



Christian
Doppler
Laboratory

for
Cardiac and Thoracic
Diagnosis & Regeneration



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

p63⁺Krt5⁺ distal airway stem cells are essential for lung regeneration

JournalClub am 12.01.2015
Emilie Hrdliczka

Facts

- Art des Artikels: Letter
- Autor: Wei Zuo von Genome Institute of Singapore
- Publiziert in: Nature
- Publiziert am: 12.11.2014

Abstract

- Lungenerkrankung -> funktionsunfähiger O₂-Austausch -> Todesursache
- Klinisch bekannt -> nach nur 6 Monaten -> häufig aufrechte Lungenfunktion
- Kürzlich bewiesen -> mit H1N1 Virus Infektion steht DASC^{p63Krt5} in Verbindung, mit darauffolgender Lungenregeneration

Abstract

In diesem Letter wird gezeigt:

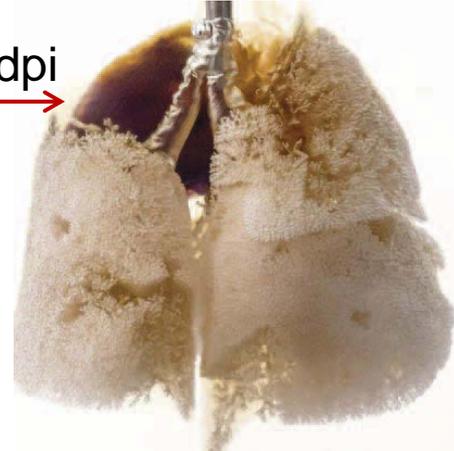
- H1N1 Infektionen -> Lungenschädigung -> prä-existente DASC -> proliferierende Vermehrung -> Differenzierung in Alveolen
- Selektive Ablation von DASC in vivo -> keine Regeneration -> Prä-fibrotische Läsionen -> defizienter O₂-Austausch
- Transplantation von DASC -> Differenzierung-> minimiert strukturellen Konsequenzen
- Möglichkeit für Stammzellen basierte Zellentherapie

Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

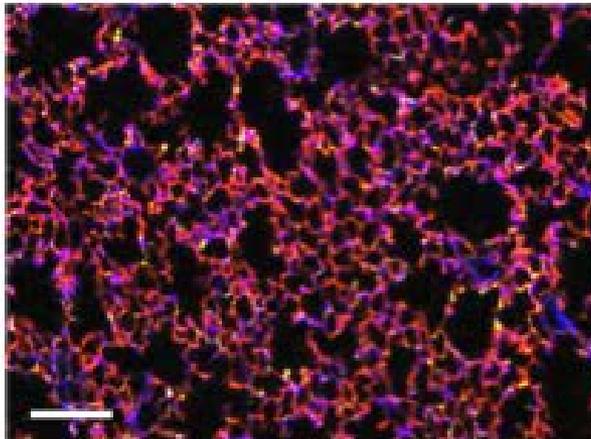
0 dpi



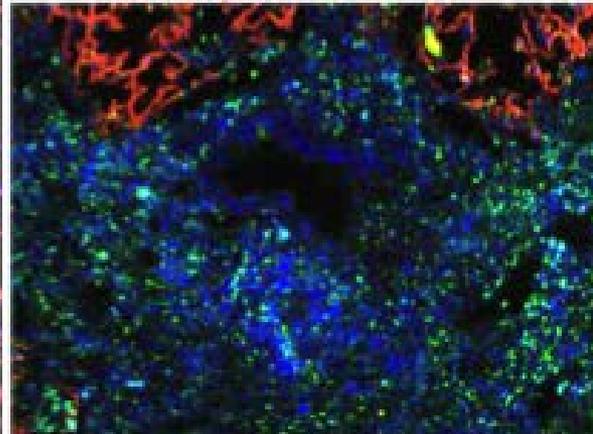
H1N1 15 dpi
→



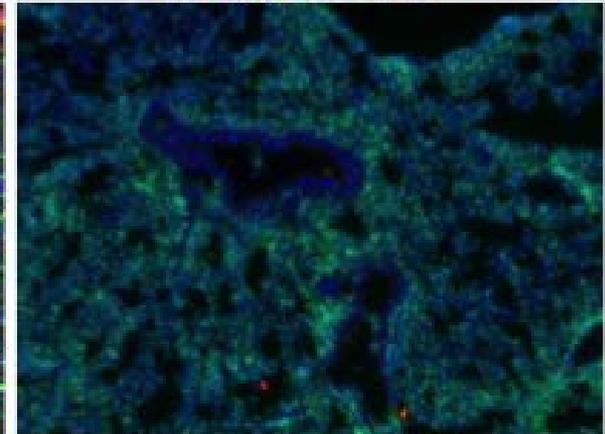
Pdpn CD45



Pdpn CD45



SPC CD45

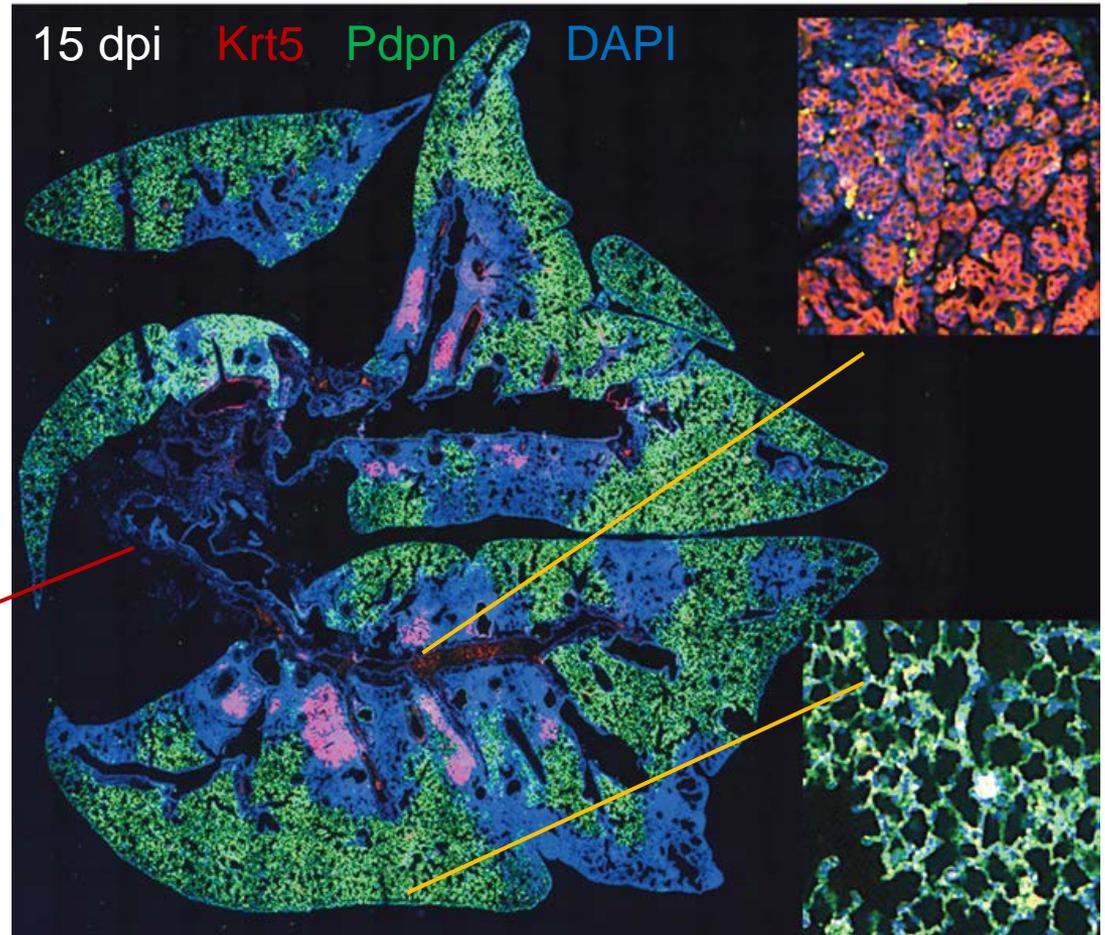
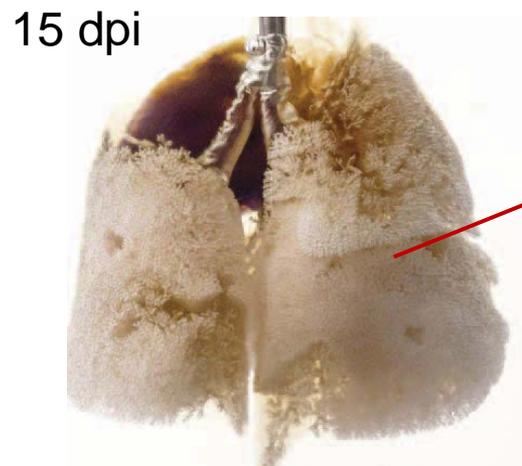
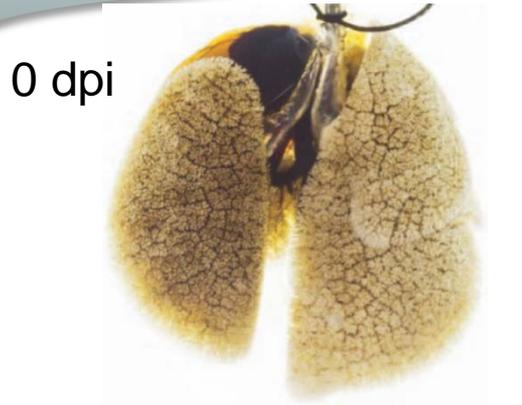


Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration

H1N1 Infektion löst Lungeschäden aus

15dpi geschädigten Regionen:

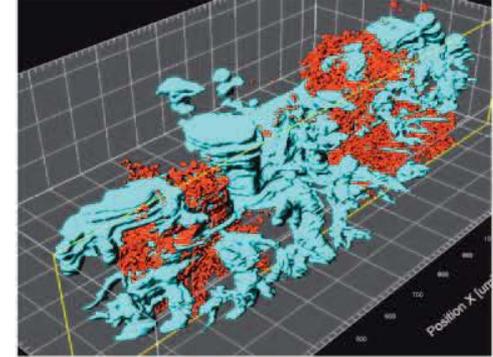
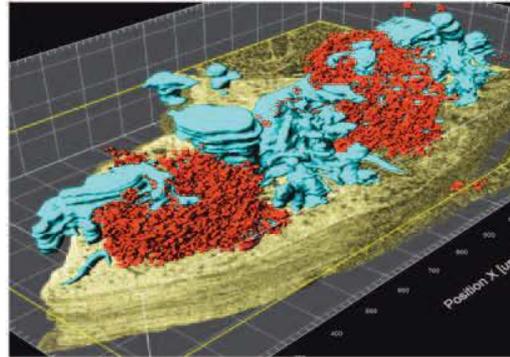
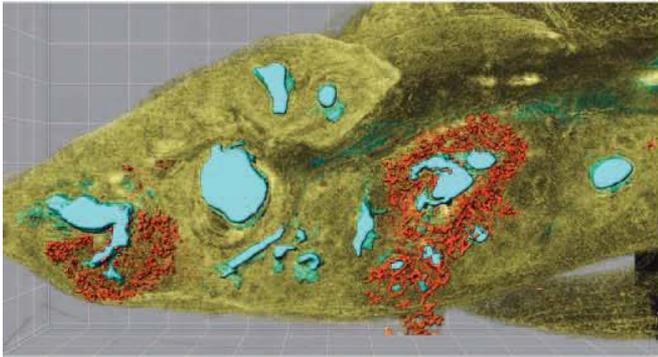
- CD45, Neutrophile, Makrophagen
- Ausbleiben von Pneumozyten Typ1 & Typ2 Markern (wie Pdpn&SPC)



Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration

AUCH! diskrete Krt5-Färbungen ->
könnten Vorstufen von De novo Alveolen
sein

VIDEO

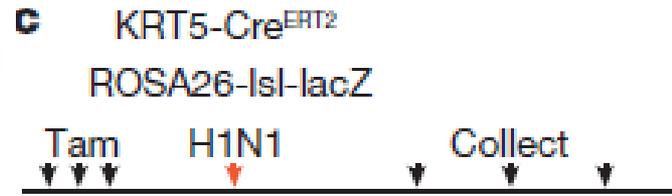


Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

VIDEO

3 Dimensionale Rekonstruktion

zeigt breite Verteilung von Krt5
exprimierenden Zellen um bronchiale
Achsen.

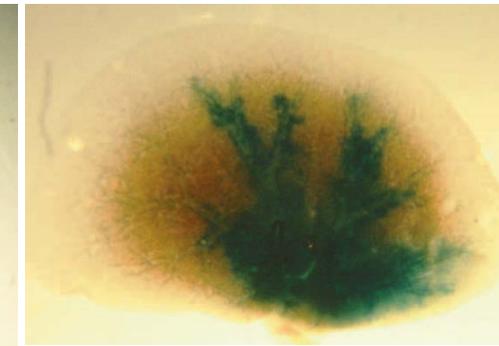
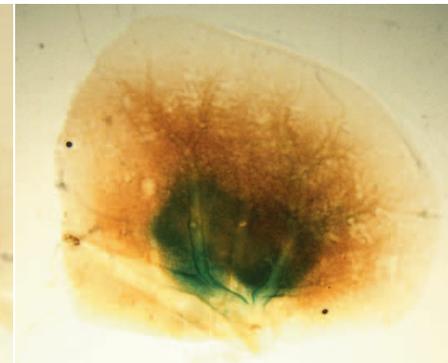
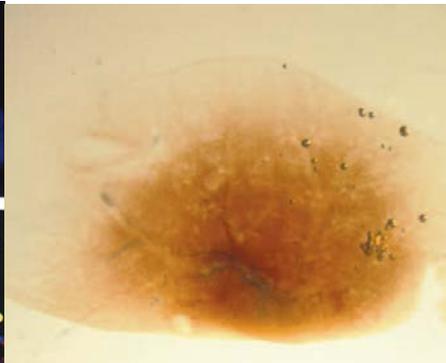
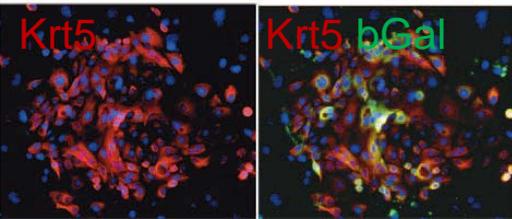
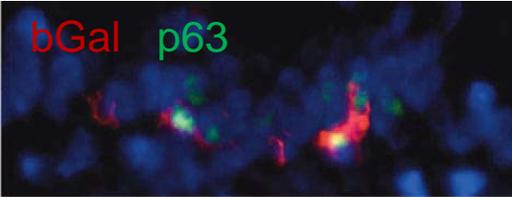


