PDGFR α -GFP-positive Zellen sowohl im Alveolarraum, als auch in den glatten Muskelzellen der Bronchien persistent.

Zwischen der pseudoglandulären und der kanalikulären Phase, in der Lungenentwicklung der Maus, kommt es also zu einer Umverteilung der PDGFR α -exprimierenden Zellen zwischen peribronchialen glatten Muskelzellen und dem Mesenchym. Dort sind sie dann hauptsächlich in den Spitzen der sekundären Septen lokalisiert und koexprimieren α SMA.

Um herauszufinden, ob PDGFR α -GFP-positive Zellen Vorläufer für Lipofibroblasten sein könnten, wurde das gleiche Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ADRP, als Marker für Lipofibroblasten, gefärbt (Abbildung 9).

Außerdem sollten Hinweise darauf erbracht werden, zu welchem Zeitpunkt Lipofibroblasten entstehen, am häufigsten sind und letztendlich wieder weniger werden.

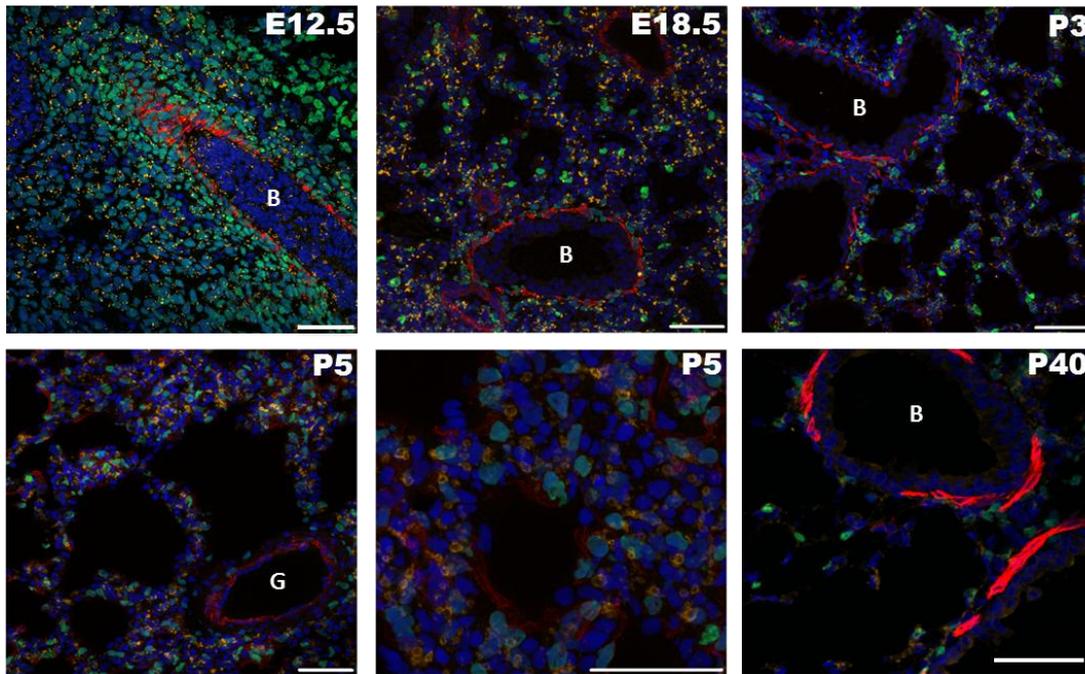


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der PDGFR α ^{GFP} Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.

Rot: α SMA-Cy3/glatte Muskelzellen; orange: ADRP/Lipofibroblasten; grün: GFP-Expression unter dem endogenen PDGFR α Promotor; blau: Sytoxblue/Zellkerne. B= Bronchus, G= Gefäß. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m. IgG-Kontrollen befinden sich im Anhang unter Abbildung 37.

Zum Zeitpunkt E12.5 war das Protein ADRP noch unspezifisch im ganzen Gewebe exprimiert. Erst ab E18.5 ließ sich eine Restriktion auf bestimmte Zellen erkennen. Die Anzahl an ADRP-positiven Zellen sank mit zunehmendem Alter der Mäuse. In adulten Mäusen (P40) ließ sich nahezu kein ADRP mehr nachweisen (Abbildung 9). Eine Koexpression von ADRP mit PDGFR α -GFP war nicht mit Sicherheit zu belegen, da fehlende Zellgrenzen eine genaue Zuordnung der Lipidtröpfchen zu ihren jeweiligen Zellen unmöglich machten. Auf dieses Problem wird später noch einmal eingegangen. Die Immunfluoreszenzfärbung wies demnach darauf hin, dass Lipofibroblasten kurz vor Geburt, zwischen E16.5 und E18.5 entstehen und nach Abschluss der Alveolarisierung in ihrer Anzahl deutlich abnehmen. Bislang konnte kein Hinweis darauf erbracht werden, dass PDGFR α -exprimierende Zellen als Vorläufer für Lipofibroblasten dienen.

Als nächstes wurde das Lungengewebe auf den Fibroblastenmarker Kollagen Typ I gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen Typ I zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl mit stark, als auch mit schwach PDGFR α -GFP-exprimierenden Zellen kolokalisiert war. Vimentin ist ein Typ-3-Intermediärfilament des Zytoskellets und kommt im Zytoplasma aller Zellen mesenchymaler Herkunft vor. Vimentin und PDGFR α -GFP sind ausschließlich in den glatten Muskelzellen der Bronchien, welche wie Fibroblasten mesenchymalen Ursprungs sind, koexprimiert (Abbildung 10).

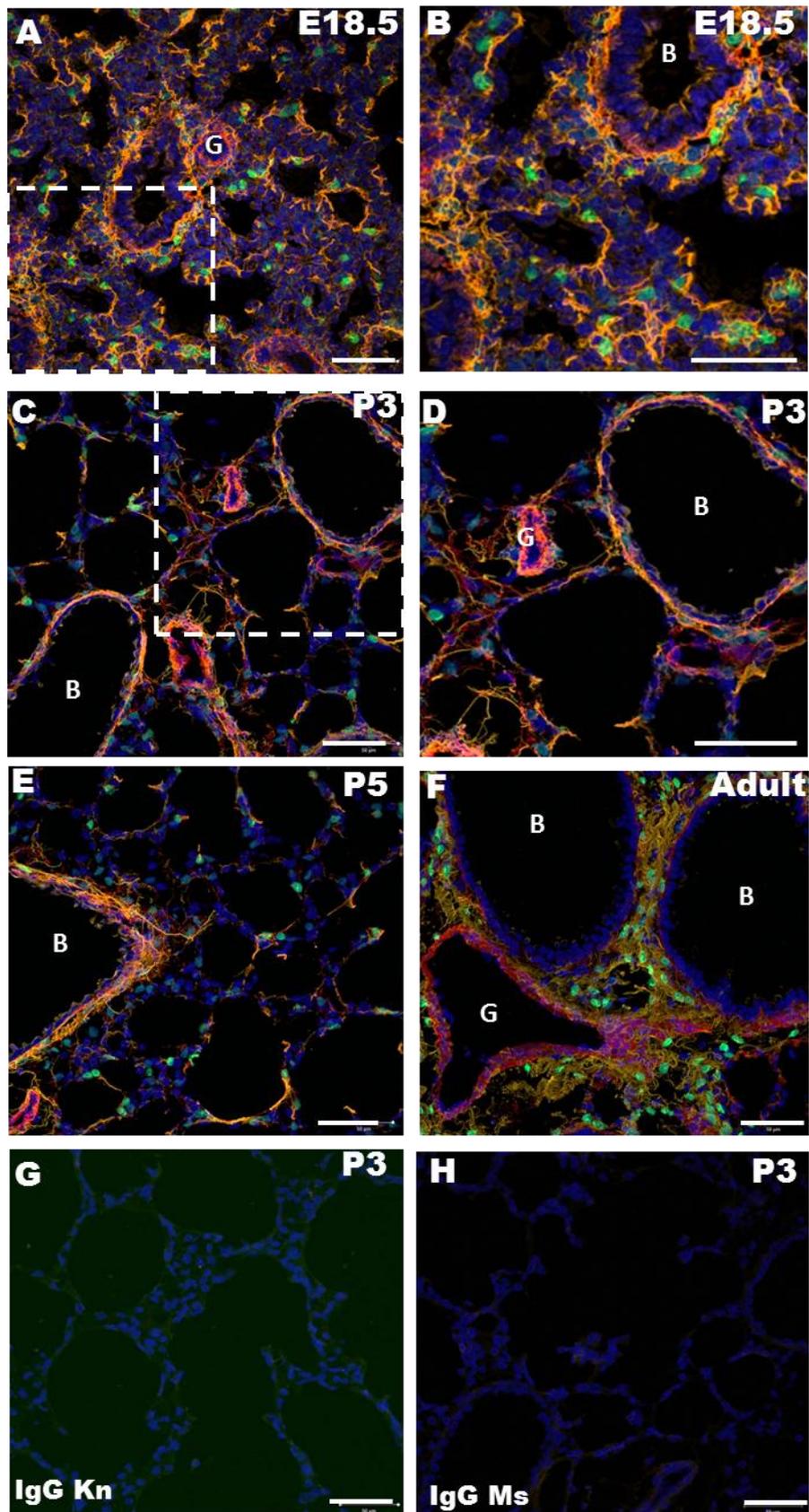
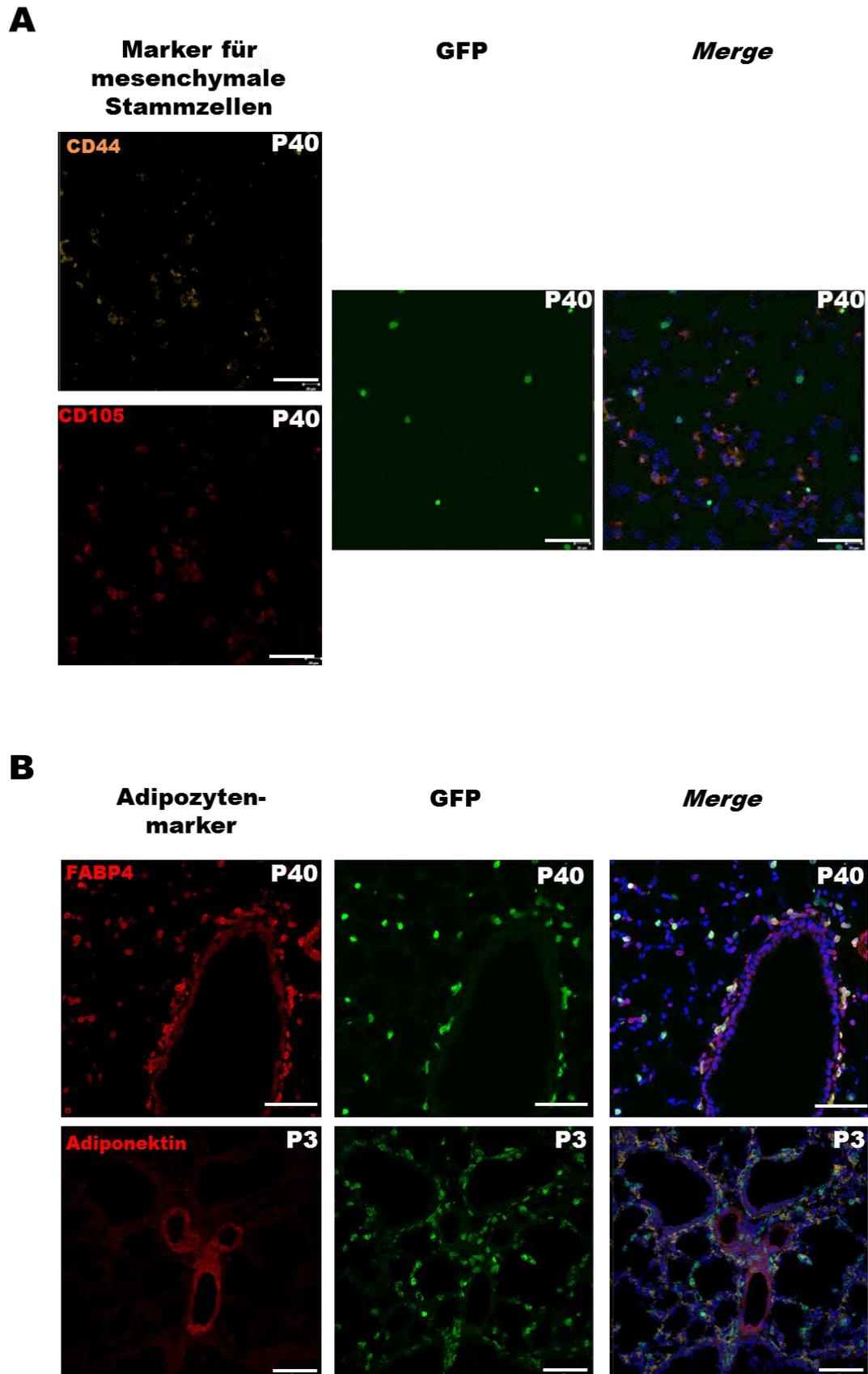


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der $PDGFR\alpha^{GFP}$ Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.

Rot: Vimentin; orange: Kollagen Typ I; grün: GFP-Expression unter dem endogenen PDGFR α Promotor; blau: Sytoxblue/Zellkerne. A+B) Lungengewebe an E18.5. B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des gekennzeichneten Bereichs in A. C+D) Lungengewebe an P3. D zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des gekennzeichneten Bereichs in C. E) Lungengewebe an P5. F) Lungengewebe adulter Tiere. G+H) IgG-Kontrollen der jeweiligen Spezies an P3. Kn= Kaninchen, Ms= Maus. B= Bronchus, G= Gefäß. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m

Um die Lokalisation von PDGFR α -GFP auf verschiedene Gewebearten oder Zelltypen weiter einzugrenzen, wurde adultes PDGFR α -GFP Lungengewebe auf weitere zellspezifische Marker mittels Immunfluoreszenz getestet. Verwendet wurden dabei CD44 und CD105 als Marker für mesenchymale Stammzellen (Abbildung 11A), FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) und Adiponektin als Adipozytenmarker (Abbildung 11B), Phosphohiston-H3-Mitose-Marker für proliferierende Zellen (Abbildung 11C, erste Reihe), pro-SPC als Marker für alveoläre Typ II Zellen (Abbildung 11C, zweite Reihe), CD45 als Leukozytenmarker (Abbildung 11C, dritte Reihe) und Zytokeratin als Marker für Epithelzellen (Abbildung 11C, untere Reihe). In adulten Lungen kolokalisierten PDGFR α -GFP und FABP4 in vielen Zellen sowohl peribronchial als auch mesenchymal. Ansonsten war PDGFR α mit keinem dieser Zellmarker koexprimiert.

Anhand dieser Immunfluoreszenzfärbungen konnte kein Hinweis darauf erbracht werden, dass PDGFR α -exprimierende Zellen Charakteristika mesenchymaler Stammzellen, hämatopoetischer Zellen oder Epithelzellen aufweisen.



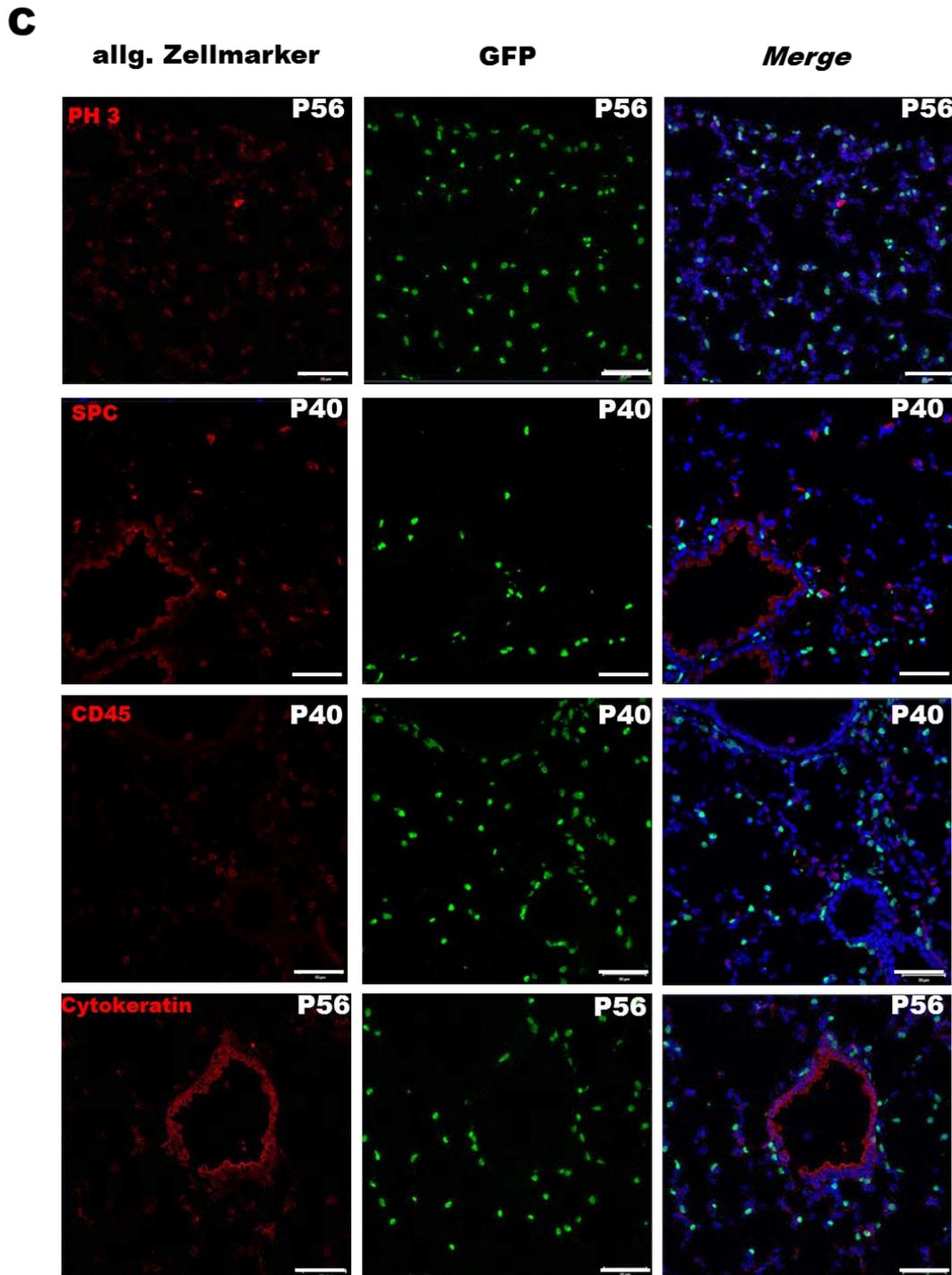


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Zellmarker auf adulten

PDGFR α ^{GFP} Mäusen.

A) Immunfluoreszenzfärbung mit CD44 und CD105 als Marker für mesenchymale Stammzellen. B) Immunfluoreszenzfärbung mit FABP4 und Adiponektin als Adipozytenmarker. C) Immunfluoreszenzfärbung mit Phosphohiston H3 (PH 3) als Marker für Proliferation, Surfactant Protein C (SPC) für Typ II Zellen, CD45 als Leukozytenmarker und Zytokeratin als Epithelzellmarker.

Rot/Orange: Zellmarker; grün: GFP-Expression unter dem endogenen PDGFR α -Promotor; blau: Sytoxblue/Zellkerne. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m. IgG-Kontrollen befinden sich im Anhang unter Abbildung 38.

Um eine Aussage darüber zu treffen, welchen Anteil PDGFR α -GFP-exprimierende Zellen im Lungengewebe ausmachen, wurden die Zellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten mittels Durchflußzytometrie analysiert. Diese Methode dient der Analyse von Zellen, die in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt oder spezifischen Anfärbung detektiert und quantifiziert werden können.

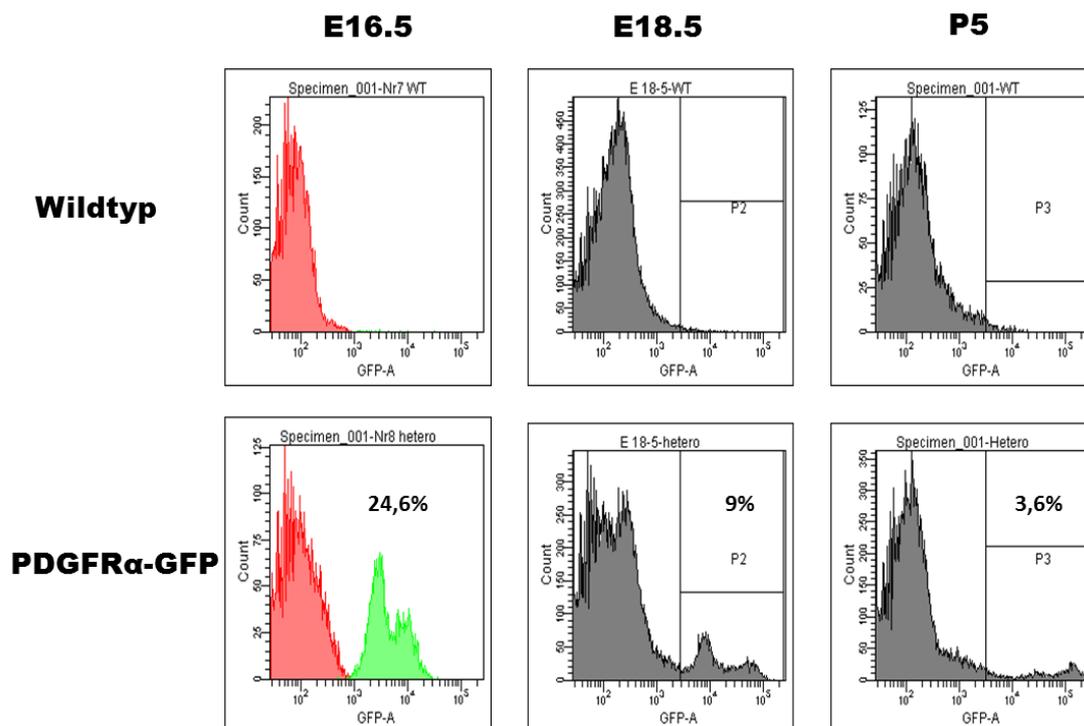


Abbildung 12: Anteil der PDGFR α -GFP-exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl im Lungengewebe.

Prozentualer Anteil der PDGFR α -GFP Zellen in Lungenhomogenat von PDGFR α ^{GFP} Mäusen (untere Reihe) zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung. Wildtyp-Mäuse wurden als Negativkontrolle verwendet (obere Reihe). E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts.

Zum Zeitpunkt E16.5 betrug der prozentuale Anteil an PDGFR α -GFP-Zellen im Lungenhomogenat 24,6 %. Bereits zwei Tage später (E18.5) konnten nur noch 9 % GFP-positive Zellen gemessen werden und an P5 betrug der Anteil an der Gesamtzellzahl 3,6 % (Abbildung 12).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die PDGFR α -GFP-exprimierenden Zellen zwischen E.16.5 und P5, das heißt bereits vor Einsetzen der Alveolarisierung, deutlich in ihrer Abundanz abnehmen.

Um die Frage, ob ADRP mit PDGFR α -GFP kolokalisiert zu beantworten, wurden Zellen aus Lungenhomogenat von PDGFR α^{GFP} Mäusen mittels Zytospin auf Objektträgern vereinzelt und auf ADRP und α SMA gefärbt. Es fanden sich sowohl PDGFR α -GFP und ADRP kolokalisierende Zellen, als auch Zellen, welche PDGFR α -GFP, ADRP und α SMA gemeinsam exprimierten (Abbildung 13A, Pfeile).

Dieses Experiment zeigte zum ersten Mal, dass PDGFR α -positive Zellen als Vorläufer für Lipofibroblasten in Frage kommen.

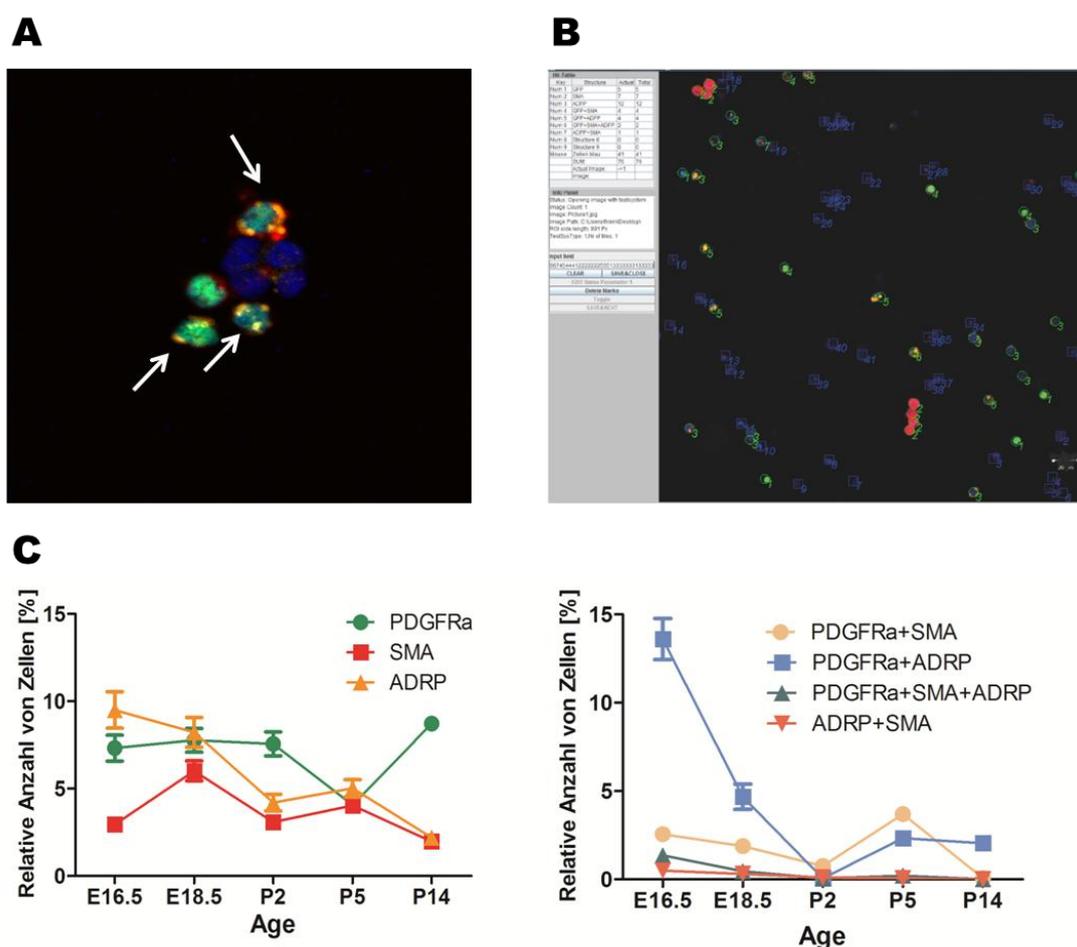


Abbildung 13: Zytospin und Quantifizierungen der verschiedenen Zelltypen während der Lungenentwicklung.

A) Immunfluoreszenzfärbung isolierter Zellen von Lungenhomogenat einer PDGFR α^{GFP} Maus an P3. Rot: α SMA/glatte Muskelzellen; orange: ADRP/Lipofibroblasten; blau: Sytoxblue/Zellkerne. PDGFR α -GFP kolokalisiert mit ADRP und/oder α SMA (Pfeile). B) Oberfläche des *STEPanizer stereology tools* zur Quantifizierung von Zellen. C) Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat von PDGFR α^{GFP} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. N= 3-5. Genaue Werte und statistische Analysen befinden sich im Anhang unter Tabelle 8 und 9.

Mit Hilfe eines Java-basierten Stereologieprogramms (Abbildung 13B) wurden die verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Lungenentwicklung quantifiziert. Die relative Anzahl an PDGFR α -GFP- als auch α SMA-positiven Zellen blieb relativ konstant über den Zeitraum E16.5 bis P14, während ADRP-positive Zellen deutlich abnahmen (Abbildung 13C, linker Graph). PDGFR α -GFP und ADRP koexprimierende Zellen fanden sich in großer Anzahl vor Geburt, postnatal waren deutlich weniger Zellen vorhanden. PDGFR α -GFP und α SMA doppelt-positive Zellen waren an P5, zu Beginn der Alveolarisierung, am häufigsten vertreten. Sowohl ADRP und α SMA doppelt-positive als auch PDGFR α -GFP, α SMA und ADRP dreifach-positive Zellen waren zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten nur in geringer Anzahl nachweisbar (Abbildung 13C, rechter Graph).

3.2 *Lineage tracing der PDGFR α -exprimierenden Zellen*

Im nächsten Teil der Arbeit sollten die PDGFR α -exprimierenden Zellen während der Lungenentwicklung und im Speziellen während der Alveolarisierung verfolgt werden. Konstitutive und induzierbare *Cre-Driver* Linien sollten weitere Hinweise darauf liefern, ob und zu welchen Zellen die potentiellen Vorläufer transdifferenzieren bzw. die vorherigen Ergebnisse bestätigen. Außerdem sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt in der Lungenentwicklung die einzelnen Fibroblastensubtypen generiert werden.

Zunächst wurde mit der konstitutiven PDGFR α ^{Cre};mT/mG Mauslinie gearbeitet. Von Entstehung an sind in dieser Linie alle PDGFR α -exprimierenden Zellen unwiderruflich durch Fluoreszenz markiert.

Das Expressionsmuster von PDGFR α war vergleichbar mit dem der PDGFR α ^{GFP}-Maus. Zu den Zeitpunkten P3 und P5 (Abbildung 14D+E) fanden sich positive Zellen sowohl in der glatten Muskelschicht der Bronchien, als auch im Alveolarraum. Außerdem konnte eine Koexpression von PDGFR α und ADRP im Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 14F).

Eine Kofärbung mit α SMA (Abbildung 14G+H) kennzeichnete deutlich die alveolären Myofibroblasten in den Spitzen der sekundären Septen an P5 (Abbildung 14H, Pfeile). Eine Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen zum Zeitpunkt P5 zeigte eine vergleichbare Anzahl (6-8 %) an PDGFR α , α SMA und ADRP einzeln-positiven Zellen,

während PDGFR α + ADRP (ca. 1 %) und PDGFR α + α SMA (ca. 2 %) zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise selten vorhanden waren (Abbildung 14I).

Die gezeigte Koexpression von ADRP und α SMA mit der potentiellen PDGFR α -positiven Vorläuferzelle, auch in dieser konstitutiven *Cre-Driver* Linie, untermauerte die bisherigen Ergebnisse.

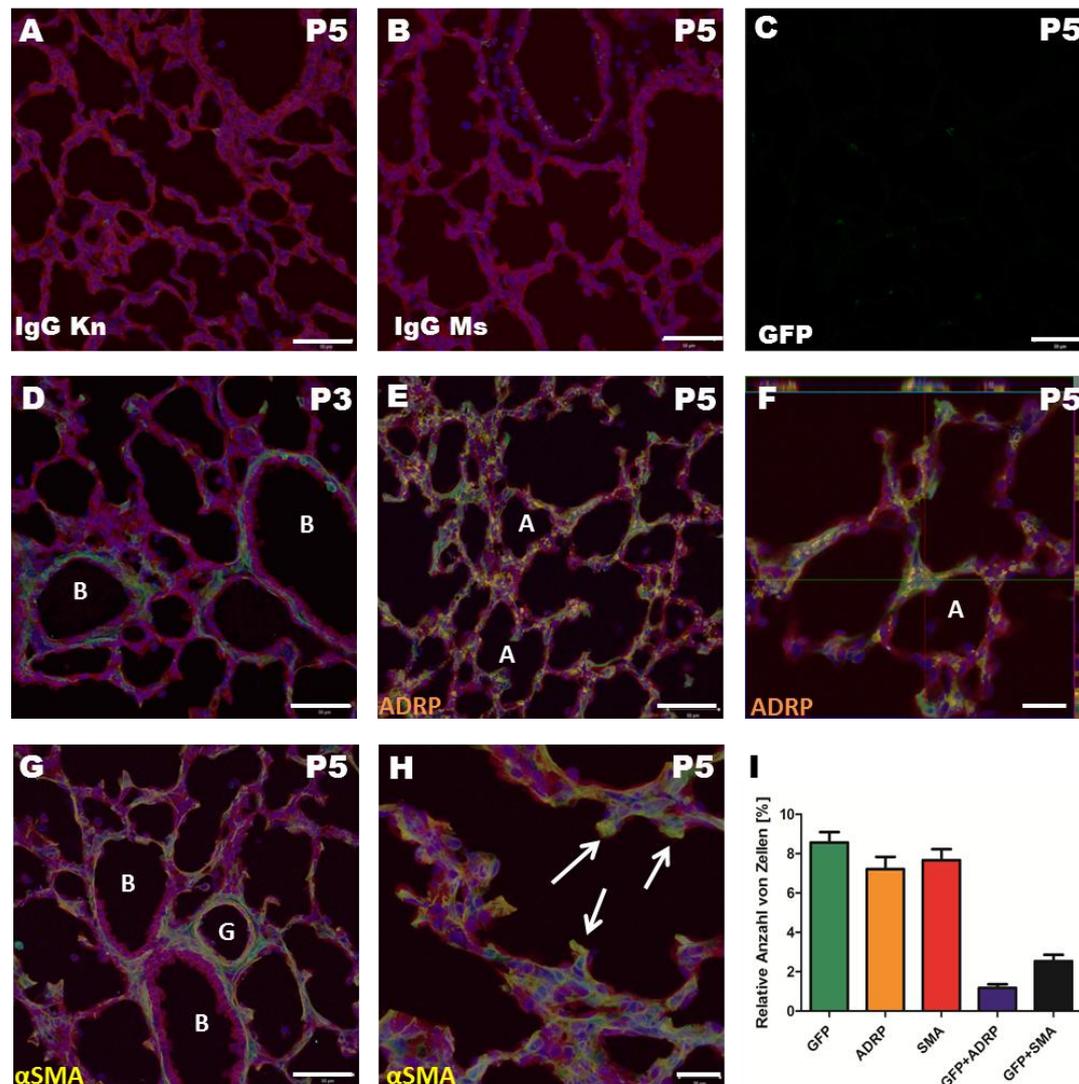


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von PDGFR α ^{Cre};mT/mG Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung und Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen an P5.

A+B) Negativkontrolle mit IgG der jeweiligen Spezies in Cre-negativen Tieren an P5. C) GFP-Kanal nach Behandlung mit GFP-FITC Antikörper in Cre-negativen Tieren an P5. D) Endogene GFP-Expression durch Rekombination in PDGFR α -exprimierenden Zellen an P3. E) Kofärbung mit ADRP (orange) an P5. F) Vergrößerung und Seitenansicht einer PDGFR α /ADRP doppelt-positiven Zelle. G+H) Kofärbung mit α SMA (gelb) an P5. In den Spitzen der sekundären Septen kolokalisierte das endogene GFP (PDGFR α) mit α SMA (Pfeile). Blau: Sytoxblau/Zellkerne. A= Alveole; B= Bronchus; G= Gefäß. Kn= Kaninchen, Ms= Maus. Maßstab= 50 μ m; 20 μ m in F + H. I) Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat von PDGFR α ^{Cre};mT/mG Mäusen an Tag P5. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. N= 5. Genaue Werte befinden sich im Anhang unter Tabelle 10.

Als nächstes wurde mit einer induzierbaren $PDGFR\alpha^{CreERT2};mT/mG$ Mauslinie gearbeitet. Die Expression des Reportergens (GFP), welches die Promotoraktivität von $PDGFR\alpha$ repräsentiert, wurde zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten angeschaltet und das Lungengewebe zu einem späteren Zeitpunkt analysiert.

Um einen Überblick zu erhalten, wurde die Reporterexpression zunächst an P2 induziert und die Lungen an P14 entnommen und gefärbt (Abbildung 15). Die Verteilung der $PDGFR\alpha$ -exprimierenden Zellen beschränkte sich hauptsächlich auf den Alveolarraum, peribronchiale glatte Muskelzellen waren meist nicht oder nur schwach markiert, auch die Zellen in den Spitzen der sekundären Septen waren meist nicht rekombiniert (Abbildung 15F+G). Dafür fanden sich im mesenchymalen Kompartiment viele Zellen, die sowohl $PDGFR\alpha$ als auch ADRP exprimierten (Abbildung 15D+E).

Dieses erste Experiment mit einer induzierbaren *Cre-Driver* Linie bestätigte ebenfalls die Funktion der $PDGFR\alpha$ -exprimierenden Zellen als Vorläufer für Lipofibroblasten, jedoch nicht für alveoläre Myofibroblasten.

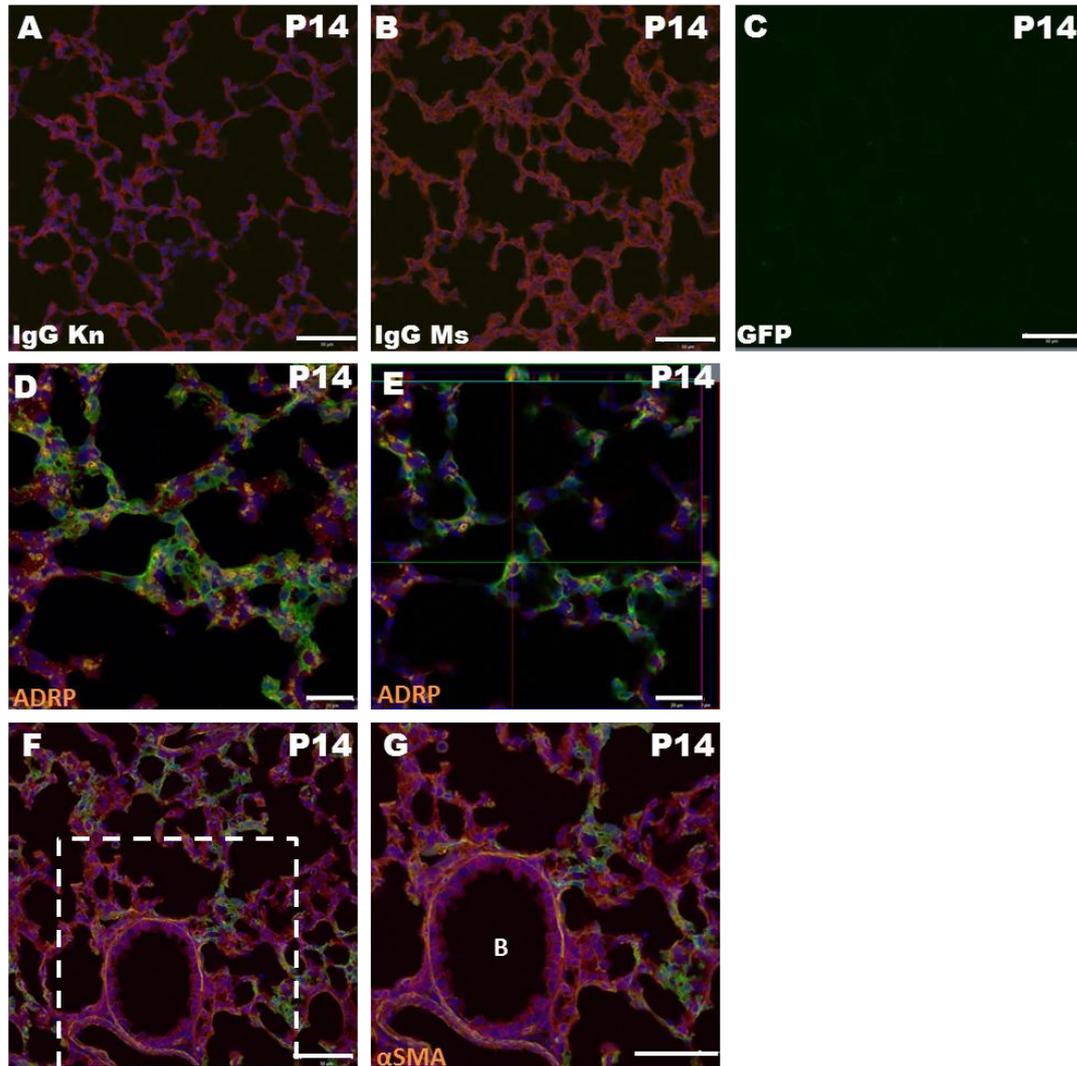


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von $PDGFR\alpha^{CreERT2};mT/mG$ Mauslungen an P14.

A+B) Negativkontrolle mit IgG der jeweiligen Spezies in Cre-negativen Tieren. C) GFP-Kanal nach Inkubation mit GFP-FITC Antikörper in Cre-negativen Tieren. (Für alle induzierbaren Linien finden sich im Anhang, unter Abbildung 40, Kontrollen von Cre-positiven Tieren ohne Tamoxifeninjektion.) D) Kofärbung mit ADRP (orange). E) Vergrößerung und Seitenansicht einer $PDGFR\alpha/ADRP$ doppelt positiven Zelle. F) Kofärbung mit αSMA (orange) G) Vergrößerung des markierten Bereichs in F. Blau: Sytoxblau/Zellkerne. Tamoxifeninjektion an P2. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. B= Bronchus. Kn= Kaninchen, Ms= Maus. Maßstab= 50 μm ; 20 μm in E.

Als nächstes wurde die Expression des Reportergens unter dem $PDGFR\alpha$ Promotor zu den Zeitpunkten E18.5, P2 und P5 induziert und die Lungen an Tag P14 entnommen und gefärbt (repräsentative Bilder: linke und mittlere Spalte, Abbildung 16). Zusätzlich wurde die relative Anzahl der verschiedenen Zelltypen mittels Zytospin quantifiziert (Abbildung 16, rechte Spalte).

Erfolgte die Induktion mit Tamoxifen zum Zeitpunkt E18.5, war nur ca. 1 % der Gesamtzellzahl durch Rekombination GFP-markiert, GFP + ADRP oder GFP + α SMA doppelt-positive Zellen waren nicht nachzuweisen. ADRP und α SMA einzeln-positive Zellen machten jeweils einen Anteil von etwa 5 % aus (Abbildung 16A).

Wurde an P2 induziert betrug der Anteil an GFP-positiven Zellen rund 3 %, GFP + ADRP doppelt-positive waren zu 1 % vorhanden, während GFP + α SMA positive erneut nicht nachzuweisen waren. ADRP einzeln-positive Zellen machten einen Anteil von 10 % aus, während α SMA einzeln-positive etwas weniger als 4% ausmachten (Abbildung 16B).

Bei einer Tamoxifeninjektion an P5 betrug der Anteil an GFP-positiven Zellen 8 %, doppelt-positive Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht markiert werden. ADRP-exprimierende Zellen machten einen Anteil von etwa 3 %, α SMA-positive ca. 8 % (Abbildung 16C) aus.

Abbildung 16D zeigt Beispielbilder und eine Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen in adulten Mäusen, induziert an P5. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 6 % aller Zellen GFP-positiv und 1 % GFP + ADRP doppelt-positiv. GFP + α SMA doppelt-positive Zellen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht markiert werden. ADRP-positive machten einen Anteil von 7 % aus, α SMA-positive etwa 3 %.

Diese Ergebnisse zeigten, dass sich postnatale (P2 und P5) PDGFR α -positive Zellen nicht mehr zu Myofibroblasten differenzieren können. Eine Induktion an P2 markierte zumindest einen Teil der Lipofibroblasten, zum Zeitpunkt P5 dagegen entstanden aus PDGFR α -exprimierenden Zellen keine Lipofibroblasten mehr. Trotzdem ließen sich ca 3% ADRP-positive Zellen nachweisen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Lipofibroblasten neben PDGFR α -positiven Zellen, einen oder mehrere weitere Vorläuferzellen besitzen.

Der Versuch, die Zellen zu einem embryonalen Zeitpunkt zu markieren scheiterte, da die Tamoxifeninjektion in die tragende Maus die Geburt der Jungtiere auslöste und in dieser kurzen Zeit kaum Tamoxifen in die Jungtiere gelangte, um die Reportergenexpression zu aktivieren.