0 dpi

9 dpi

15 dpi

60 dpi



Tam -18, -16, -14

Tam -32, -30, -28

No Tam control

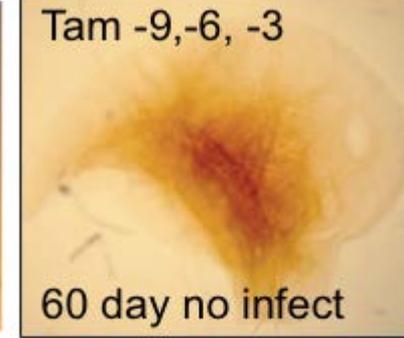
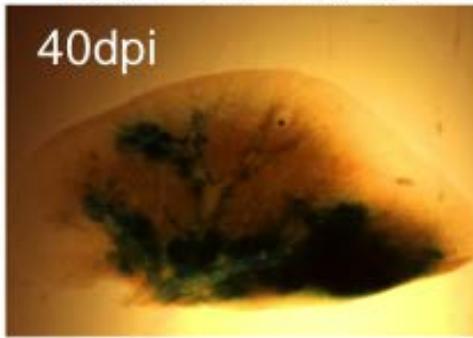
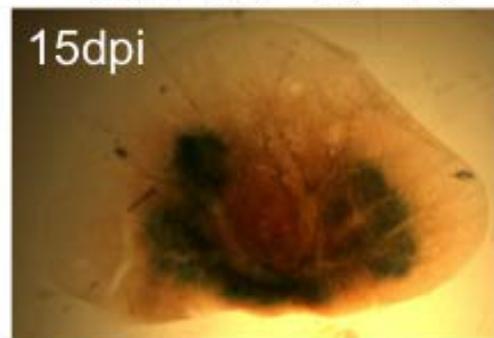
Tam -9, -6, -3

15dpi

40dpi

40dpi

60 day no infect



Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration



Genetische Zelllinienforschung

Tamoxifen abhängiges lacZGen

(unter der Kontrolle von Krt5 Promotor)

Ungefähr 50% exprimieren:

Escherichia coli-spezifische b-Galaktosidase



15dpi

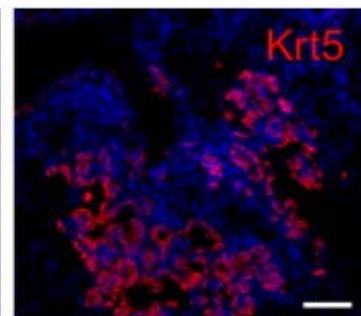
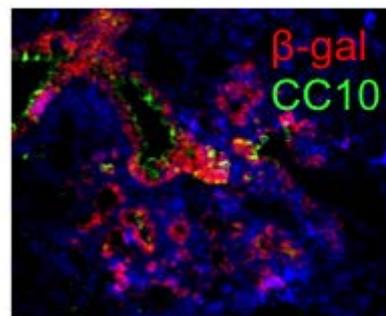
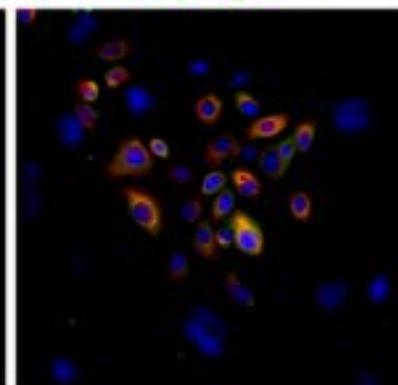
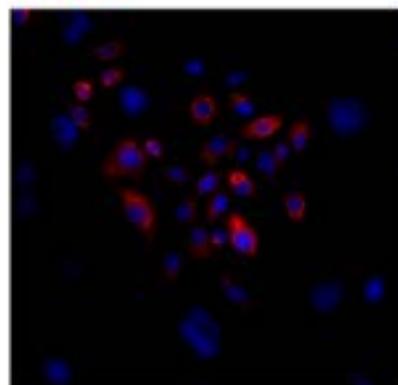
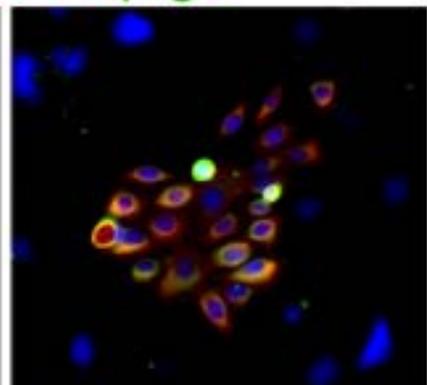
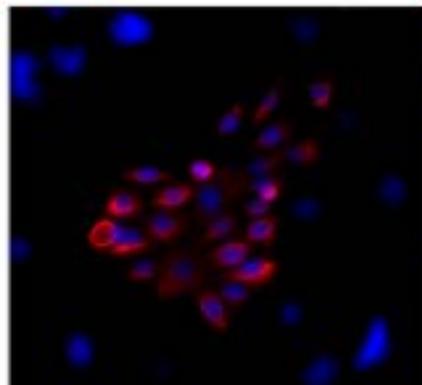
Krt5

Krt5 β -gal

Krt5

Krt5 β -gal

DASC



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

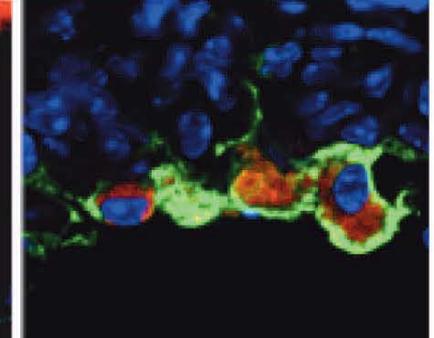
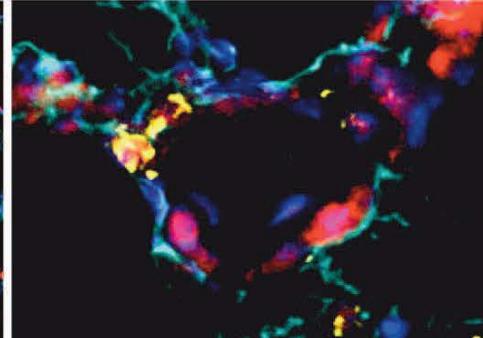
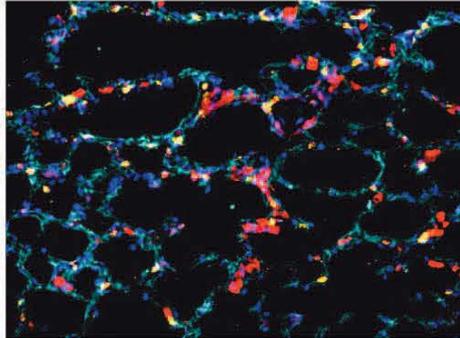


In DASC werden Krt5, b-Gal und auch CC10
gefärbt

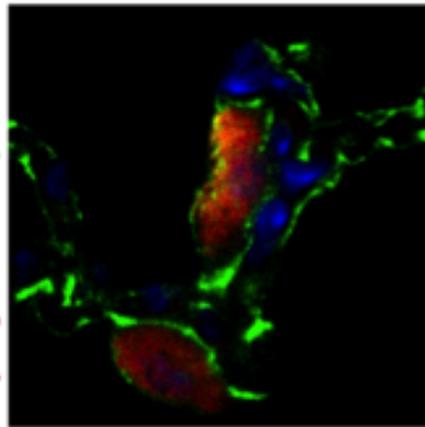


60 dpi

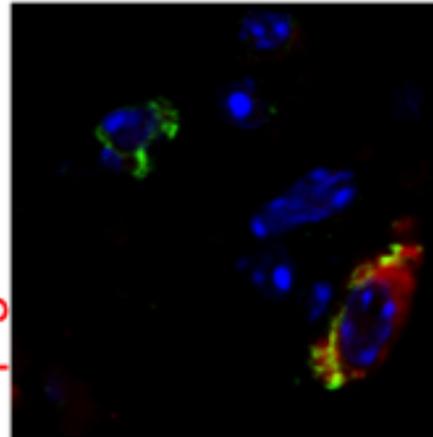
β -gal β -gal 1H8 SPC' DAPI β -gal 1H8 SPC DAPI β -gal CC10 DAPI