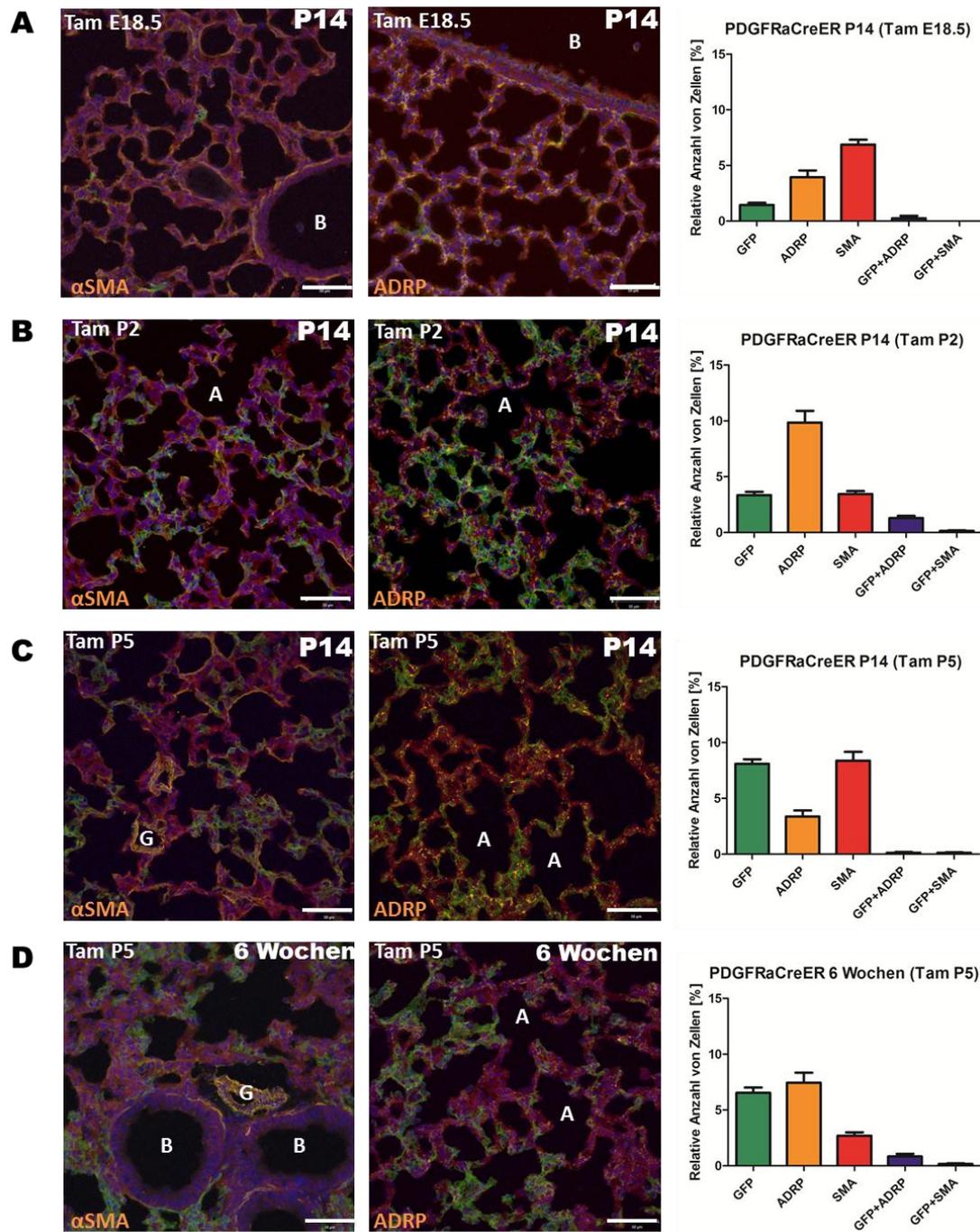


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierungen der unterschiedlichen Zelltypen von PDGFR α ^{CreERT2};mT/mG Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung.

A) Lungengewebe an P14, Tamoxifeninjektion E18.5. Links: Kofärbung mit α SMA (orange), Mitte: Kofärbung mit ADRP (orange). Rechts: Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat an Tag P14. N= 3. B) Lungengewebe an P14, Tamoxifeninjektion P2. Links: Kofärbung mit α SMA (orange), Mitte: Kofärbung mit ADRP (orange). Rechts: Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat an Tag P14. N= 4. C) Lungengewebe an P14, Tamoxifeninjektion P5. Links: Kofärbung mit α SMA (orange), Mitte: Kofärbung mit ADRP (orange). Rechts: Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat an Tag P14. N= 3. D) Adultes Lungengewebe, Tamoxifeninjektion P5. Links: Kofärbung mit α SMA (orange), Mitte: Kofärbung mit ADRP (orange). Rechts: Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat adulter Tiere. N= 2. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Tam=Tamoxifeninjektion. A= Alveole; B= Bronchus; G= Gefäß. Maß-

stab= 50 μ m. Genaue Werte und statistische Analysen befinden sich im Anhang unter Tabelle 11. IgG-Kontrollen befinden sich im Anhang unter Abbildung 39.

3.3 *Lineage tracing glatter Muskelzellen/Myofibroblasten*

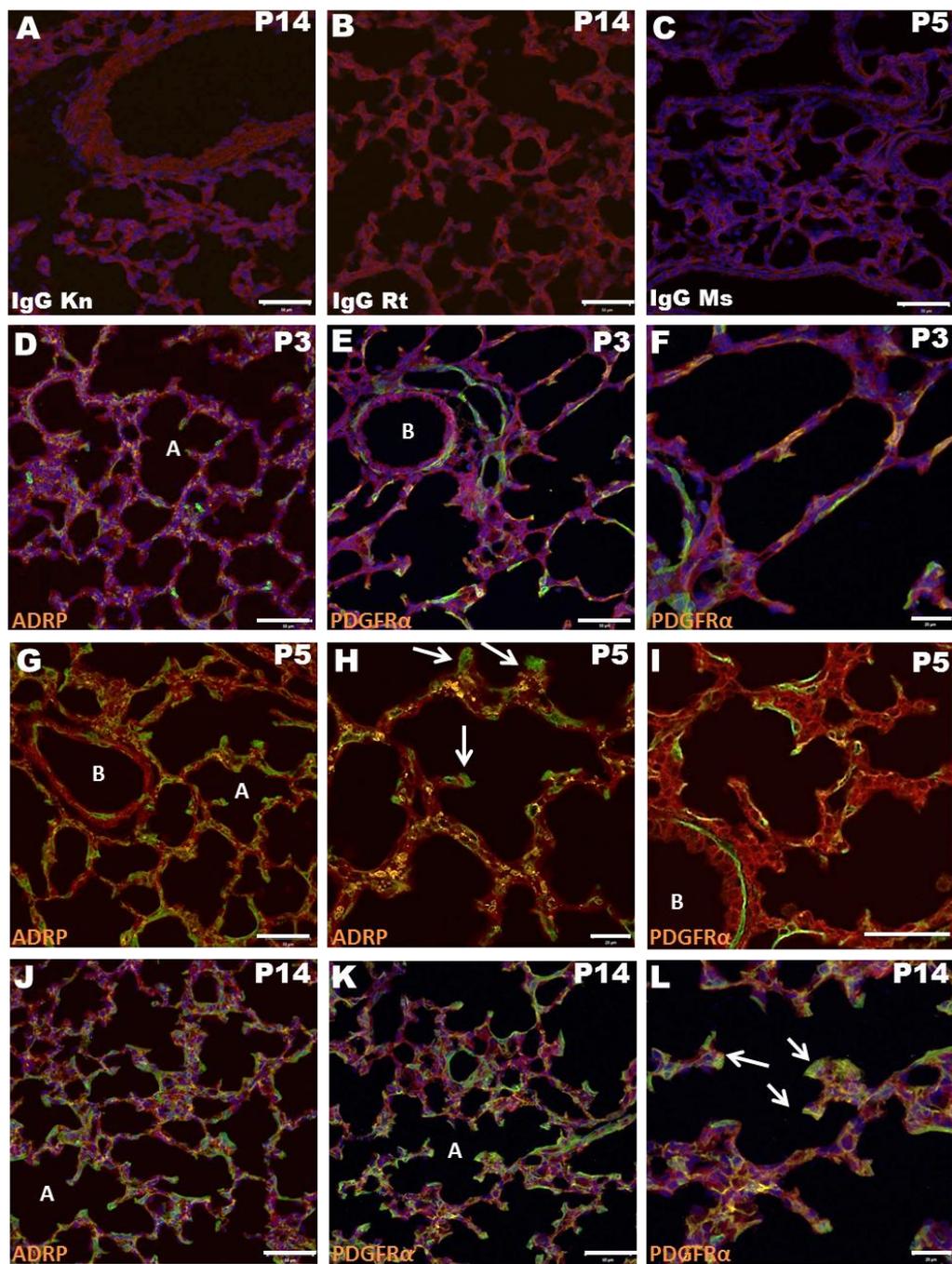
Um den Ursprung und die Transdifferenzierung glatter Muskelzellen bzw. alveolärer Myofibroblasten im Speziellen zu verfolgen, wurde mit einer induzierbaren *smooth muscle myosin heavy chain* Cre-Mauslinie gearbeitet.

Das Expressionsmuster des endogenen GFPs unter dem *smooth muscle myosin heavy chain* (SMMHC) Promotor, entsprach in nahezu allen Zellen einer α SMA Antikörperfärbung (Abbildung 18A).

Die folgenden Ergebnisse beruhen auf Antikörperfärbungen mit ADRP und PDGFR α zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung (P3, P5, P14). Die Induktion der GFP-Expression unter dem *smooth muscle myosin heavy chain* Promotor erfolgte immer an P2.

Zum Zeitpunkt P3 (Abbildung 17i) D-F) waren hauptsächlich die glatten Muskelzellen der Bronchien und Gefäße GFP-positiv, wenige GFP-exprimierende Zellen fanden sich auch im Alveolarraum. An P5 (Abbildung 17i) G-I) waren bereits deutlich mehr alveoläre Zellen markiert, außerdem waren viele Zellen in den Spitzen der sekundären Septen GFP-positiv (Abbildung 17i) H, Pfeile). An P14 (Abbildung 17i) J-L) waren zusätzlich zu den glatten Muskelzellen der Bronchien und Gefäße sehr viele mesenchymale Zellen rekombiniert. Zu diesem Zeitpunkt war praktisch jede Zelle in den Spitzen der sekundären Septen GFP-positiv (Abbildung 17ii) B, Pfeile).

i)



ii)

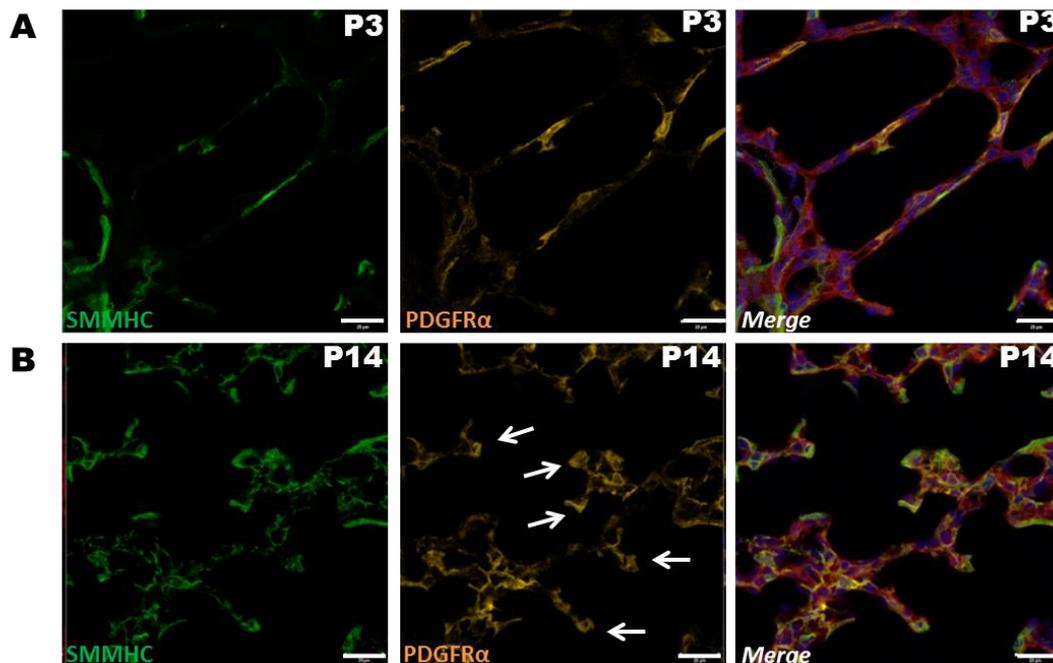


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von SMMHC^{CreERT2};mT/mG Maulungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.

i) A-C) Negativkontrollen mit IgG der jeweiligen Spezies in Cre-negativen Tieren. (Für alle induzierbaren Linien finden sich im Anhang, unter Abbildung 40 Kontrollen von Cre-positiven Tieren ohne Tamoxifeninjektion). D) Kofärbung mit ADRP (orange) an P3. E-F) Kofärbung mit PDGFR α (orange) an P3. G-H) Kofärbung mit ADRP (orange) an P5. Die Spitzen der sekundären Septen waren SMMHC-positiv (Pfeile). I) Kofärbung mit PDGFR α (orange) an P5. J) Kofärbung mit ADRP (orange) an P14. K+L) Kofärbung mit PDGFR α (orange) an P14. Die Pfeile markieren eine Kolo-kalisation von PDGFR α und SMMHC in den Spitzen der Septen.

ii) A) Kofärbung mit PDGFR α (orange) an P3. B) Kofärbung mit PDGFR α (orange) an P14. Die Pfeile weisen auf die PDGFR α -positiven Septenspitzen hin. Blau: Sytoxblue/Zellkerne. Tamoxifeninjektion an P2. A= Alveole; B= Bronchus. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m; 20 μ m in i) F, H, L und ii) A+B.

Bei einer Kofärbung des Gewebes mit ADRP (Abbildung 17i) D, G, H + J), zeigte sich zu den Zeitpunkten P3 und P5 in wenigen Zellen eine Kolo-kalisation mit GFP. ADRP-positiv e Zellen beschränkten sich ausschließlich auf den Alveolarraum, vermehrt an der Basis der sekundären Septen. Da zum Zeitpunkt P14 sehr viele der mesenchymalen Zellen GFP-positiv waren, fanden sich auch einige Zellen, welche mit ADRP kolo-kalisiert (Abbildung 17i) J). Eine Färbung des Gewebes mit PDGFR α (Abbildung 17i) E, F, I, K und L) zeigte zum Zeitpunkt P3 noch keine Koexpression mit GFP (Abbildung 17ii) A), an P5 dagegen fanden sich im Alveolarraum einige SMMHC-exprimierende Zellen mit schwacher PDGFR α Expression (Abbildung 17i)

D). Zum Zeitpunkt P14 zeigte sich besonders in den Spitzen der sekundären Septen eine deutliche Kolo­kalisierung von GFP und PDGFR α (Abbildung 17ii) B).

Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten die Funktion der PDGFR α -exprimierenden Zellen als Vorläuferzellen für Myofibroblasten. Die Hypothese, dass Myofibroblasten auch aus Lipofibroblasten generiert werden können, fand in diesem Experiment keinen Nachweis.

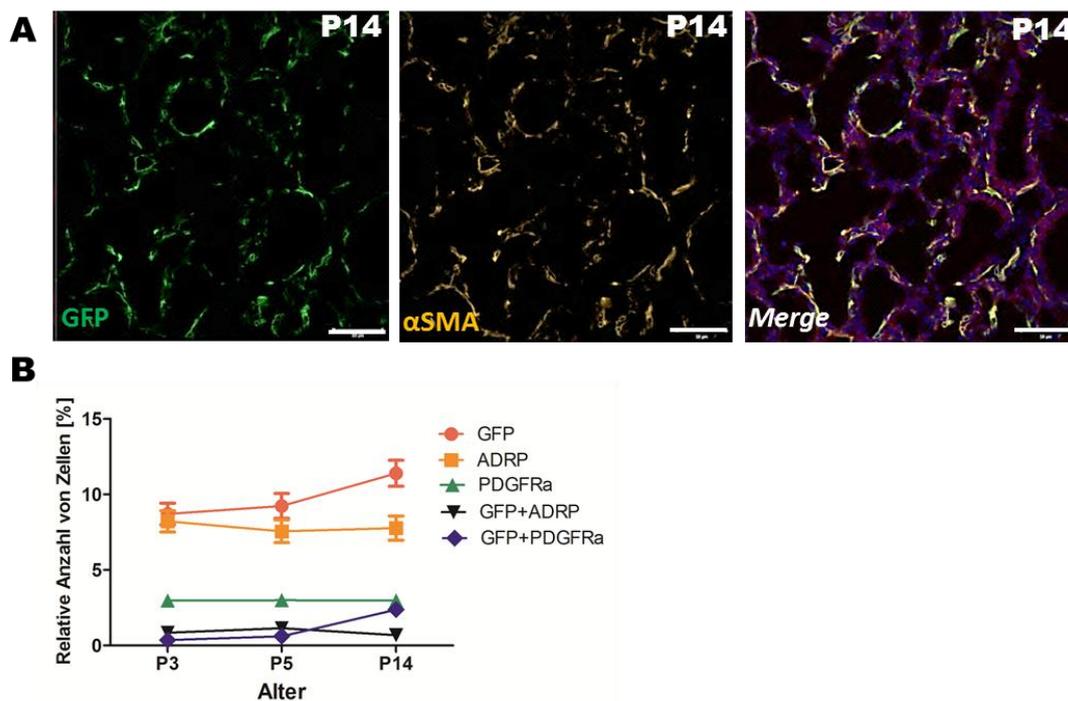


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von SMMHC^{CreERT2};mT/mG Mauslungen und relative Anzahl der verschiedenen Zelltypen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.

A) Kofärbung mit α SMA an P14. Gelb: α SMA; blau: Sytoxblue/Zellkerne. Tamoxifeninjektion an P2. Maßstab= 50 μ m. B) Relative Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen in Lungenhomogenat von SMMHC^{CreERT2};mT/mG Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung. N= 3- 5. Tamoxifeninjektion an P2. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Genaue Werte und statistische Analysen befinden sich im Anhang unter Tabelle 12 und 13.

Eine Quantifizierung der unterschiedlichen Zelltypen zu den Zeitpunkten P3, P5 und P14 zeigte einen über die Zeit stetig steigenden Anteil der GFP-positiven Zellen von 9 % an P3 auf 11 % an P14. GFP + ADRP doppelt-positive Zellen stiegen analog zur GFP-Population von 0,3 % auf 2 % an. ADRP einzeln-positive Zellen hatten über den gemessenen Zeitraum einen Anteil an der Gesamtzellzahl von etwa 8 %, auch PDGFR α -exprimierende Zellen behielten ihren Anteil von 3 % bei. GFP und PDGFR α

doppelt-positive Zellen machten zu allen Zeitpunkten einen Anteil von ca. 1 % an der Gesamtzellzahl aus (Abbildung 18B).

Auch anhand der Quantifizierungen konnte gezeigt werden, dass eine Kolo-kalisation von ADRP und dem Marker für glatte Muskelzellen (SMMHC) eine Ausnahme darstellte.

3.4 Lineage tracing von Lipofibroblasten

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Herkunft und die Transdifferenzierungsprozesse der Lipofibroblasten untersucht.

Zunächst wurde mit der induzierbaren $Ap2^{CreERT2}$ Mauslinie gearbeitet. Diese Linie sollte die Cre-Rekombinase in Adipozyten exprimieren. Da diese einige Charakteristika mit Lipofibroblasten gemein haben, sollte untersucht werden, ob sich diese Linie zur Markierung und Verfolgung von Lipofibroblasten eignet.

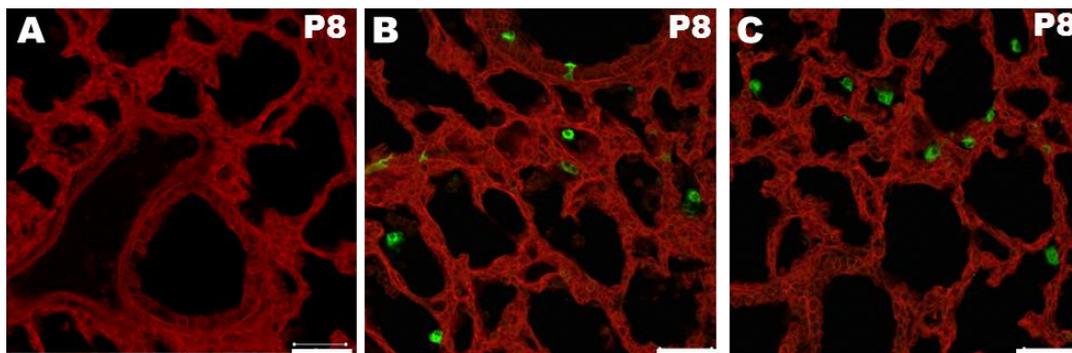


Abbildung 19: Lungengewebe der $Ap2^{CreERT2};mT/mG$ Mauslinie.

A) Negativkontrolle der GFP-Expression in Cre-negativen Tieren. B+C) Endogene $Ap2$ -Expression an P8. Tamoxifeninjektion P1-P4. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

Es stellte sich jedoch heraus, dass mit dieser transgenen Linie ausschließlich alveoläre Makrophagen und keine Lipofibroblasten markiert wurden (Abbildung 19B+C). Deshalb wurde auf weitere Experimente mit dieser transgenen Linie verzichtet.

Im Folgenden wurde mit einer Mauslinie gearbeitet, welche unter dem endogenen ADRP Promotor eine induzierbare Cre-Rekombinase und zusätzlich einen Fluoreszenzfarbstoff (mCherry) exprimiert.

Neben dieser Tamoxifen-induzierbaren Linie wurde noch eine Doxozyklin-induzierbare Linie kreiert. Diese exprimiert zusätzlich zu dem Tetrazyklin-Transaktivator-Protein ebenfalls einen Fluoreszenzfarbstoff (*Yellow fluorescent protein*, YFP). Dadurch kann die gegenwärtige endogene Expression von ADRP bereits sichtbar gemacht werden, doch kombiniert mit einer Reportermaus können ADRP-exprimierende Zellen gezielt zu verschiedenen Zeitpunkten visualisiert werden.

Die Funktionalität der Konstrukte wurde zunächst in adulten Chimären der jeweiligen Linie überprüft. In Verbindung mit einer Antikörperfärbung auf ADRP zeigte sich eine Koexpression mit mCherry oder YFP in einigen interstitiellen Zellen (Abbildung 20A+B, Pfeilköpfe), aber auch in alveolären Makrophagen (Abbildung 20A+B, Pfeile).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in beiden Mauslinien alle Zellen mit endogener ADRP-Fluoreszenz auch eine positive ADRP Antikörperfärbung aufwiesen.

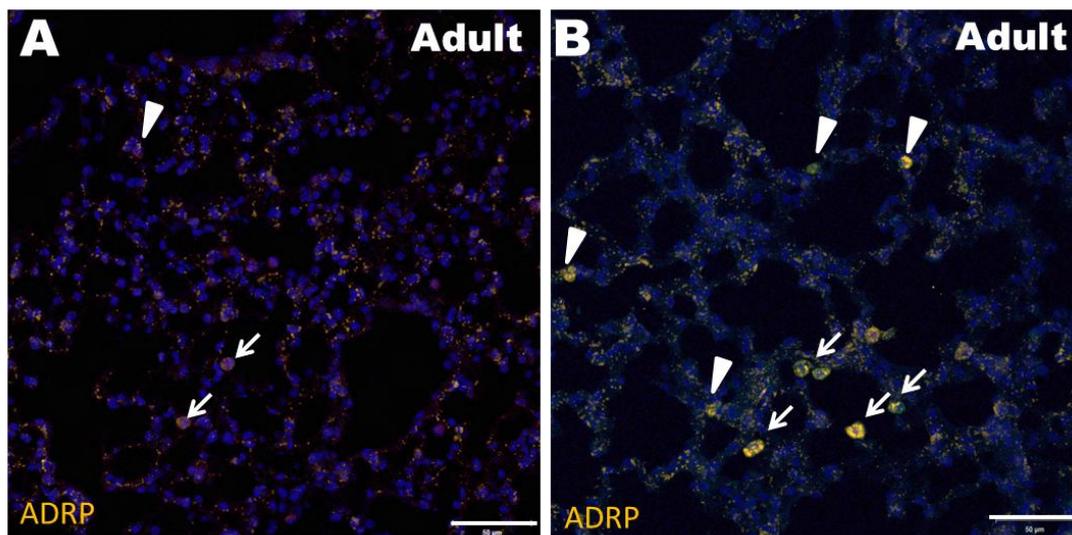


Abbildung 20: Endogene Expression von mCherry und YFP bei adulten Chimären der F₁-Generation.

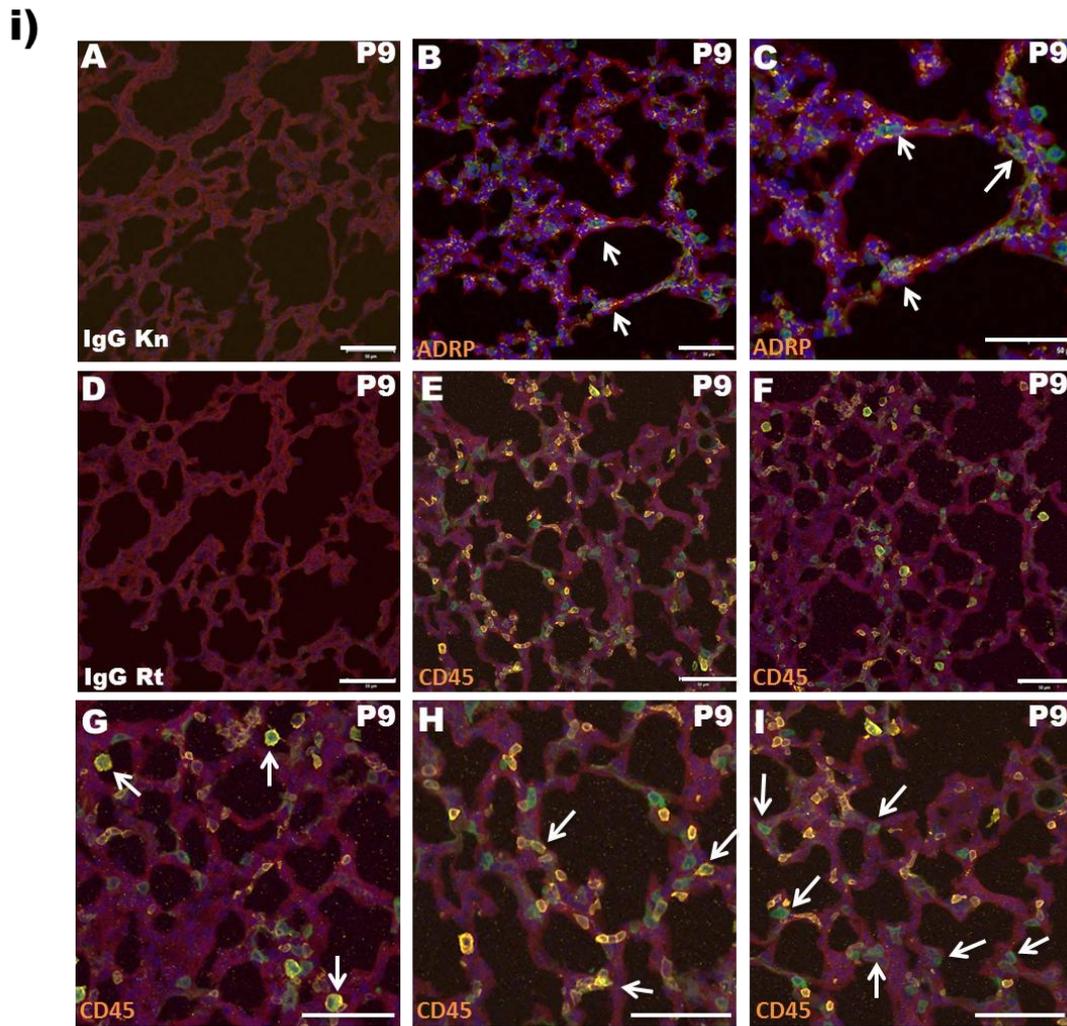
A) Endogene mCherry-Expression in ADRP^{CreERT2/mCherry} Mäusen. B) Endogene YFP-Expression in ADRP^{TA/YFP} Mäusen. Die Pfeile weisen auf eine Kolokalisation mit zusätzlicher ADRP Immunfluoreszenzfärbung hin. Orange: ADRP; blau: Sytoxblue/Zellkerne. Maßstab= 50 µm.

Als nächstes wurde das Expressionsmuster von GFP unter Kontrolle des endogenen ADRP-Promotors in postnatalen Tieren überprüft. Dafür wurde Lungengewebe einer

ADRP^{CreERT2/mCherry};mT/mG Maus an P9 analysiert. Die GFP-Expression des Reporters wurde an Tag P2-P3 induziert.

Eine Kofärbung mit einem ADRP Antikörper zeigte eine Kolo-kalisation mit der endogenen ADRP-Expression in vielen (Abbildung 21i) B+C, Pfeile), aber nicht in allen Zellen. Eine Kofärbung mit CD45 als Marker für Leukozyten wies auf eine GFP-Expression von unterschiedlichen Zelltypen hin (Abbildung 21i) E+F). Es konnten drei unterschiedliche Zelltypen identifiziert werden. Große, runde, CD45-positive Zellen im Luftraum der Alveolen (Abbildung 21i) G), des Weiteren große, runde CD45-positive Zellen innerhalb des Gewebes (Abbildung 21i) H) und CD45-negative, fibroblastenartige Zellen, häufig lokalisiert an der Basis der sekundären Septen (Abbildung 21i) I).

Diese Kofärbungen zeigten, dass mit der ADRP^{CreERT2/mCherry} Mauslinie nicht nur Lipofibroblasten, sondern auch intraalveoläre und interstitielle Makrophagen markiert werden.



ii)

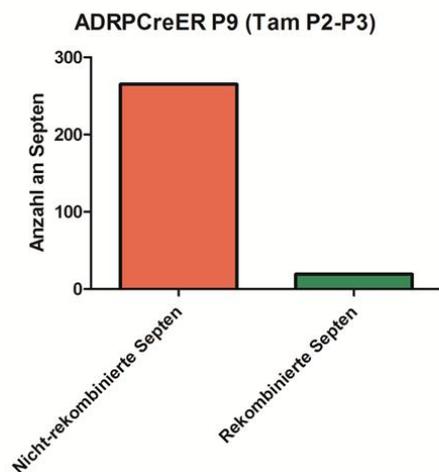


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von $ADRP^{CreERT2/mCherry};mT/mG$ Mauslungen an P9.

i) A, D) Negativkontrollen mit IgG der jeweiligen Spezies in Cre-negativen Tieren. (Für alle induzierbaren Linien finden sich im Anhang, unter Abbildung 40, Kontrollen von Cre-positiven Tieren ohne Tamoxifeninjektion.) B + C) Kofärbung mit ADRP (orange). Die Pfeile weisen auf eine Kofokalisation der endogenen ADRP-Expression mit der ADRP Antikörperfärbung hin. E+F) Kofärbung mit CD45 (orange). G-I) Vergrößerte Ansicht der Kofärbung mit CD45 (orange). Die Pfeile

weisen auf unterschiedliche Zelltypen innerhalb der rekombinierten Zellen hin: Alveoläre Makrophagen (G), interstitielle Monozyten (H) und Lipofibroblasten (I). Blau: Sytoxblue/Zellkerne. Tamoxifeninjektion P2-P3. Kn= Kaninchen, Rt= Ratte. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

ii) Absolute Anzahl an rekombinierten und nicht-rekombinierten Spitzen der sekundären Septen an P9. N=2, Anzahl der ausgewerteten Bilder = 15.

Eine Auszählung der rekombinierten, das heißt GFP-positiven Zellen an den Spitzen der sekundären Septen, zeigte 265 nicht-rekombinierte zu 19 rekombinierte Zellen an P9 (Abbildung 21ii).

Dieses Ergebnis lieferte einen weiteren Beweis dafür, dass alveoläre Myofibroblasten nicht aus, an der Basis der Septen lokalisierten, Lipofibroblasten generiert werden.

Um auch früh in der Lungenentwicklung entstehende Lipofibroblasten zu markieren, wurde in einem weiteren Schritt die Expression des Reportergens an E14.5 angeschaltet. Die Organentnahme erfolgte an E18.5. Zellen die zu diesem Zeitpunkt rekombinierten, zeigten eine Kolo-kalisation mit einer ADRP Antikörperfärbung (Abbildung 22D) und waren sowohl CD45- (Abbildung 22E) als auch α SMA- (Abbildung 22F) negativ.

Im embryonalen Entwicklungsstadium scheint die Expression von ADRP auf Lipofibroblasten beschränkt zu sein.

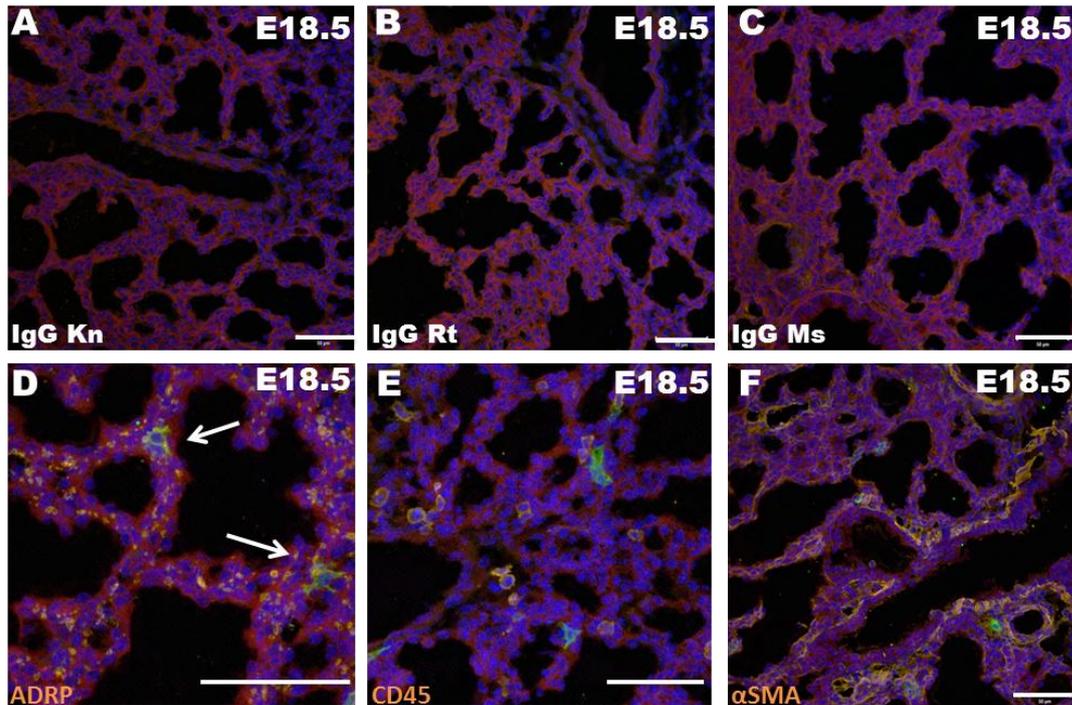


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von ADRP^{CreERT2/mCherry};mT/mG Mäusen an E18.5.

A-C) Negativkontrollen mit IgG der jeweiligen Spezies in Cre-negativen Tieren. D) Kofärbung mit ADRP (orange). E) Kofärbung mit CD45 (orange). F) Kofärbung mit α SMA (orange).

Blau: Sytoxblue/Zellkerne. Tamoxifeninjektion E14.5. Kn= Kaninchen, Rt= Ratte. Ms= Maus. E= Embryonal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

3.5 ADRP *Knockout*

Die transgene Linie ADRP^{flox} (Plin2) exprimiert in dem endogenen ADRP *Locus* eine Neomycin/ β -Galaktosidase Kasette, wodurch eine Leserastermutation entsteht und das Gen seine Funktion verliert. ADRP-positive Zellen können gleichzeitig durch eine LacZ-Färbung sichtbar gemacht werden. Mäuse, die das Konstrukt auf einem der beiden Allele tragen, produzieren nur halb so viel funktionsfähiges Protein wie Wildtyp-Mäuse. Tiere, die das Konstrukt auf beiden Allelen tragen, fungieren dementsprechend als vollständiger *Knockout* für ADRP. Dies konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 23A).

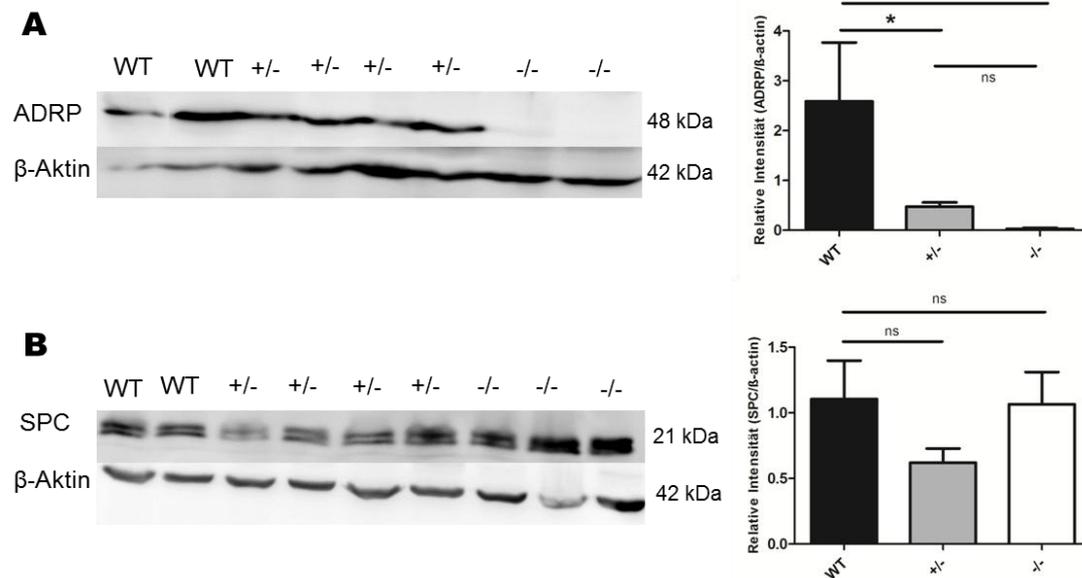


Abbildung 23: Proteinexpression von ADRP und SPC in Lungenhomogenat von ADRPfloxed (Plin2) Mäusen.

A) Relative Proteinexpression von ADRP im Wildtyp, sowie in hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen. B) Relative Proteinexpression von SPC im Wildtyp, sowie in hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen.

WT= Wildtyp, +/- = heterozygot, -/- = homozygot. Die Expression des jeweiligen Proteins wurde ins Verhältnis zu β-Aktin gesetzt. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant; N = 3.

Eine LacZ-Färbung auf Gewebe an P14 zeigte keine blauen Zellen im Wildtyp, mehrere LacZ-positive Zellen im heterozygoten Tier und viele positive Zellen im homozygoten *Knockout*-Tier (Abbildung 24B). Des Weiteren konnte bei genauerer Betrachtung der Gewebestruktur kein Unterschied zwischen Wildtypen, heterozygoten und homozygoten Tieren festgestellt werden (Abbildung 24A).

Eine Antikörperfärbung auf ADRP bestätigte die Ergebnisse des Western Blots. Im Wildtyp und im heterozygoten Tier konnte ADRP eindeutig nachgewiesen werden, im homozygoten *Knockout* dagegen fehlte das Protein (Abbildung 24C). *Nile Red* färbt die Lipidtröpfchen der Lipofibroblasten an. Sowohl im Wildtyp, als auch im hetero- und homozygoten Tier konnten Lipidtröpfchen mittels *Nile Red*-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 24D).

Da ADRP eine Rolle bei der Surfactantproduktion in Typ II Zellen spielt, wurde mittels Western Blot überprüft, ob die Proteinlevel von *Surfactant protein-C* (SPC) im ADRP *Knockout* verändert sind. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von SPC zwischen Wildtyp, heterozygotem und homozygotem *Knockout* festgestellt werden (Abbildung 23B).

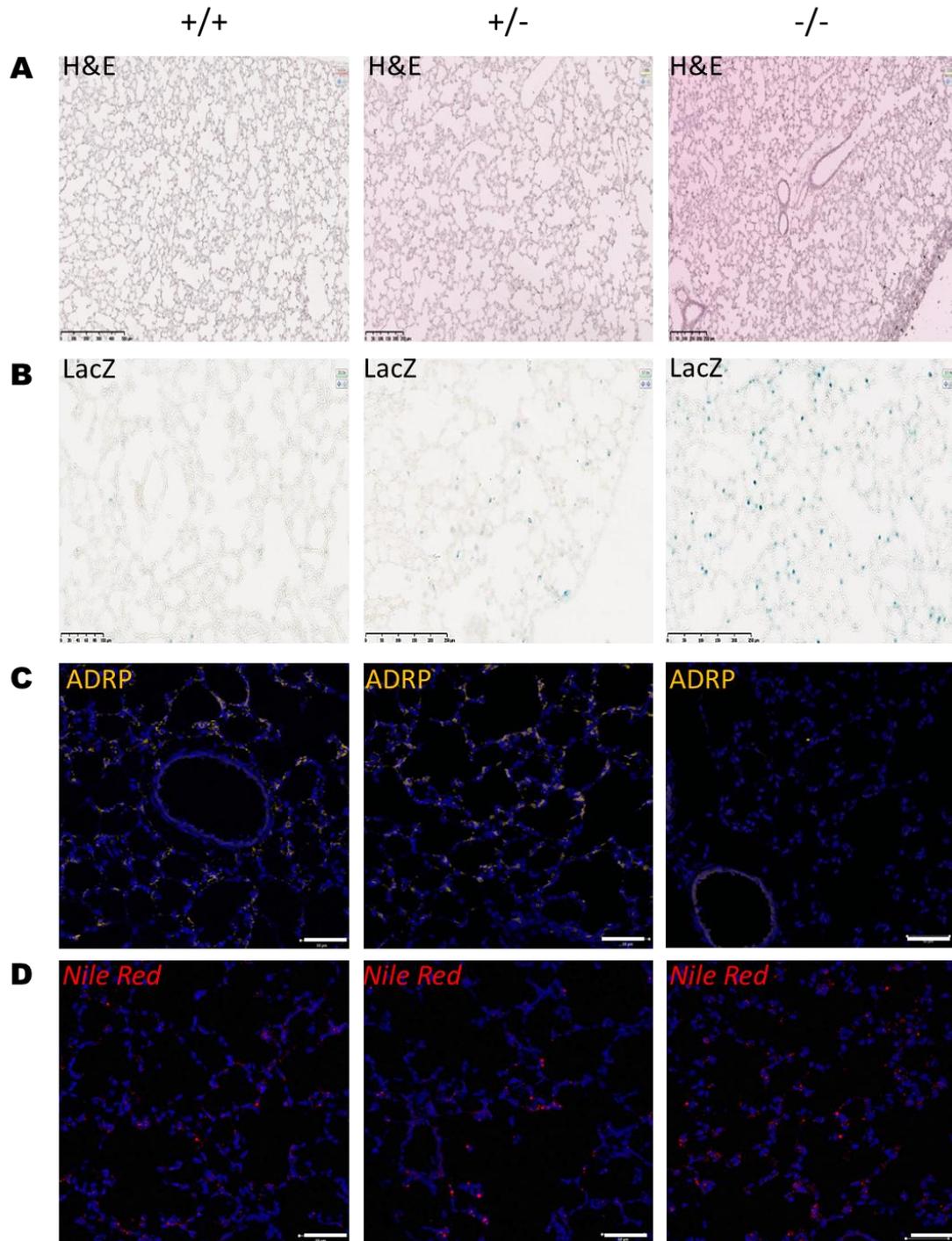


Abbildung 24: Histologische- und Immunfluoreszenzfärbungen der ADRPfloX (Plin2) Mäuse an P14.

A) Hämatoxilin und Eosin Färbung von Wildtyp Mäusen, sowie hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen. B) LacZ Färbung von Wildtyp Mäusen, sowie hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen. C) ADRP Immunfluoreszenzfärbung von Wildtyp Mäusen, sowie hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen. D) Nile Red-Färbung von Wildtyp Mäusen, sowie hetero- und homozygoten *Knockout*-Mäusen.

Orange: ADRP; rot: Nile Red; blau: Sytoxblau/Zellkerne. $+/+$ = Wildtyp; $+/-$ = heterozygoter *Knockout*; $-/-$ = homozygoter *Knockout*. Maßstab= 50 μm .

In dieser transgenen Mauslinie konnte zwar das Fehlen des Proteins sowohl mittels Western Blot als auch immunhistologisch nachgewiesen werden, allerdings konnten keine strukturellen oder funktionellen Auswirkungen des *ADRP Knockouts* gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Transgenes Tiermodell

Untersuchungen an transgenen Mäusen können maßgeblich dazu beitragen, unser Verständnis über embryonale Lungenentwicklung, Homöostase und Regeneration zu verbessern.

Zu Beginn der Arbeit mit transgenen Tieren wurden meist konstitutive Transgene mit zelltypspezifischen Promotoren genutzt. Oft führte dies zu embryonal letalen Phänotypen und dadurch zu limitierten Möglichkeiten für Studien an adulten Tieren. Die Entwicklung von konditionellen Transgenen lässt eine räumlich und zeitlich kontrollierbare Genexpression zu, wodurch sich das Problem der letalen Phänotypen minimiert. Zudem erlaubt diese Methode die Analyse von *Knockouts* spezifischer Gene, die Identifizierung von Vorläuferzellen und Studien über die Proliferation von Vorläuferzellen und deren Differenzierung⁷⁰.

Das Cre/loxP-System wurde in den 1980ern vorgestellt^{71, 72} und von *DuPont Pharmaceuticals* patentiert. Um eine zeitliche Kontrolle der Cre-Aktivität zu erreichen, wurden Fusionsproteine zwischen Cre und der Ligandenbindungsdomäne von Steroidhormonrezeptoren konstruiert. Die am häufigsten benutzte Variante ist eine Fusion zwischen Cre und einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (CreER^{T2})⁷³⁻⁷⁵. ER^{T2} bindet schwach an endogene Östrogene und hat eine starke Affinität zu 4-Hydroxy-tamoxifen (4OH-T), dem aktiven Metaboliten des synthetischen Steroids Tamoxifen. Der Nachteil dabei ist, dass Tamoxifen toxisch ist und die Verabreichung vor E11.5 zu verschiedenen embryonalen Phänotypen bzw. einer Fehlgeburt zu späteren Zeitpunkten führen kann⁷⁶. Zusätzlich kann Tamoxifen zu erhöhtem Blutdruck bei adulten Mäusen führen⁶⁴. Deshalb ist es unerlässlich die minimale Tamoxifendosis für jedes Experiment festzulegen.

Das CreER^{T2} Fusionsprotein ist zytoplasmatisch. Nachdem es an Tamoxifen gebunden hat, diffundiert das Protein in den Zellkern, wo es Zugang zu den loxP-Stellen auf der DNA hat. Die Rekombinationsrate kann sehr unterschiedlich sein, abhängig vom CreER^{T2} Expressionslevel⁷⁷ und von der Zeitspanne, in welcher sich das Protein im Kern befindet. Dies wiederum ist abhängig von der Tamoxifendosis und der Häufigkeit der Applikation. Studien zeigten, dass intraperitoneale Tamoxifeninjektion einer tragenden Maus, zur Reporteraktivität innerhalb der ersten 8 Stunden führte und die

Rekombination nach 24 Stunden abgeschlossen war⁷⁸. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Tamoxifen an tragende Weibchen über Futter, statt intraperitoneale Injektion, zu einer höheren Rekombinationsrate und geringerer Toxizität führte⁷⁹. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet, wäre aber eine Möglichkeit um die verschiedenen Zelltypen schon vor Geburt zu markieren und erst zu postnatalen Zeitpunkten zu untersuchen, ohne die Tiere durch Abort zu verlieren. Die optimale Dosis und Häufigkeit der Verabreichung von Tamoxifen muss für jede Mauslinie individuell getestet werden, um die größtmögliche Rekombinationsrate zu erreichen. Dies erfordert Geduld, Erfahrung und Pilotstudien bevor mit den eigentlichen Experimenten begonnen werden kann. Trotz dieser Limitierungen ist die Arbeit mit konditionellen Rekombinationssystemen unerlässlich, um Abläufe während der Lungenentwicklung und/oder -regeneration darzustellen und zu verstehen.

4.2 Charakterisierung PDGFR α -positiver Zellen

Wechselwirkungen zwischen dem *platelet derived growth factor-A* (PDGF-A) und dessen Rezeptor *platelet derived growth factor receptor alpha* (PDGFR α) spielen in der Lungenentwicklung eine wichtige Rolle. Sowohl das Fehlen des Rezeptors, als auch des Liganden führt zu einem Ausbleiben der sekundären Septierung in der sich entwickelnden Mauslunge. Mäuse ohne PDGF-A entwickeln zunächst normal ausgebildete terminale Aussackungen (sakkuläre Phase, E17.5-P5), doch die darauf folgende Alveolarisierung (alveoläre Phase, ab P5), bei der sich alveoläre Septen aus präalveolären Aussackungen erheben, bleibt aus. Neben fehlender Septierung kommt es außerdem zum Ausbleiben der Differenzierung von mesenchymalen Zellen, welche normalerweise *α -smooth muscle actin* (α SMA) besitzen und Elastin produzieren^{27, 28}. Signalwege zwischen PDGF-A/PDGFR α sind nicht nur für die Verzweigung der Lungenstruktur essentiell, sondern auch für Interaktionen zwischen Epithel und Mesenchym. PDGFR α wird während der pseudoglandulären Phase (E14.5-E16.5) stark in mesenchymalen Zellen, um die proximalen Abschnitte der luftleitenden Bronchioli exprimiert. Während der kanalikulären Phase (E16.5-E18.5) wandern die PDGFR α -positiven Zellen distal ins Mesenchym, wo sie bis zum Einsetzen der Alveogenese verbleiben. Die Umverteilung der PDGFR α -positiven Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Im PDGF-A *Knockout* bleibt diese Umverteilung aus, was auf eine PDGF-AA induzierte Proliferation und Migration dieser Zellen hin-

weist¹³. Auch in anderen Studien konnte eine Migration der PDGFR α -positiven Zellen nachgewiesen werden. McGowan *et al.* zeigten eine Umverteilung der Zellen von der Basis der Alveolen hin zum ringförmigen Eingang der Alveolen zwischen P4 und P8³⁰. Des Weiteren wurde gezeigt, dass FGF (*fibroblast growth factor*) zum Überleben und zur Ausbreitung einer Vorläuferzelle zwischen der pseudoglandulären und der kanalikulären Phase benötigt wird. Wird FGF durch einen Inhibitor gehemmt, ist die Ausbildung der peripheren Lunge gestört⁸⁰.

Zwischen den Wänden der Alveolen befinden sich die Interalveolarsepten, das Interstitium der Lunge. Es hält die Architektur der Lungenbläschen aufrecht und besteht hauptsächlich aus Fibroblasten. Diese bilden Strukturproteine und Substanzen wie Kollagen, elastische Fasern und Glycoproteine. Es gibt unterschiedliche Populationen interstitieller Lungenfibroblasten, basierend auf Thy-1 (CD90) Expression⁸¹, der Menge an intrazellulären neutralen Lipidtröpfchen⁸² oder der Anwesenheit von α -smooth muscle actin³⁴. Diese phänotypischen Varianten der Fibroblasten weisen Unterschiede in der PDGFR α Expression auf³¹. Kollagen I ist ein fibrilläres Kollagen und kommt in Haut, Knochen und der Lunge vor. Vimentin ist ein Typ 3-Intermediärfilament und damit ein Teil des Zytoskeletts der Wirbeltiere. Es kommt im Zytoplasma von Zellen mesenchymaler Herkunft vor. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Fibroblastenmarker Kollagen Typ I zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl mit Zellen starker PDGFR α als auch mit Zellen niedriger PDGFR α Expression kolokalisiert ist. Vimentin und PDGFR α sind ausschließlich in den glatten Muskelzellen der Bronchien, welche ebenfalls mesenchymalen Ursprungs sind, koexprimiert.

Des Weiteren wurden PDGFR α -exprimierende Zellen auf andere zellspezifische Marker, wie Phospho-Histon-H3, Surfactant Protein C (SPC), CD45 und Zytokeratin untersucht. Aufgrund einer engen Korrelation zwischen der mitotischen Chromatinkondensation und der Phosphorylierung des Histon-H3-Proteins, dient Phospho-Histon-H3 als Marker zum Nachweis proliferierender Zellen⁸³. SPC ist ein hydrophobes Membranprotein, welches die Ausbreitung des Surfactants auf der Alveolaroberfläche beschleunigt. Es wird von alveolären Typ II Zellen sekretiert. CD45 ist ein Oberflächenprotein auf Leukozyten und wird, bis auf Erythrozyten, auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts. Neben vielen anderen Aufgaben dienen sie der mechanischen Stabilisierung des Gewebes. Es konnte gezeigt werden, dass PDGFR α -positive Zellen in adul-

ten Mauslungen keinen dieser Marker exprimieren. PDGFR α -positive Zellen sind demnach Lungenfibroblasten mesenchymalen Ursprungs.

Studien zeigten, dass die Anzahl an PDGFR α -exprimierenden Zellen zwischen P4 und P12, also während der Alveolarisierung steigt³⁰, andere Untersuchungen dagegen ergaben eine Abnahme dieser Zellen an P8¹³. Auch in dieser Arbeit fielen die Ergebnisse konträr aus. FACS-Analysen zeigten eine deutliche Abnahme an PDGFR α -positiven Zellen zwischen E16.5 und P5, während Zytospindaten für eine Zunahme der Zellen zu Beginn der Alveolarisierung sprachen. Möglicherweise nehmen die PDGFR α -positiven Zellen zwar in ihrer Anzahl zu, aber im Zuge der Transdifferenzierung in Myo- und evtl. auch Lipofibroblasten in ihrer Expressionsstärke ab, so dass sie im FACS nicht mehr als positive Zellen gemessen werden. Oder die Mehrheit der PDGFR α -positiven Zellen transdifferenziert bereits vor Beginn der Alveolarisierung und verliert im Zuge dessen ihre Rezeptoraktivität.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PDGFR α -positiven Zellen auch in der adulten Mauslunge sowohl peribronchial als auch mesenchymal vorhanden sind. Bislang konnte nicht ausreichend geklärt werden, welche Rolle den PDGFR α -positiven Zellen in der adulten Lunge zukommt. Dienen sie als Stammzellen, welche bei regenerativem Lungenwachstum aktiviert werden, sich differenzieren und dadurch eine Neoalveolarisierung in Gang setzen können? Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl der PDGFR α -positiven Zellen drei Tage nach Pneumonektomie der linken Lunge signifikant ansteigt und nach 7 Tagen wieder abfällt. Diese Daten weisen auf rasche Veränderungen innerhalb der PDGFR α Population innerhalb der ersten Woche nach der Pneumonektomie hin⁸⁴. Neben vielen anderen Markern sind sowohl CD44 als auch CD105 in mesenchymalen Stammzellen der Lunge exprimiert⁸⁵. Es konnte kein Hinweis darauf erbracht werden, dass PDGFR α -positive Zellen Charakteristika mesenchymaler Stammzellen aufweisen. Aktuelle Studien dagegen zeigten, dass SPC-positive alveoläre Typ II-Zellen als alveoläre Vorläuferzellen und dauerhafte Stammzellen in der adulten Lunge dienen. PDGFR α -positive Zellen können deren Teilung und Differenzierung *in vitro* unterstützen⁸⁶. Andere Arbeiten beschreiben eine Subpopulation mesenchymaler Zellen mit bestimmten Charakteristika (CD45⁻, CD31⁻, *stem cell antigen-1*⁺) als residente Vorläuferzellen, welche wichtig für das Wachstum epithelialer Vorläufer *in vitro* sind⁸⁷. Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil dieser MSCs (mesenchymale Stammzellen) von FGF10-positiven Zellen abstammt⁸⁸. Die Charakteristika mesenchymaler Stammzellen sind demnach vielfältig und es herrscht

bislang wenig Verständnis zur Hierarchie der verschiedenen Zellen im Lungenmesenchym. Doch die tragende Rolle der PDGFR α -positiven Zellen während der Entwicklung, deren Präsenz in der adulten Mauslunge und deren Anstieg nach Schädigung des Gewebes weist auf eine Mitwirkung bei der Gewebshomöostase und -regeneration hin.

4.3 Myofibroblastendifferenzierung

Die glatte Muskulatur ist das kontraktile Gewebe vieler Hohlorgane, der Blut- und Lymphgefäße sowie anderer Strukturen. Die Zellen der glatten Muskulatur sind mesodermalen Ursprungs. In der Lunge gibt es hauptsächlich perivaskuläre (PVSMC) und peribronchiale (PBSMC) glatte Muskulatur. Die genaue Funktion von PBSMCs in gesunden Adulten ist unbekannt, stattdessen spielen sie in zahlreichen Lungenerkrankungen eine Rolle⁸⁹. Ihre Aufgabe während der Morphogenese ist ebenfalls nicht geklärt, sie scheinen aber wichtig für die Gewebskontraktion und Matrixsynthese zu sein⁹⁰. Es wird vermutet, dass PBSMCs einen Anteil an der Embryonalentwicklung der Lunge haben, indem sie einen durch Stretch erzeugten Signalweg in Gang setzen⁹¹ oder durch ihre Kontraktilität Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle freisetzen bzw. auf die Regulation der Genexpression einwirken und dadurch Zellwachstum oder Differenzierungsprozesse beeinflussen⁹². Während der Alveolarisierung gibt es auch im Parenchym Zellen welche *α -smooth muscle actin* exprimieren, die alveolären Myofibroblasten³². Sie wurden das erste Mal 1976 beschrieben, als ein intermediärer Zelltyp mit Charakteristika von Fibroblasten und glatten Muskelzellen⁹³. Diese kontraktile, interstitielle Zellen sind in den Spitzen der sekundären Septen lokalisiert und werden mit Elastin Ablagerungen assoziiert^{36,37,94}. Alveoläre Myofibroblasten sind essentiell für die postnatale Lungenentwicklung, ihr Fehlen bewirkt ein komplettes Ausbleiben der sekundären Septierung und damit der Alveolarentwicklung²⁷. Es wird vermutet, dass die Ablagerung von Elastin durch die Myofibroblasten die treibende Kraft zur Septumformierung während der Alveolarisierung darstellt. Studien zeigten, dass die alveolären Myofibroblasten sich aus den PDGFR α -positiven Zellen differenzieren, nachdem diese in der kanalikulären Phase der Lungenentwicklung ins distale Lungengewebe eingewandert sind^{13,27}.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich PDGFR α -positive Zellen sowohl in peribronchiale glatte Muskelzellen, als auch in alveoläre Myofibroblasten, jedoch nicht in perivaskuläre glatte Muskelzellen, transdifferenzieren können.

In der Literatur wird dies kontrovers diskutiert. Zum einen wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt; es wurde gezeigt, dass auch PBSMCs PDGFR α exprimieren, wenn auch in geringerem Maße. Daraus ergebe sich die Möglichkeit, dass PBSMCs und alveoläre Myofibroblasten eine Abstammungslinie teilen⁸⁹. Dagegen spricht allerdings, dass im PDGF-A *Knockout* sowohl peribronchiale, als auch perivaskuläre glatte Muskelzellen vorhanden sind²⁷. Es konnte gezeigt werden, dass sich FGF10-positive Zellen in peribronchiale⁹⁵ und perivaskuläre glatte Muskelzellen⁸⁸ differenzieren können. Auch im Krankheitsmodell konnte bewiesen werden, dass die Expression von α SMA in PDGFR α -positiven Fibroblasten durch alveoläre Regeneration induziert wird und FGF-*signaling* für die Myofibroblastendifferenzierung und Septierung benötigt wird⁹⁶. Andere Gruppen dagegen identifizierten eine Population mesenchymaler Zellen nahe dem Lungenhilum als Vorläufer der glatten Muskulatur der Atemwege⁹⁷. Anhand einer *Wilm's tumor protein 1 (Wt1)-Cre* Mauslinie propagieren Que *et al.* das Mesothelium als Quelle vaskulärer, aber nicht bronchialer glatter Muskelzellen⁹⁸. Im Gegensatz dazu zeigten Greif *et al.*, dass vaskuläre glatte Muskelzellen eher aus mesenchymalen PDGFR β -positiven Zellen als aus *Wt1*-positiven mesothelialen Zellen entstehen⁹⁹. Neuste Arbeiten dagegen bewiesen, dass *Wt1*-positive Zellen tatsächlich Vorläufer für PBSMC und PVSVC sind¹⁰⁰. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse dafür, dass diese Zellen mehrere Ursprünge haben und PDGFR α -positive Zellen, zumindest für PBSMCs, nur eine mehrerer möglicher Quellen sind. Für alveoläre Myofibroblasten dagegen konnten bislang keine anderen Vorläufer identifiziert werden und ein Fehlen dieser Zellen im PDGFR α /PDGF-A *Knockout* spricht dafür, dass diese Zellen ausschließlich aus PDGFR α -positiven Zellen generiert werden (Abbildung 25).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alveoläre Myofibroblasten im Gewebe erst zu Beginn der Alveolarisierung (P3-P5) zu identifizieren sind, sie stellen dann einen Anteil von etwa 3% an der Gesamtzellzahl dar. Allerdings scheint der Entwicklungsprozess bereits vor Geburt einzusetzen. Postnatal markierte PDGFR α -positive Zellen transdifferenzieren sich weder in alveoläre Myofibroblasten, noch in PBSMCs. Der Versuch die Zellen embryonal zu markieren scheiterte, da die Tamoxifeninjektion der tragenden Maus an E18.5 vermutlich die Geburt der Jungtiere auslöste und deshalb die Rekombination in kaum einer Zelle stattfand. Eine frühere Injektion war technisch nicht möglich, da Tamoxifen toxisch ist und einen Abort auslöste.

Die Linienverfolgung der glatten Muskelzellen (SMMHC^{CreERT2}) in dieser Arbeit zeigte, dass die rekombinierten Zellen PDGFR α zu Beginn der Alveolarisierung nur schwach, oder gar nicht exprimieren. Entweder wird in diesen Zellen die Rezeptoraktivität gerade erst angeschaltet, oder wird bereits wieder herunterreguliert, während sie in andere Zellen erst noch angeschaltet werden muss. Zum Zeitpunkt P14 dagegen war eine starke PDGFR α -Expression besonders in den Spitzen der sekundären Septen zu beobachten. Studien ergaben, dass es Unterschiede in der Proliferation, Apoptoseresistenz und α SMA-Expression zwischen Myofibroblasten mit variierendem PDGFR α -Expressionslevel gibt. Bis zum Zeitpunkt der maximalen Septierung (P12) existieren PDGFR α -exprimierende Myofibroblasten, danach verschwinden diese³¹. Andere Studien zeigten, dass sie zwar weniger proliferieren, aber verglichen mit den PDGFR α -negativen Myofibroblasten, resistenter gegen Apoptose sind. Eine exakte Regulierung von Proliferation und Apoptose gewährleiste eine ausreichende Präsenz der Myofibroblasten, um funktionsfähige, dünne Septen zu bilden³¹. Sowohl zum den Entwicklungszeitpunkten P4 als auch P12 erhöht PDGFR α die Neigung der Fibroblasten zu transdifferenzieren und α SMA zu exprimieren. Die Fibroblastenpopulation mit niedrigem PDGFR α -Level nimmt im Laufe der Alveolarisierung ab oder wird zu stark exprimierenden Fibroblasten. Dies könnte ein Vorteil während der Elongation der Septen sein und die Ausbildung einer reifen, Elastin beladenen Extrazellulärmatrrix unterstützen¹⁰¹.

4.4 Lipofibroblastendifferenzierung

Lungenlipofibroblasten wurden das erste Mal 1970 von O'Hare und Sheridan beschrieben¹⁰². Dieser Zelltyp ist im alveolären Interstitium, an der Basis der sich entwickelnden Septen, lokalisiert und wird durch seine zytoplasmatischen Lipideinlagerungen von anderen Zelltypen unterschieden^{103, 104}. Trotzdem ist die Nomenklatur der Lipofibroblasten nicht ganz eindeutig, da manche Eigenschaften mit denen anderer mesenchymaler Zellen wie Adipozyten, glatten Muskelzellen und Perizyten überlappen. Lipofibroblasten wurden umfangreich in Ratten charakterisiert, aber auch in Mäusen, Hamstern und Menschen beobachtet^{104, 105}. Lipofibroblasten sitzen in der Basis der sekundären Septen und sind vor und während der Septierung in großer Anzahl vorhanden und nehmen deutlich ab, wenn die Alveolarisierung abge-

geschlossen ist^{106, 107}. Dies lässt auf eine Rolle während der sekundären Septierung schließen, aber ihr Ursprung ist noch immer unbekannt.

ADRP wurde zunächst als ein Protein beschrieben, dessen mRNA hoch in Fettgewebe exprimiert ist und eine Rolle in der Adipozytendifferenzierung spielt^{39, 108}. ADRP ist auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen lokalisiert und dient als Marker für Lipidanhäufungen¹⁰⁹. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein ADRP in Lungenlipofibroblasten stark exprimiert wird⁴², deshalb wurde es in dieser Arbeit als Marker für Lipofibroblasten verwendet.

In Ratten konnten Lipofibroblasten ab der kanalikulären Phase (E16.5) nachgewiesen werden³⁸. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ADRP bereits zum frühesten getesteten Zeitpunkt (E12.5) nachgewiesen werden, aber eine spezifische Zuordnung des Proteins zu bestimmten Zellen war erst ab E18.5 möglich. Im Laufe der Lungenentwicklung nahm die ADRP Expression immer stärker ab und konnte im adulten Tier nur noch sehr schwach detektiert werden. Diese Daten gehen einher mit früheren Studien in denen bewiesen wurde, dass Lipofibroblasten während der Alveolarisierung zwar stärker proliferieren als Fibroblasten ohne Lipideinlagerungen, sie aber nach Abschluss der Septierung durch programmierten Zelltod abgebaut werden¹⁰⁷.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDGFR α -positive Vorläuferzellen zu Lipofibroblasten differenzieren können. Zytopspinanalysen legten aber die Vermutung nahe, dass diese Zellen nur einen Teil der Lipofibroblasten generieren.

Andere Studien zeigten, dass die Expression von PDGFR α direkt mit einer erhöhten Expression von α SMA und einer erniedrigten Expression der neutralen Lipide korreliert, was die Vermutung nahe legt, dass PDGFR α -positive Zellen eher Vorläufer alveolärer Myofibroblasten als von Lipofibroblasten sind³⁰. Aktuelle Studien dokumentieren FGF10-positive Zellen als Vorläufer von Lipofibroblasten⁸⁸. Zusammengekommen legen diese Daten nahe, dass Lipofibroblasten vielfältige Ursprünge besitzen, wovon PDGFR α -positive Zellen eine mögliche Quelle sind. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass alveoläre Typ II-Zellen in 3D-Kulturen Alveolosphären bilden können. Das Wachstum und die Differenzierung dieser Alveolosphären wird durch PDGFR α -positive Lipofibroblasten unterstützt⁸⁶, womit ihre tragende Rolle in der Lungenentwicklung erneut belegt wurde.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch nach weiteren Markern für Lipofibroblasten gesucht. Adiponektin ist ein anti-inflammatorisches Adipokin, welches proinflammatorische Zytokine inhibiert und anti-inflammatorische Zytokine induziert¹¹⁰.

Es gibt Studien die zeigten, dass es in der Lunge besonders bei COPD in Epithelzellen stark hochreguliert ist¹¹¹. In dieser Arbeit konnte Adiponektin allerdings nur in Endothelzellen nachgewiesen werden, deshalb wurde dies nicht weiter verfolgt. FABP4 bzw. Ap2 wurde ursprünglich als ein adipozytenspezifisches Protein identifiziert¹¹². Mittlerweile wurde es allerdings auch in Makrophagen¹¹³ und bronchialen Epithelzellen¹¹⁴ gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte FABP4 mittels Antikörper sowohl in den peribronchialen glatten Muskelzellen, als auch im Mesenchym lokalisiert und mit PDGFR α assoziiert werden. Die Ap2^{CreERT2} Mauslinie dagegen zeigte eine Rekombination ausschließlich in Makrophagen. Diese Ergebnisse schlossen sowohl Adiponektin als auch FABP4/Ap2 als Marker für Lipofibroblasten aus.

Mit dem Ziel, den Ursprung und die Differenzierungsprozesse der Lipofibroblasten verfolgen zu können, wurden in Kollaboration mit Dr. Marten Szibor, zwei induzierbare ADRP-Mauslinien hergestellt (siehe 2.2.1.1). Die eine Linie ist Doxyzyklin-induzierbar und trägt zusätzlich zur Tetrazyklinaktivator-Kassette einen gelben Fluoreszenzfarbstoff (YFP) hinter dem endogenen ADRP Promotor. Die andere Linie ist Tamoxifen-induzierbar und trägt zusätzlich einen roten Fluoreszenzfarbstoff (mCherry) hinter dem endogenen Promotor. Diese endogene Expression wurde zunächst in adulten Chimären beider Linien getestet. Es fanden sich sowohl mesenchymale Zellen als auch alveoläre Makrophagen mit Fluoreszenzmarkierung. Eine zusätzliche Antikörperfärbung auf ADRP zeigte, dass in beiden Mauslinien alle Zellen mit endogener Fluoreszenz auch mit dem ADRP-Antikörper angefärbt wurden. Zwar gab es auch Zellen, welche nur die Antikörperfärbung aufwiesen, was dadurch erklärt werden kann, dass in Chimären nur der halbe Chromosomensatz transgen ist, die andere Hälfte trägt Wildtypgene. Insgesamt war die endogene Expression in beiden Linien relativ schwach, vermutlich weil ADRP in adulten Mauslungen nicht sehr stark exprimiert wird.

Die Charakterisierung der Cre-induzierbaren ADRP-Mauslinie zeigte, dass postnatal mindestens drei verschiedene Zelltypen markiert werden: Alveoläre Makrophagen, interstitielle Monozyten und Lipofibroblasten. Für weitere Arbeiten mit dieser Linie könnten die zusätzlich markierten Immunzellen allerdings leicht mit einer CD45-Färbung ausgeschlossen werden. Eine Antikörperfärbung auf ADRP kolokalisierte nicht in allen Zellen mit der endogenen ADRP Expression. Ein Grund dafür könnte sein, dass zwischen Cre-Rekombination und Gewebsanalyse sechs Tage lagen und die Zellen den ADRP Promotor erst nach der Induktion aktiviert haben. Eine weitere Be-

gründung wäre, dass die Reportermauslinie nicht zu 100% rekombiniert oder die Tamoxifeninduktion zu gering war (siehe 4.1). Um diese neue Mauslinie weiter zu charakterisieren, wurden die Zellen auch zu einem embryonalen Zeitpunkt (E14.5) markiert und vier Tage später analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt alle rekombinierten Zellen ADRP-positiv und sowohl CD45- als auch α SMA-negativ waren. Allerdings konnten zu diesem frühen Zeitpunkt insgesamt deutlich weniger Zellen markiert werden als postnatal. Dies würde die Theorie unterstützen, dass Lipofibroblasten besonders während der Alveolarisierung in großer Zahl benötigt werden.

Eine Studie von Perl and Gale unterstützt die Theorie, dass Lipofibroblasten als Quelle alveolärer Myofibroblasten dienen⁹⁶. Experimente im Rahmen dieser Arbeit bezüglich dieser Fragestellung konnten keine Hinweise auf diesen Differenzierungsprozess liefern (Abbildung 25, roter Pfeil). Aktuelle Studien belegten dies und zeigten, dass auch die Lipofibroblasten, welche aus FGF10-positiven Zellen hervorgehen, nicht zu Myofibroblasten transdifferenzieren⁸⁸.

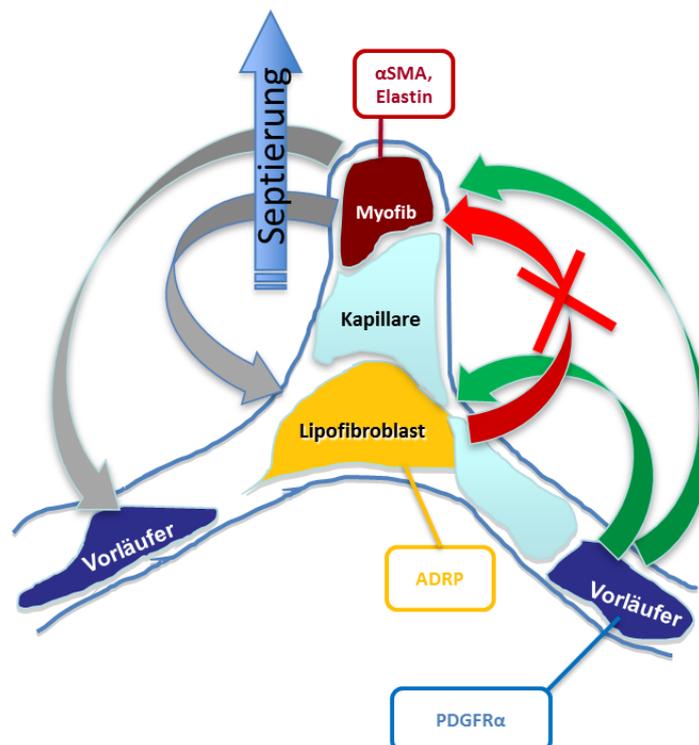


Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Liniendifferenzierung von Myo- und Lipofibroblasten ausgehend von ihren PDGFR α -positiven Vorläuferzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich PDGFR α -positive Zellen sowohl in Myo- als auch in Lipofibroblasten transdifferenzieren können (grüne Pfeile). Es konnten keine Hinweise darauf erbracht werden, dass Myofibroblasten auch aus Lipofibroblasten generiert werden (roter Pfeil). Weiter-

führende Studien sollen zeigen, ob sich die Fibroblastensubtypen während der Lungenregeneration zurück zu ihrer Vorläuferzelle entwickeln können (graue Pfeile).

4.5 ADRP *Knockout*

Während der Lungenentwicklung liegen mesenchymale Zellen in direkter Nachbarschaft zum Epithel, wo sie eine zentrale Rolle in dessen Wachstum¹¹⁵ und Differenzierung in Typ II-Zellen einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Triglyceride, welche die Typ II-Zellen zur Surfactantsynthese benötigen, von Lipofibroblasten stammen⁴⁴. Kurz vor Geburt nimmt die Menge an Triglyceriden in Fibroblasten 4-5-fach zu, in Typ II-Zellen dagegen nicht. Studien zeigten, dass Fibroblasten Triglyceride aktiv aufnehmen können, während Typ II-Zellen dazu nicht in der Lage sind. Da dieser Transfer durch einen anti-ADRP Antikörper gestoppt werden konnte, wurde dem Protein eine tragende Rolle in diesem Prozess zugesprochen⁴⁴. Weiterführende Arbeiten dagegen konnten keine Rolle für ADRP im Lipidtransfer nachweisen¹¹⁶.

In Kollaboration mit Dr. Marten Szibor, wurde eigens für diese Arbeit ein ADRP *Knockout* generiert. Dieser konnte sowohl mittels Western Blot, als auch immunhistologisch nachgewiesen werden.

Phänotypisch machte die *Knockout* Mäuse einen normalen Eindruck, sie waren fruchtbar und entwickelten sich ohne Auffälligkeiten. Auch die Morphologie des Lungengewebes zeigte keine Unterschiede im Vergleich zum heterozygoten Tier oder zum Wildtyp. Die Menge an Surfactant Protein C war ebenfalls nicht signifikant verändert, womit auch in dieser Arbeit keine Rolle von ADRP in der Surfactantsynthese nachgewiesen werden konnte. Eine Nile Red Färbung, welche nicht speziell auf ADRP abzielt, sondern allgemein Lipidtröpfchen anfärbt, zeigte dagegen sowohl im Wildtyp, als auch im hetero- und homozygoten Tier etwa gleiche Mengen an Lipideinlagerungen. Neben ADRP gibt es noch zwei weitere Proteine, welche die intrazellulären Lipidtröpfchen ummanteln, Perilipin und TIP47. Zusammen bilden sie die PAT (Perilipin, ADRP, TIP47) Familie^{117, 118}. Alle drei besitzen ein gemeinsames Sequenzmotiv, welches ein konserviertes Muster für Lipidspeicherproteine darstellt und sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten gefunden wurde. Dies spricht dafür, dass alle Proteine vom gleichen Ursprunggen abstammen¹¹⁹. Dass trotz eines Fehlens von ADRP Lipidtröpfchen und damit Lipofibroblasten in der Lunge nachgewiesen werden konnten, spricht dafür, dass die Aufgaben von ADRP von einem der

beiden anderen Proteine übernommen wurden. Das würde auch erklären, warum ein Ausschalten von ADRP keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung der Tiere hatte. Damit konnte gezeigt werden, dass sich das Protein ADRP zwar als Marker für Lipofibroblasten eignet und verwendet werden kann, um die Zellen in ihrer Entwicklung zu verfolgen, doch um die Rolle von Lipofibroblasten während der Lungenentwicklung zu untersuchen, reicht es nicht aus, ADRP auszuschalten. Für funktionelle Studien müssten Lipofibroblasten beispielsweise mittels Diphteriatoxin abgetötet werden (siehe 4.6).

4.6 Ausblick

Bislang konnten die genauen Transdifferenzierungsprozesse von Fibroblastensubtypen aus deren vermeintlichen PDGFR α -positiven Vorläuferzellen während der Lungenentwicklung und auch im adulten Regenerationsmodell nicht vollständig geklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDGFR α -positive Zellen sowohl in alveoläre Myofibroblasten als auch in peribronchiale glatte Muskelzellen differenzieren. Auch für einen Teil der Lipofibroblasten konnten die PDGFR α -positiven Zellen als Vorläufer identifiziert werden. Ob diese Differenzierungsprozesse auch auf umgekehrtem Wege möglich sind, zum Beispiel wenn sich die Lunge nach einer Krankheit regeneriert, ist bislang unbekannt (Abbildung 25, graue Pfeile). Um die genauen Aufgaben der einzelnen Zelltypen während der Lungenentwicklung und -regeneration herauszufinden, bietet sich als relativ einfach durchführbare und effiziente Methode ein *Knockout* der einzelnen Zelltypen an. Für die PDGFR α -positiven Zellen besteht zum einen die Möglichkeit, den Rezeptor mittels einer geflochten PDGFR α -Maus, verpaart mit einer ubiquitären CreER-Maus, auszuschalten. Andere transgene Linien (PDGFR α ^{CreERT2} x stop/floxDTA) machen es möglich, die Zellen durch die Expression von Diphteriatoxin (DTA), zu einem gewünschten Zeitpunkt, abzutöten. Beide Möglichkeiten haben allerdings den Nachteil, dass PDGFR α nicht nur in der Lunge, sondern in allen Organen ausgeschaltet wird. Dies könnte, zumindest in der Entwicklung zum Problem werden, da PDGFs unter anderem auch an der kardiovaskulären Entwicklung und an der Bildung der Nierenglomeruli beteiligt sind. Um den Ursprung und die Transdifferenzierungsprozesse der Lipofibroblasten weiter zu verfolgen, eignen sich die neu konstruierten ADRP^{CreERT2} und ADRP^{tTA} Mauslinien. Die ADRP^{tTA} Linie muss zunächst mit einer entsprechenden Reportermauslinie (tet-O-GFP, tet-O-LacZ) verpaart und auf Effizienz und die richtige Dosierung von

Doxyzyklin getestet werden. Die $ADRP^{CreERT2}$ Mauslinie wurde bereits zu verschiedenen Zeitpunkten getestet und es stellte sich heraus, dass neben Lipofibroblasten auch Immunzellen markiert werden. Diese Zellen lassen sich aber mit Hilfe einer CD45-Färbung leicht ausschließen. Zur Charakterisierung der Lipofibroblasten sollen diese in Zukunft auch mittels FACS *Sorting* isoliert und in Zellkultur genommen werden. Um die Rolle der Lipofibroblasten in der Lungenentwicklung oder –regeneration zu untersuchen, könnten die Zellen mit Hilfe der stop/floxDTA-Mauslinie gezielt abgetötet werden. Da ein *ADRP Knockout* scheinbar keinen veränderten Phänotyp besitzt, könnte mit einem Abtöten der Zellen deren Notwendigkeit bewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Lungenkrankheiten, wie die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD) oder Fibrose, welche irreversible Schädigungen des Lungengerüsts verursachen, nehmen stetig zu. Für das Jahr 2020 projiziert die WHO COPD als dritthäufigste Todesursache der westlichen Welt. Bislang ist eine Lungentransplantation die einzige Therapieform, doch Organe sind nicht für alle Patienten verfügbar. Da diese Krankheiten mit dem Verlust der Alveolarsepten, oder deren Verdickung einhergehen, ist es von großer Bedeutung, den Prozess der Septumneubildung genau zu untersuchen und zu verstehen, um neue Therapieansätze entwickeln zu können. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen an der Septierung beteiligt sind. Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblastensubtypen interagieren während der Lungenentwicklung miteinander. Aber ihre genaue Funktion und Differenzierung ist bislang unbekannt.

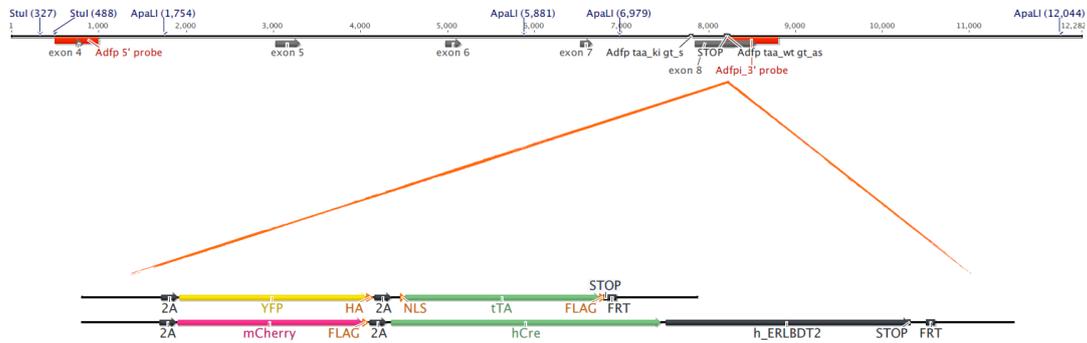
Ziel dieser Arbeit war es, die Transdifferenzierungsprozesse von Lipo- und Myofibroblasten, ausgehend von ihren PDGFR α -positiven Vorläuferzellen, zu untersuchen. Die Linienverfolgung der einzelnen Zelltypen erfolgte mittels des induzierbaren Cre/loxP-Systems, außerdem wurde die endogene PDGFR α -Expression zu verschiedenen Zeitpunkten eingehend untersucht. Dabei konnte bewiesen werden, dass sich im Zuge der Lungenentwicklung PDGFR α -positive Vorläuferzellen in peribronchiale glatte Muskelzellen, alveoläre Myofibroblasten, Lipofibroblasten und perivaskuläre/peribrochiale Fibroblasten differenzieren können. An der Bildung von Gefäßmuskelzellen sind sie nicht beteiligt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus postnatalen PDGFR α -positiven Zellen zwar Lipofibroblasten entstehen können, jedoch keine Myofibroblasten. Zudem konnte im Rahmen dieser Experimente nur ein Teil der Lipofibroblasten markiert werden, was darauf hinweist, dass es einen weiteren Vorläuferzelltyp gibt. Zwar sind noch viele weitere Experimente notwendig, um den Ursprung und die Entwicklung dieser Zelltypen aufzuklären, aber die Ergebnisse dieser Arbeit definieren eine neue Subpopulation von Lipo- und Myofibroblasten, welche nun weiter untersucht werden können, um ihre exakte Rolle in der Lungenentwicklung und -regeneration zu klären. Ein Verständnis dieser komplexen Prozesse könnte neue Therapieansätze zur Heilung oder Verbesserung von Lungenkrankheiten liefern.

6 Summary

Lung diseases, that cause irreversible destruction of gas exchange regions like chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and fibrotic lung diseases, represent a significant and increasing burden. For the year 2020 the WHO projects COPD as the third leading cause of death in the western world. Currently there are no curative therapeutic strategies for pulmonary structural diseases. Lung transplantation remains the only option which might provide some life prolonging effect for some patients, but is not available for all patients. Since these diseases go along with alveolar septum degradation or thickening, the understanding of alveolar septum formation is essential to develop new therapeutic regenerative strategies. It has been shown that a variety of different cell types interact to enable septum formation. Epithelial and endothelial cells, as well as fibroblast subtypes have been identified during lung development. But their interaction and function still remains to be clarified.

The aim of this work was to evaluate the transdifferentiation processes of lipo- and myofibroblasts starting from their potential PDGFR α -positive precursor using a Cre/loxP driven lineage tracing approach. The PDGFR α expression was investigated using PDGFR α ^{GFP} mice expressing the reporter green fluorescent protein from the endogenous PDGFR α -locus. It has been shown that in normal lung development PDGFR α -expressing precursor cells differentiate into peribronchial smooth muscle cells, alveolar myofibroblasts, lipofibroblasts and perivascular/peribronchial fibroblasts. They do not contribute to vascular smooth muscle cells. Additionally the results indicate that postnatal PDGFR α -positive cells can give rise to lipofibroblasts, but not to myofibroblasts. Since not all lipofibroblasts were labelled by this lineage tracing, a further progenitor cell type has to be suggested. Further studies are clearly needed to elucidate these potential different originating cell types. Our results define a subpopulation of lipofibroblasts and myofibroblasts which can be further analyzed for potential differentiation and function in pulmonary diseases and regeneration to reveal new therapeutic targets.

7 Anhang I

Abbildung 26: ADRP^{tTA}/CreERT2 *Knock-in*.

Genkarte des ADRP Locus mit Insertion der modifizierten Sequenz.

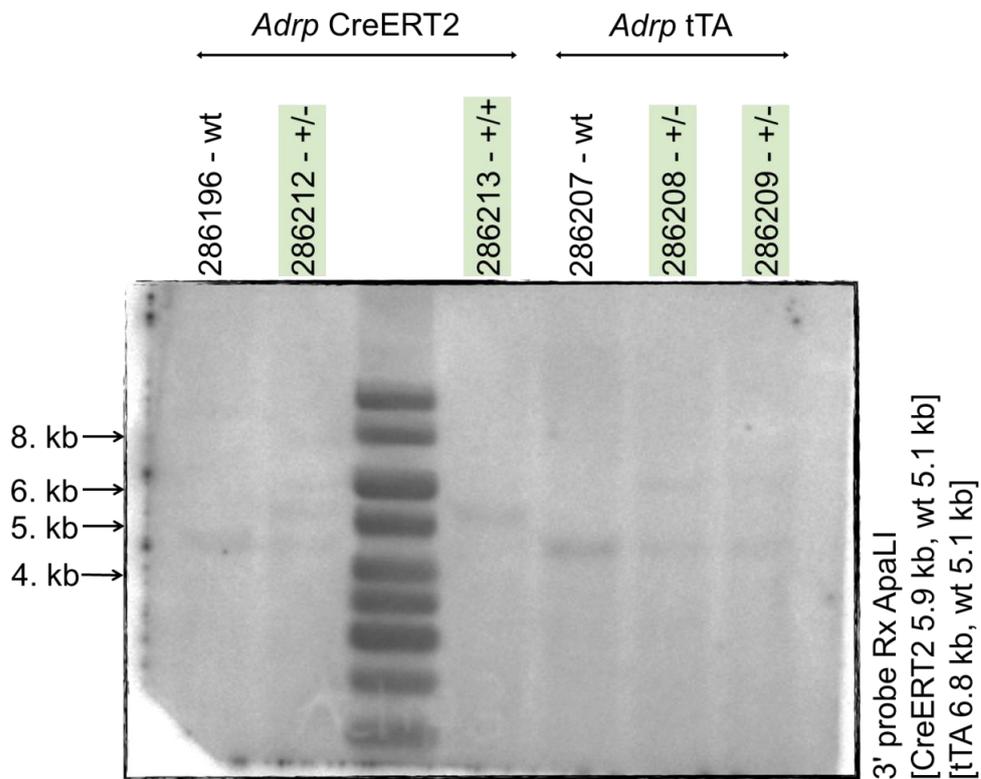


Abbildung 27: Southern Blot Analyse aus Schwanzbiopsien

Erwartete Fragmentgröße für ADRP^{CreERT2}: 5,9 kb, Wildtyp 5,1 kb; erwartete Fragmentgröße für ADRP^{tTA}: 6,8 kb, Wildtyp 5,1 kb. wt= Wildtyp; +/- = heterozygotes Tier; +/+ = homozygotes Tier. Die Southern Blot Analysen wurden von Dr. Marten Szibor durchgeführt.



Abbildung 28: Genotypisierung der ADRPfloxed (Plin2) Mauslinie.

For + rev: Wildtyp = 358 bp, Mutante = 304 bp; For + reverse: Bande wenn β -Galaktosidase/Neomycin Kasette vorhanden. M = 100 bp DNA Marker, p = Positivkontrolle, n = Negativkontrolle.

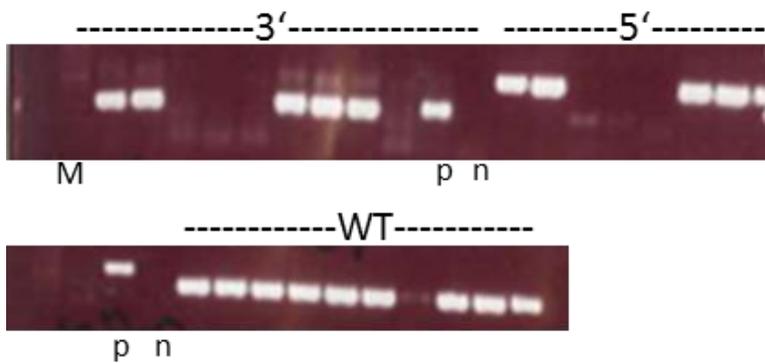


Abbildung 29: Genotypisierung der ADRP^{CreERT2} Mauslinie.

Adfp taa hERLBS + Adfp taa wt as: 3' = 315 bp; Adfp taa ki s + Adfp mCh as: 5' = 584 bp; Adfp taa ki s + Adfp taa wt as: Wildtyp = 441 bp. M = 100 bp DNA Marker, p = Positivkontrolle, n = Negativkontrolle.



Abbildung 30: Genotypisierung der *flp-deleter* Mauslinie.

For + rev: 741 bp. M = 100 bp DNA Marker, p = Positivkontrolle, n = Negativkontrolle.

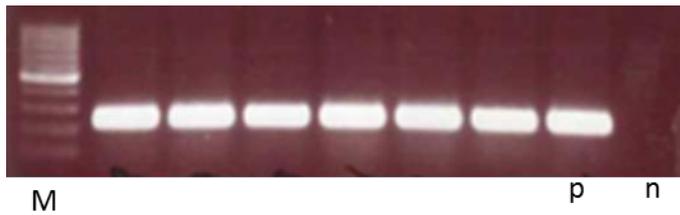


Abbildung 31: Genotypisierung der mT/mG Mauslinie.

WT for + WT rev + Mut rev: Wildtyp= 330 bp, Mutante= 250 bp. M= 100 bp DNA Marker, p= Positivkontrolle, n= Negativkontrolle.

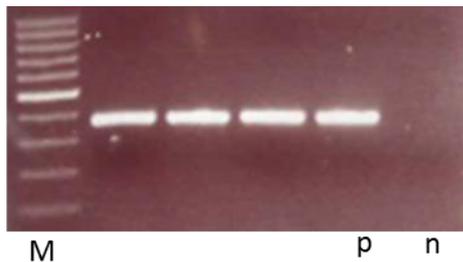


Abbildung 32: Genotypisierung der PDGFR α ^{Cre} Mauslinie.

Cre for + Cre rev: 374 bp. M= 100 bp DNA Marker, p= Positivkontrolle, n= Negativkontrolle.

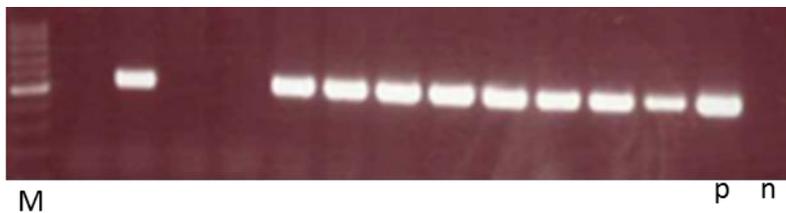


Abbildung 33: Genotypisierung der PDGFR α ^{CreERT2} Mauslinie.

Cre up + Cre low: 500 bp. M= 100 bp DNA Marker, p= Positivkontrolle, n= Negativkontrolle.

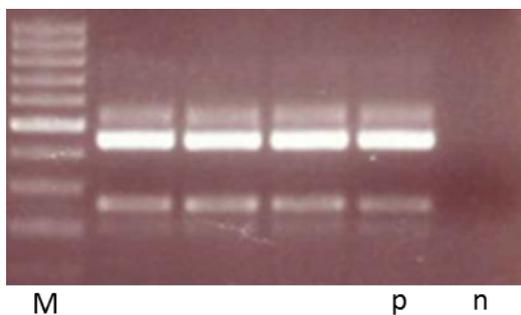


Abbildung 34: Genotypisierung der PDGFR α ^{GFP} Mauslinie.

WT for + WT rev + Mut for: Wildtyp= 451 bp, Mutante= 242 bp. M= 100 bp DNA Marker, p= Positivkontrolle, n= Negativkontrolle.

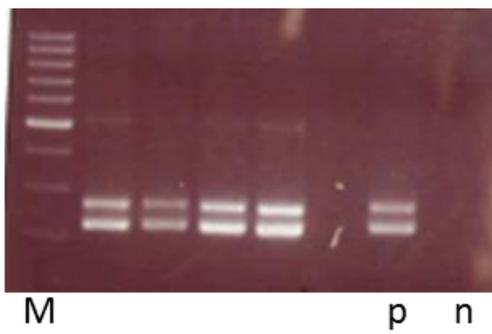


Abbildung 35: Genotypisierung der SMMHC^{CreERT2} Mauslinie.

SMWT1 + SMWT2 + phCREAS1: Interne Positivkontrolle= 324 bp, Transgen= 287 bp. M= 100 bp DNA Marker, p= Positivkontrolle, n= Negativkontrolle.

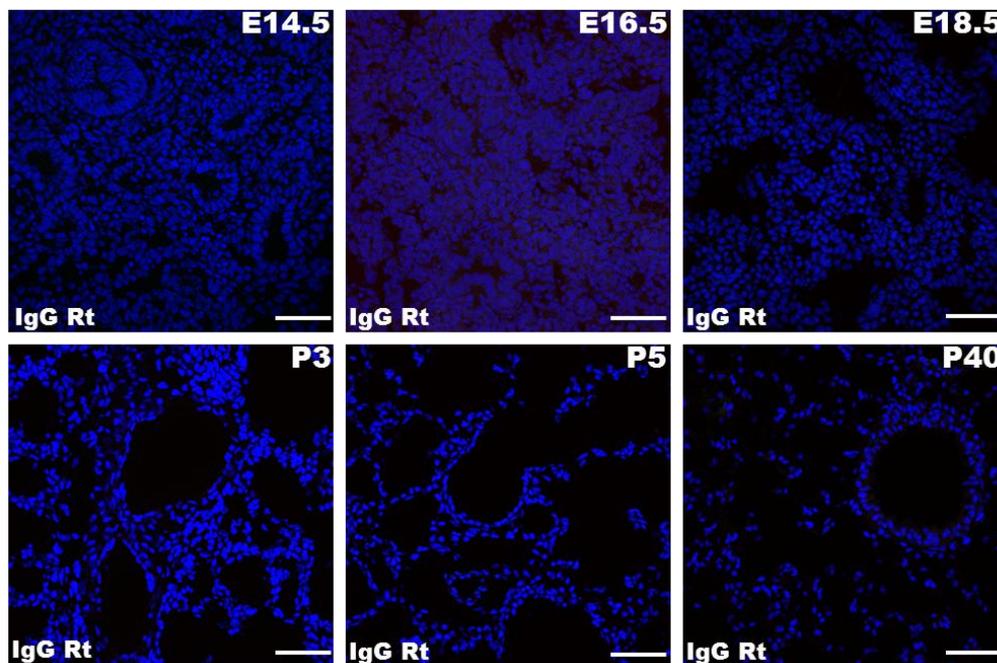


Abbildung 36: Negativkontrollen zu Abbildung 8.

IgG Ratte in GFP-negativen Tieren. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 µm.

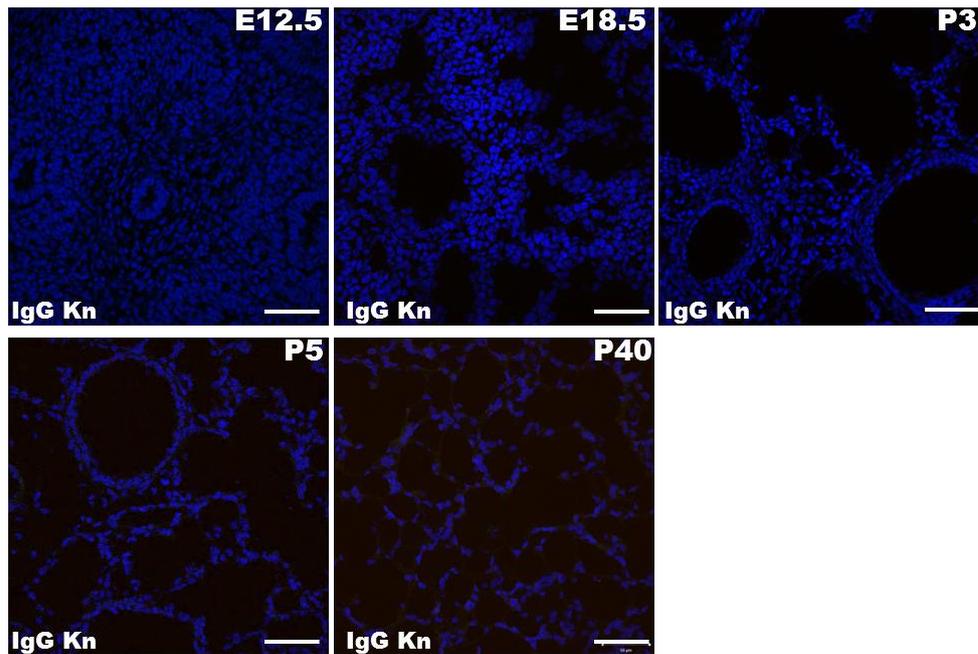


Abbildung 37: Negativkontrollen zu Abbildung 9.

IgG Kaninchen in GFP-negativen Tieren. E= Embryonal, P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

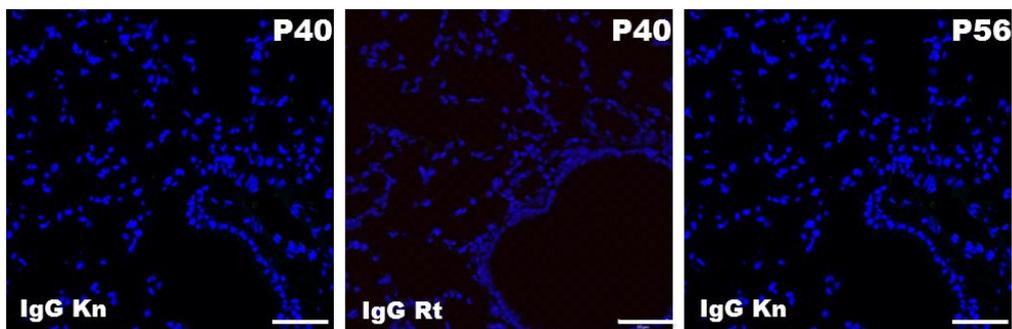


Abbildung 38: Negativkontrollen zu Abbildung 11.

IgG Kaninchen und IgG Ratte in GFP negativen Tieren. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

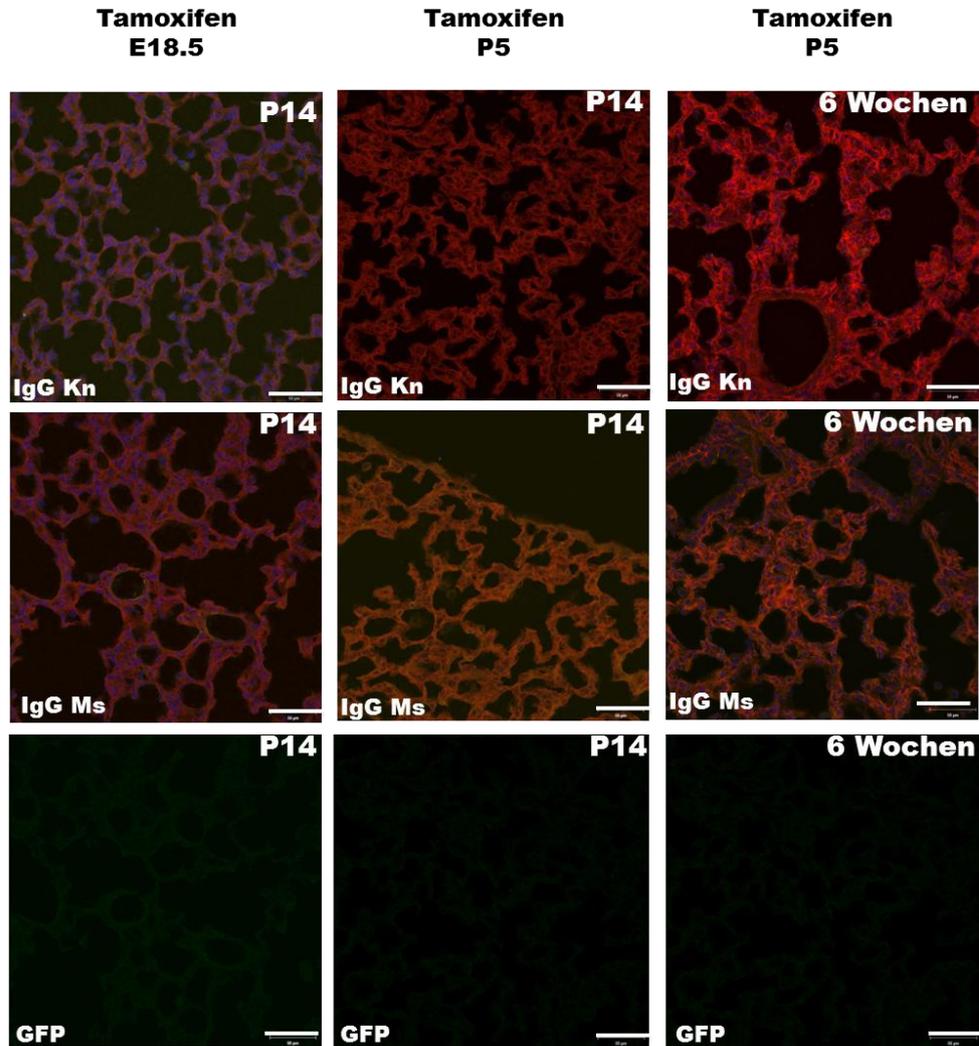


Abbildung 39: Negativkontrollen zu Abbildung 16.

Obere und mittlere Reihe: IgG Kaninchen und IgG Maus zu den verschiedenen Zeitpunkten in Cre-negativen Tieren. Untere Reihe: GFP-Kanal nach GFP-FITC Antikörperfärbung in Cre-negativen Tieren. P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

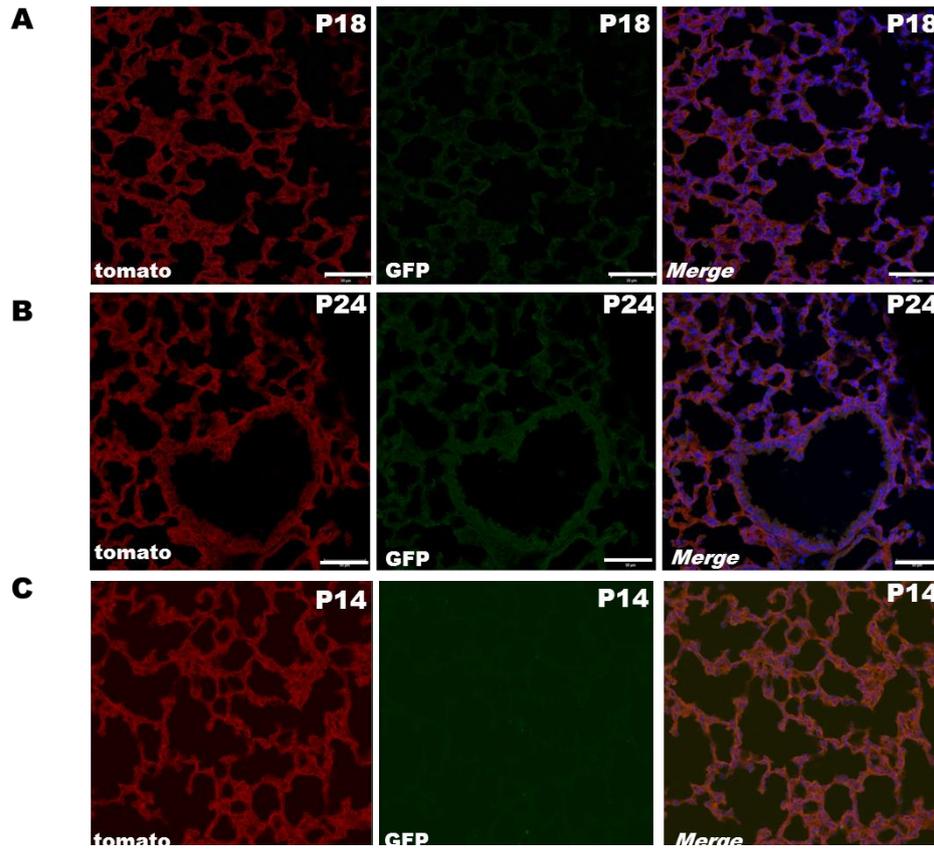


Abbildung 40: Negativkontrollen zu den Abbildungen 15, 17 und 21.

Bei diesen Kontrollen für alle Tamoxifen-induzierbaren Linien handelt es sich um CreERT2;mT/mG heterozygote Tiere ohne Tamoxifenapplikation. A) PDGFR α ^{CreERT2};mT/mG Mauslinie. B) ADRP^{CreERT2};mT/mG Mauslinie. C) SMMHC^{CreERT2};mT/mG Mauslinie.

P= Postnatal. Die Ziffer bezeichnet den Tag des jeweiligen Entwicklungszeitpunkts. Maßstab= 50 μ m.

Tabelle 8: Werte zu den Graphen in Abbildung 13.

	Zeitpunkt	Relative Anzahl [%]
PDGFR α	E16.5	7,31
	E18.5	7,76
	P2	7,56
	P5	4,06
	P14	8,72
ADRP	E16.5	9,5
	E18.5	8,22
	P2	4,19
	P5	5,01
	P14	2,2
α SMA	E16.5	2,94
	E18.5	6,0
	P2	3,08
	P5	4,03
	P14	1,97
PDGFR α + ADRP	E16.5	13,61
	E18.5	4,67
	P2	1,21
	P5	2,33
	P14	2,04
PDGFR α + α SMA	E16.5	2,56
	E18.5	1,88
	P2	1,05
	P5	3,69
	P14	0,07
α SMA + ADRP	E16.5	0,5
	E18.5	0,3
	P2	0,06
	P5	0,05
	P14	0
PDGFR α + ADRP + α SMA	E16.5	1,36
	E18.5	0,45
	P2	0,11
	P5	0,2
	P14	0,005

Tabelle 9: Statistische Analysen zu den Graphen in Abbildung 13.

	Zeitpunkt	Mittlere Diff.	q	Signifikant P<0.05?	Zusammenfassung
PDGFR α	E16.5 vs E18.5	-0,45	-	No	ns
	E16.5 vs P2	-0,35	-	No	ns
	E16.5 vs P5	-3,26	5,37	Yes	***
	E16.5 vs P14	-1,40	2,16	No	ns
	E18.5 vs P2	-0,1	-	No	ns
	E18.5 vs P5	-3,71	6,11	Yes	***
	E18.5 vs P14	-0,95	-	No	ns
	P2 vs P5	-3,61	6,77	Yes	***
	P2 vs P14	-1,05	-	No	ns
	P5 vs P14	-4,66	7,68	Yes	***
ADRP	E16.5 vs E18.5	-1,28	1,88	No	ns
	E16.5 vs P2	-5,22	8,57	Yes	***
	E16.5 vs P5	-4,49	7,03	Yes	***
	E16.5 vs P14	-7,3	10,70	Yes	***
	E18.5 vs P2	-3,95	6,47	Yes	***
	E18.5 vs P5	-3,21	5,02	Yes	***
	E18.5 vs P14	-6,02	8,82	Yes	***
	P2 vs P5	-0,74	1,33	No	ns
	P2 vs P14	-2,07	3,39	Yes	*
P5 vs P14	-2,82	4,41	Yes	**	
α SMA	E16.5 vs E18.5	-3,06	7,72	Yes	***
	E16.5 vs P2	-0,26	-	No	ns
	E16.5 vs P5	-1,08	2,91	No	ns
	E16.5 vs P14	-0,97	2,45	No	ns
	E18.5 vs	-2,81	7,91	Yes	***

	P2				
	E18.5 vs P5	-1,98	5,34	Yes	***
	E18.5 vs P14	-4,04	10,17	Yes	***
	P2 vs P5	-0,82	-	No	ns
	P2 vs P14	-1,23	3,46	Yes	*
	P5 vs P14	-2,05	5,53	Yes	***
PDGFR α + ADRP	E16.5 vs E18.5	-8,93	14,77	Yes	***
	E16.5 vs P2	-12,40	22,92	Yes	***
	E16.5 vs P5	-11,28	19,94	Yes	***
	E16.5 vs P14	-11,56	19,12	Yes	***
	E18.5 vs P2	-3,47	6,41	Yes	***
	E18.5 vs P5	-2,35	4,15	Yes	**
	E18.5 vs P14	-2,63	4,35	Yes	**
	P2 vs P5	-1,12	2,25	No	ns
	P2 vs P14	-0,83	-	No	ns
	P5 vs P14	-0,29	-	No	ns
PDGFR α + α SMA	E16.5 vs E18.5	-0,68	2,14	No	ns
	E16.5 vs P2	-1,51	5,34	Yes	***
	E16.5 vs P5	-1,14	3,84	Yes	**
	E16.5 vs P14	-2,48	7,87	Yes	***
	E18.5 vs P2	-0,83	2,95	Yes	*
	E18.5 vs P5	-1,81	6,13	Yes	***
	E18.5 vs P14	-1,81	5,73	Yes	***
	P2 vs P5	-2,64	10,19	Yes	***
	P2 vs P14	-0,98	3,45	Yes	*
P5 vs P14	-3,62	12,25	Yes	***	
α SMA + ADRP	E16.5 vs E18.5	-0,2	2,76	No	ns
	E16.5 vs P2	-0,44	6,89	Yes	***
	E16.5 vs	-0,45	6,62	Yes	***

	P5				
	E16.5 vs P14	-0,5	6,95	Yes	***
	E18.5 vs P2	-0,24	3,8	Yes	**
	E18.5 vs P5	-0,25	3,67	Yes	*
	E18.5 vs P14	-0,3	4,19	Yes	*
	P2 vs P5	-0,002	-	No	ns
	P2 vs P14	-0,06	0,88	No	ns
	P5 vs P14	-0,05	-	No	ns
PDGFR α + ADRP + α SMA	E16.5 vs E18.5	-0,91	6,29	Yes	***
	E16.5 vs P2	-1,25	9,72	Yes	***
	E16.5 vs P5	-1,16	8,58	Yes	***
	E16.5 vs P14	-1,35	9,4	Yes	***
	E18.5 vs P2	-0,35	-	No	ns
	E18.5 vs P5	-0,25	-	No	ns
	E18.5 vs P14	-0,45	3,11	No	ns
	P2 vs P5	-0,1	-	No	ns
	P2 vs P14	-0,1	-	No	ns
	P5 vs P14	-0,2	-	No	ns

Tabelle 10: Werte zu dem Graphen in Abbildung 14.

	Relative Anzahl [%]
GFP	8,56
ADRP	7,21
α SMA	7,67
GFP + ADRP	1,18
GFP + α SMA	2,54

Tabelle 11: Werte und statistische Analysen zu den Graphen in Abbildung 16.

	Tamoxifen Injektion	Relative Anzahl [%]	Signifikanz
GFP	E18.5	1,45	*
	P2	3,34	
	P5	8,09	
	P5 (6 Wo- chen)	6,54	
ADRP	E18.5	3,95	***
	P2	9,86	
	P5	3,37	
	P5 (6 Wo- chen)	7,46	
α SMA	E18.5	6,88	***
	P2	3,45	
	P5	8,39	
	P5 (6 Wo- chen)	2,71	
GFP + ADRP	E18.5	0,26	ns
	P2	1,29	
	P5	0,14	
	P5 (6 Wo- chen)	0,85	
GFP + α SMA	E18.5	0	ns
	P2	0,15	
	P5	0,13	
	P5 (6 Wo- chen)	0,17	

Tabelle 12: Werte zu dem Graphen in Abbildung 18.

	Zeitpunkt	Relative Anzahl [%]
GFP	P3	8,71
	P5	9,24
	P14	11,39
ADRP	P3	8,21
	P5	7,56
	P14	7,77
PDGFR α	P3	2,97
	P5	2,99
	P14	2,98
GFP + ADRP	P3	0,84
	P5	1,15
	P14	0,68
GFP + PDGFR α	P3	0,36
	P5	0,6
	P14	2,36

Tabelle 13: Statistische Analysen zu dem Graphen in Abbildung 18.

	Zeitpunkt	Mittlere Diff.	q	Signifikant P<0.05?	Zusammenfassung
GFP	P3 vs P5	-0,53	-	No	ns
	P3 vs P14	-2,68	3,27	No	ns
	P5 vs P14	-2,15	-	No	ns
ADRP	P3 vs P5	-0,66	0,89	No	ns
	P3 vs P14	-0,44	-	No	ns
	P5 vs P14	-0,21	-	No	ns
PDGF R α	P3 vs P5	-0,02	0,07	No	ns
	P3 vs P14	-0,008	-	No	ns
	P5 vs P14	-0,02	-	No	ns
GFP + ADRP	P3 vs P5	-0,3	-	No	ns
	P3 vs P14	-0,21	-	No	ns
	P5 vs P14	-0,51	2,43	No	ns
GFP + PDGF R α	P3 vs P5	-0,24	1,62	No	ns
	P3 vs P14	-2,0	13,38	Yes	***
	P5 vs P14	-1,76	10,95	Yes	***

8 Anhang II

8.1 Literaturverzeichnis

1. Campbell NA. *Biologie*. Spektrum; 2000.
2. S. Silbernagel AD. *Taschenatlas physiologie*. 2007.
3. Eckert R. *Tierphysiologie*. 2002.
4. Clauss W. CC. *Tierphysiologie kompakt*. Spektrum Akademischer Verlag; 2007.
5. Tenhaveopbroek AAW. Lung development in the mouse embryo. *Exp Lung Res*. 1991;17:111-130
6. <http://www.embryology.ch>
7. Burri PH. Fetal and postnatal-development of the lung. *Annual review of physiology*. 1984;46:617-628
8. Kinane TB. Lung development and implications for hypoplasia found in congenital diaphragmatic hernia. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*. 2007;145C:117-124
9. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biology of the neonate*. 2006;89:313-322
10. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Archives of disease in childhood*. 1960;35:544-547
11. Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM. Postnatal growth of the mouse lung. *Journal of anatomy*. 1977;124:131-151
12. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol-Lung C*. 2008;294:L246-L254
13. Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, Betsholtz C. Alveogenesis failure in pdgf-a-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*. 1997;124:3943-3953
14. Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2001;23:494-507
15. Ataliotis P, Symes K, Chou MM, Ho L, Mercola M. Pdgf signalling is required for gastrulation of xenopus laevis. *Development*. 1995;121:3099-3110
16. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. *Science*. 1997;277:242-245
17. Schattemann GC, Loushin C, Li T, Hart CE. Pdgf-a is required for normal murine cardiovascular development. *Developmental biology*. 1996;176:133-142
18. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for pdgf b show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & development*. 1994;8:1875-1887
19. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in pdgf beta-receptor mutant mice. *Genes & development*. 1994;8:1888-1896
20. Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney international*. 1997;51:438-443
21. Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, Bowenpope DF. Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human-endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. 1986;103:1129-1133
22. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*. 1999;79:1283-1316

23. Padela S, Cabacungan J, Shek S, Belcastro R, Yi M, Jankov RP, Tanswell AK. Hepatocyte growth factor is required for alveologenesis in the neonatal rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:907-914
24. Padela S, Yi M, Cabacungan J, Shek S, Belcastro R, Masood A, Jankov RP, Tanswell AK. A critical role for fibroblast growth factor-7 during early alveolar formation in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 2008;63:232-238
25. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. Fgfr-3 and fgfr-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development.* 1998;125:3615-3623
26. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2000;279:L600-607
27. Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellstrom M, GebreMedhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Tornell J, Heath JK, Betsholtz C. Pdgf-a signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell.* 1996;85:863-873
28. Bostrom H, Gritli-Linde A, Betsholtz C. Pdgf-a/pdgf alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2002;223:155-162
29. Lau M, Masood A, Yi M, Belcastro R, Li J, Tanswell AK. Long-term failure of alveologenesis after an early short-term exposure to a pdgf-receptor antagonist. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2011;300:L534-547
30. McGowan SE, Grossmann RE, Kimani PW, Holmes AJ. Platelet-derived growth factor receptor-alpha-expressing cells localize to the alveolar entry ring and have characteristics of myofibroblasts during pulmonary alveolar septal formation. *Anatomical record.* 2008;291:1649-1661
31. McGowan SE, McCoy DM. Fibroblasts expressing pdgf-receptor-alpha diminish during alveolar septal thinning in mice. *Pediatr Res.* 2011;70:44-49
32. Brody JS, Kaplan NB. Proliferation of alveolar interstitial cells during postnatal lung growth. Evidence for two distinct populations of pulmonary fibroblasts. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127:763-770
33. Kapanci Y, Assimakopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G. "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: A possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies. *The Journal of cell biology.* 1974;60:375-392
34. Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB, Woodcock-Mitchell J. Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 1990;3:515-523
35. Bruce MC, Honaker CE, Cross RJ. Lung fibroblasts undergo apoptosis following alveolarization. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 1999;20:228-236
36. Vaccaro C, Brody JS. Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast. *The Anatomical record.* 1978;192:467-479
37. Noguchi A, Reddy R, Kursar JD, Parks WC, Mecham RP. Smooth muscle isoactin and elastin in fetal bovine lung. *Exp Lung Res.* 1989;15:537-552
38. McGowan SE, Torday JS. The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annual review of physiology.* 1997;59:43-62
39. Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992;89:7856-7860
40. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, BlanchetteMackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of lipid research.* 1997;38:2249-2263

41. Heid HW, Schnolzer M, Keenan TW. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *The Biochemical journal*. 1996;320 (Pt 3):1025-1030
42. Schultz CJ, Torres E, Londos C, Torday JS. Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type ii cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283:L288-296
43. Torday JS, Sun H, Wang L, Torres E, Sunday ME, Rubin LP. Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282:L405-410
44. Torday J, Hua J, Slavin R. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1254:198-206
45. Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*. 2006;91:F132-135
46. Rehan VK, Wang Y, Sugano S, Romero S, Chen X, Santos J, Khazanchi A, Torday JS. Mechanism of nicotine-induced pulmonary fibroblast transdifferentiation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2005;289:L667-676
47. Torday JS, Torres E, Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro. *Pediatric pathology & molecular medicine*. 2003;22:189-207
48. Rehan VK, Sakurai R, Wang Y, Santos J, Huynh K, Torday JS. Reversal of nicotine-induced alveolar lipofibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation by stimulants of parathyroid hormone-related protein signaling. *Lung*. 2007;185:151-159
49. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*. 1997;349:1498-1504
50. Black PN, Ching PS, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in copd. *The European respiratory journal*. 2008;31:998-1004
51. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2003;21:347-360
52. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150:967-972
53. Hodgson U, Laitinen T, Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence of founder effect among multiplex families in finland. *Thorax*. 2002;57:338-342
54. Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic S, European Respiratory S, American College of Chest P. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of internal medicine*. 2001;134:136-151
55. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, 3rd, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annual review of medicine*. 2004;55:395-417
56. Behr J, Hoepfer MM, Kreuter M, Klotsche J, Wirtz H, Pittrow D. [characteristics and management of idiopathic pulmonary fibrosis: Insights-ipf registry]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2012;137:2586-2588
57. Abremski K, Hoess R. Bacteriophage p1 site-specific recombination. Purification and properties of the cre recombinase protein. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259:1509-1514
58. Cox MM. The flp protein of the yeast 2-microns plasmid: Expression of a eukaryotic genetic recombination system in escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80:4223-4227

59. Sauer B, Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxp-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic acids research*. 1989;17:147-161
60. Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26:99-109
61. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*. 2001;24:71-80
62. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene-expression in mammalian-cells by tetracycline-responsive promoters. *P Natl Acad Sci USA*. 1992;89:5547-5551
63. Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessar N, Richardson WD. Pdgfra/ng2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nature neuroscience*. 2008;11:1392-1401
64. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. G12-g13-large-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature medicine*. 2008;14:64-68
65. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent cre reporter mouse. *Genesis*. 2007;45:593-605
66. Hamilton TG, Klinghoffer RA, Corrin PD, Soriano P. Evolutionary divergence of platelet-derived growth factor alpha receptor signaling mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4013-4025
67. Roesch K, Jadhav AP, Trimarchi JM, Stadler MB, Roska B, Sun BB, Cepko CL. The transcriptome of retinal muller glial cells. *The Journal of comparative neurology*. 2008;509:225-238
68. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193:265-275
69. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kda. *Analytical biochemistry*. 1987;166:368-379
70. Rawlins EL, Perl AK. The a"maze"ing world of lung-specific transgenic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;46:269-282
71. Sternberg N. Bacteriophage p1 site-specific recombination. Iii. Strand exchange during recombination at lox sites. *Journal of molecular biology*. 1981;150:603-608
72. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the cre recombinase of bacteriophage p1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:5166-5170
73. Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:10887-10890
74. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;237:752-757
75. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: Comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible cre-er(t) and cre-er(t2) recombinases. *Nucleic acids research*. 1999;27:4324-4327
76. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology*. 2002;244:305-318
77. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BL. The role of scgb1a1+ clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell*. 2009;4:525-534
78. Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S. Kinetics of tamoxifen-regulated cre activity in mice using a cartilage-specific creer(t) to assay temporal activity windows along the

- proximodistal limb skeleton. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235:2603-2612
79. Park EJ, Sun X, Nichol P, Saijoh Y, Martin JF, Moon AM. System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the *foxa2* locus in mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008;237:447-453
80. Hokuto I, Perl AK, Whitsett JA. Prenatal, but not postnatal, inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling causes emphysema. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:415-421
81. Nicola T, Hagood JS, James ML, Macewen MW, Williams TA, Hewitt MM, Schwiebert L, Bulger A, Oparil S, Chen YF, Ambalavanan N. Loss of *thy-1* inhibits alveolar development in the newborn mouse lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296:L738-750
82. Srinivasan S, Strange J, Awonusonu F, Bruce MC. Insulin-like growth factor i receptor is downregulated after alveolarization in an apoptotic fibroblast subset. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282:L457-467
83. Hans F, Dimitrov S. Histone h3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*. 2001;20:3021-3027
84. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl AK. Dynamic regulation of platelet-derived growth factor receptor alpha expression in alveolar fibroblasts during realveolarization. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47:517-527
85. Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, Bonatto D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem cells and development*. 2013;22:1455-1476
86. Barkauskas CE, Crouse MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW, Hogan BL. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*. 2013;123:3025-3036
87. McQualter JL, Brouard N, Williams B, Baird BN, Sims-Lucas S, Yuen K, Nilsson SK, Simmons PJ, Bertoncello I. Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell fraction. *Stem cells*. 2009;27:623-633
88. El Agha E, Herold S., Al Alam D., Quantius J., MacKenzie B., Carraro G., Moiseenko A., Chao C., Minoo P., Seeger W. and Bellusci S. Fgf10-positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. *Circulation*. 2013
89. Kim N, Vu TH. Parabronchial smooth muscle cells and alveolar myofibroblasts in lung development. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 2006;78:80-89
90. Low RB, White SL. Lung smooth muscle differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30:869-883
91. Sparrow MP, Warwick SP, Mitchell HW. Foetal airway motor tone in prenatal lung development of the pig. *The European respiratory journal*. 1994;7:1416-1424
92. Nakamura KT, McCray PB, Jr. Fetal airway smooth-muscle contractility and lung development. A player in the band or just someone in the audience? *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23:3-6
93. Gabbiani G, Le Lous M, Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Archiv. B: Cell pathology*. 1976;21:133-145
94. Leslie KO, Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell JL, Low RB. Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung. *Differentiation; research in biological diversity*. 1990;44:143-149
95. Mailleux AA, Kelly R, Veltmaat JM, De Langhe SP, Zaffran S, Thiery JP, Bellusci S. Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Development*. 2005;132:2157-2166

96. Perl AK, Gale E. Fgf signaling is required for myofibroblast differentiation during alveolar regeneration. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297:L299-308
97. Shan L, Subramaniam M, Emanuel RL, Degan S, Johnston P, Tefft D, Warburton D, Sunday ME. Centrifugal migration of mesenchymal cells in embryonic lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008;237:750-757
98. Que J, Wilm B, Hasegawa H, Wang F, Bader D, Hogan BL. Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:16626-16630
99. Greif DM, Kumar M, Lighthouse JK, Hum J, An A, Ding L, Red-Horse K, Espinoza FH, Olson L, Offermanns S, Krasnow MA. Radial construction of an arterial wall. *Developmental cell*. 2012;23:482-493
100. Dixit R. AXaFA. Derivation of lung mesenchymal lineages from the fetal mesothelium requires hedgehog signaling for mesothelial cell entry. *Development*. 2013
101. Kimani PW, Holmes AJ, Grossmann RE, McGowan SE. Pdgf- α gene expression predicts proliferation, but pdgf- α suppresses transdifferentiation of neonatal mouse lung myofibroblasts. *Respiratory research*. 2009;10:119
102. O'Hare KH, Sheridan MN. Electron microscopic observations on the morphogenesis of the albino rat lung, with special reference to pulmonary epithelial cells. *The American journal of anatomy*. 1970;127:181-205
103. Vaccaro C, Brody JS. Ultrastructure of developing alveoli .1. Role of interstitial fibroblast. *Anatomical record*. 1978;192:467-479
104. Maksvytis HJ, Vaccaro C, Brody JS. Isolation and characterization of the lipid-containing interstitial cell from the developing rat lung. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1981;45:248-259
105. Kaplan NB, Grant MM, Brody JS. The lipid interstitial cell of the pulmonary alveolus. Age and species differences. *The American review of respiratory disease*. 1985;132:1307-1312
106. Bruce MC, Honaker CE, Cross RJ. Lung fibroblasts undergo apoptosis following alveolarization. *Am J Resp Cell Mol*. 1999;20:228-236
107. Awonusonu F, Srinivasan S, Strange J, Al-Jumaily W, Bruce MC. Developmental shift in the relative percentages of lung fibroblast subsets: Role of apoptosis postseptation. *Am J Physiol-Lung C*. 1999;277:L848-L859
108. Jiang HP, Harris SE, Serrero G. Molecular cloning of a differentiation-related mrna in the adipogenic cell line 1246. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1992;3:21-30
109. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell and tissue research*. 1998;294:309-321
110. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;316:924-929
111. Garcia P, Sood A. Adiponectin in pulmonary disease and critically ill patients. *Current medicinal chemistry*. 2012;19:5493-5500
112. Spiegelman BM, Green H. Control of specific protein-biosynthesis during the adipose conversion of 3t3 cells. *J Biol Chem*. 1980;255:8811-8818
113. Fu YC, Luo NL, Lopes-Virella MF. Oxidized ldl induces the expression of albp/ap2 mrna and protein in human thp-1 macrophages. *J Lipid Res*. 2000;41:2017-2023
114. Shum BOV, Mackay CR, Gorgun CZ, Frost MJ, Kumar RK, Hotamisligil GS, Rolph MS. The adipocyte fatty acid-binding protein ap2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2006;116:2183-2192

115. Kauffman SL. Cell proliferation in the mammalian lung. *International review of experimental pathology*. 1980;22:131-191
116. Magra AL, Mertz PS, Torday JS, Londos C. Role of adipose differentiation-related protein in lung surfactant production: A reassessment. *Journal of lipid research*. 2006;47:2367-2373
117. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, adrp, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10:51-58
118. Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of pat proteins in lipid metabolism. *Biochimie*. 2005;87:45-49
119. Lu XY, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, Kimmel AR. The murine perilipin gene: The lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mrna splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome*. 2001;12:741-749

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lungenanatomie.	9
Abbildung 2: Übersicht über die vorgeburtliche Lungenentwicklung.	10
Abbildung 3: Bildung neuer Septen.	12
Abbildung 4: Alveoläre Homöostase.	16
Abbildung 5: Das Cre/LoxP System	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Septierung.	21
Abbildung 7: Genkarte der ADRPfloX (Plin2) Mauslinie.	34
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der PDGFR α ^{GFP} Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.	46
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der PDGFR α ^{GFP} Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.	48
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe der PDGFR α ^{GFP} Maus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.	50
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Zellmarker auf adulten	53
Abbildung 12: Anteil der PDGFR α -GFP-exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl im Lungengewebe.	54
Abbildung 13: Zytospin und Quantifizierungen der verschiedenen Zelltypen während der Lungenentwicklung.	55
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von PDGFR α ^{Cre} ;mT/mG Mauslungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung und Quantifizierungen der verschiedenen Zelltypen an P5.	57
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von PDGFR α ^{CreERT2} ;mT/mG Mauslungen an P14.	59
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierungen der unterschiedlichen Zelltypen von PDGFR α ^{CreERT2} ;mT/mG Mauslungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung.	61
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von SMMHC ^{CreERT2} ;mT/mG Mauslungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.	64
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von SMMHC ^{CreERT2} ;mT/mG Mauslungen und relative Anzahl der verschiedenen Zelltypen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lungenentwicklung.	65
Abbildung 19: Lungengewebe der Ap2 ^{CreERT2} ;mT/mG Mauslinie.	66
Abbildung 20: Endogene Expression von mCherry und YFP bei adulten Chimären der F ₁ - Generation.	67
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von ADRP ^{CreERT2/mCherry} ;mT/mG Mauslungen an P9.	69
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von ADRP ^{CreERT2/mCherry} ;mT/mG Mauslungen an E18.5.	71
Abbildung 23: Proteinexpression von ADRP und SPC in Lungenhomogenat von ADRPfloX (Plin2) Mäusen.	72
Abbildung 24: Histologische- und Immunfluoreszenzfärbungen der ADRPfloX (Plin2) Mäuse an P14.	73

Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Liniendifferenzierung von Myo- und Lipofibroblasten ausgehend von ihren PDGFR α -positiven Vorläuferzellen.....	84
Abbildung 26: ADRP ^{fTA/CreERT2} <i>Knock-in</i>	90
Abbildung 27: Southern Blot Analyse aus Schwanzbiopsien	90
Abbildung 28: Genotypisierung der ADRPfloX (Plin2) Mauslinie.....	91
Abbildung 29: Genotypisierung der ADRP ^{CreERT2} Mauslinie.....	91
Abbildung 30: Genotypisierung der <i>flp-deleter</i> Mauslinie.	91
Abbildung 31: Genotypisierung der mT/mG Mauslinie.	92
Abbildung 32: Genotypisierung der PDGFR α ^{Cre} Mauslinie.	92
Abbildung 33: Genotypisierung der PDGFR α ^{CreERT2} Mauslinie.	92
Abbildung 34: Genotypisierung der PDGFR α ^{GFP} Mauslinie.	92
Abbildung 35: Genotypisierung der SMMHC ^{CreERT2} Mauslinie.	93
Abbildung 36: Negativkontrollen zu Abbildung 8.....	93
Abbildung 37: Negativkontrollen zu Abbildung 9.....	94
Abbildung 38: Negativkontrollen zu Abbildung 11.....	94
Abbildung 39: Negativkontrollen zu Abbildung 16.....	95
Abbildung 40: Negativkontrollen zu den Abbildungen 15, 17 und 21.	96

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phasen und Zeitpunkte der Lungenentwicklung, verändert nach Kinane 2007 ⁸	11
Tabelle 2: Sequenzen der für die Genotypisierung der transgenen Tiere verwendeten Primer.....	27
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Western Blot (WB).....	28
Tabelle 4: Herstellung von Polyacrylamid-Trenngelen	30
Tabelle 5: Herstellung eines Polyacrylamid-Sammelgels.....	30
Tabelle 6: Herstellung eines Agarose-Gels	30
Tabelle 7: Mengenangaben und Reagenzien zur Durchführung einer β -Galaktosidasefärbung	43
Tabelle 8: Werte zu den Graphen in Abbildung 13.....	97
Tabelle 9: Statistische Analysen zu den Graphen in Abbildung 13.	98
Tabelle 10: Werte zu dem Graphen in Abbildung 14.	100
Tabelle 11: Werte und statistische Analysen zu den Graphen in Abbildung 16.	101
Tabelle 12: Werte zu dem Graphen in Abbildung 18.	102
Tabelle 13: Statistische Analysen zu dem Graphen in Abbildung 18.....	103

8.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACTB	Beta-Aktin
ADRP	<i>Adipocyte differentiation related protein</i>
AP	<i>Adipocyte protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
B	Bronchus
Bp	Basenpaar
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Embryonal
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FLP	Flippase
For	<i>Forward primer</i>

g	Gramm
G	Gefäß
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
H ₂ B	Histon 2B
HCl	Salzsäure
HSV	Herpes Simplex Virus
i.p.	Intraperitoneal
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
Kb	Kilobasenpaar
Kn	Kaninchen
M	Molar; Marker
mA	Miliampere
mG	<i>membraneGFP</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i> , Boten-RNA
Ms	Maus
mT	<i>membraneTomato</i>
NaCl	Natriumchlorid
Neg	Negativkontrolle

nm	Nanometer
P	Postnatal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF-A	<i>Platelet derived growth factor A (Ligand)</i>
PDGFR α	<i>Platelet derived growth factor-receptor alpha</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
pH	Oxoniumionenkonzentration
PKA	Protein Kinase A
Pos	Positivkontrolle
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
Rev	<i>Reverse primer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rt	Ratte
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SMMHC	<i>Smooth muscle myosin heavy chain</i>
SPC	<i>Surfactant protein C</i>
Std	Stunde

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TetO	<i>Tet Operator</i>
TetR	<i>Tetrazyklin-Repressor-Protein</i>
TRE	<i>tetracyclin response element</i>
tTA	<i>Tetrazyklin-Transaktivator-Protein</i>
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
α SMA	<i>α smooth muscle actin</i>

8.5 Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

8.6 Danksagung

Mein Dank gilt....

...Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Bereitstellung des Projekts innerhalb seiner Abteilung, sowie für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit und zahlreiche Ideen und Anregungen.

...Frau Prof. Dr. Annegret Wilde für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

...Herrn PD Dr. Robert Voswinckel für die intensive Betreuung des Projekts, die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen, sowie für die Bewertung meiner Disputation.

...Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann für die Bewertung meiner Disputation.

...Dr. Marten Szibor und Isabelle Salwig für die Generierung der zwei neuen Mauslinien für mein Projekt.

...Diana Fuchs und Uta Eule für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

...Katrin Ahlbrecht, Sven Becker, Jens-Christian Wolff, Kirsten Murmann für die vielen Gespräche und hilfreichen Anregungen.

...all meinen Kollegen und Kolleginnen für schöne Jahre, an die ich gerne zurückdenken werde.

...allen Tierpflegern, ganz besonders Tanja Enders und Julia Sperling für die gute und freundliche Zusammenarbeit.

...Wiebke Janssen für die all die Hilfe, Motivation und guten Tipps, sowie Lilia Lang fürs Korrekturlesen.

...meinen Freunden, besonders Friederike Weisel, Svenja Tiede, Henning Tiede und Gero Nieß für ihre Geduld und dafür, dass sie mich über Monate immer wieder motiviert haben.

...meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe.



Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
durch den Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6114-2



9 783835 196114 2