β -gal Pdpn



β -gal SPC

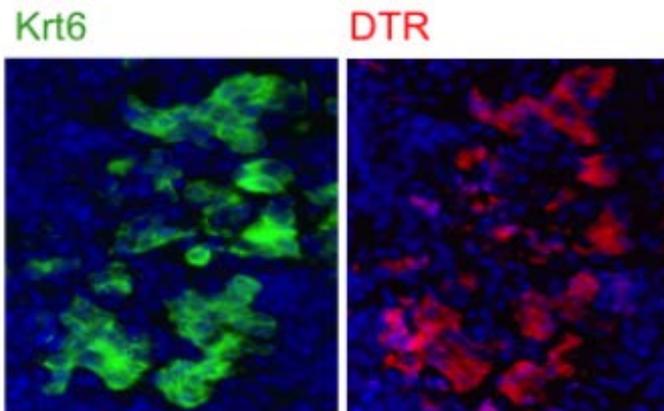
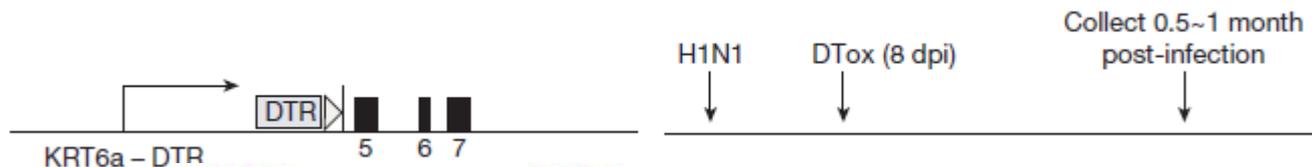


Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

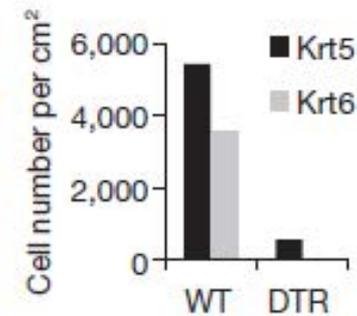
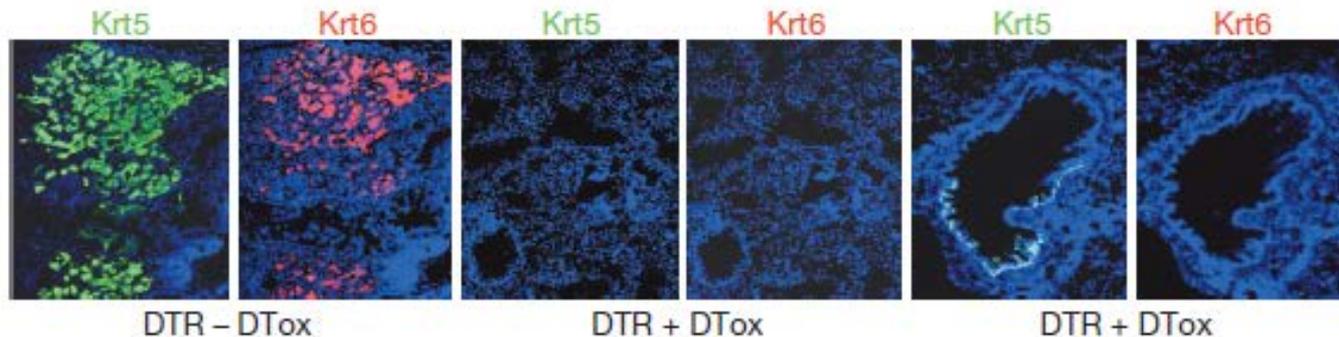


60dpi mit folgenden Antikörper:

- b-gal
- 1H8, Pdpn (TypI)
- SPC (TypII)
- CC10 (sekretorischen Zellen)



15dpi



Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration



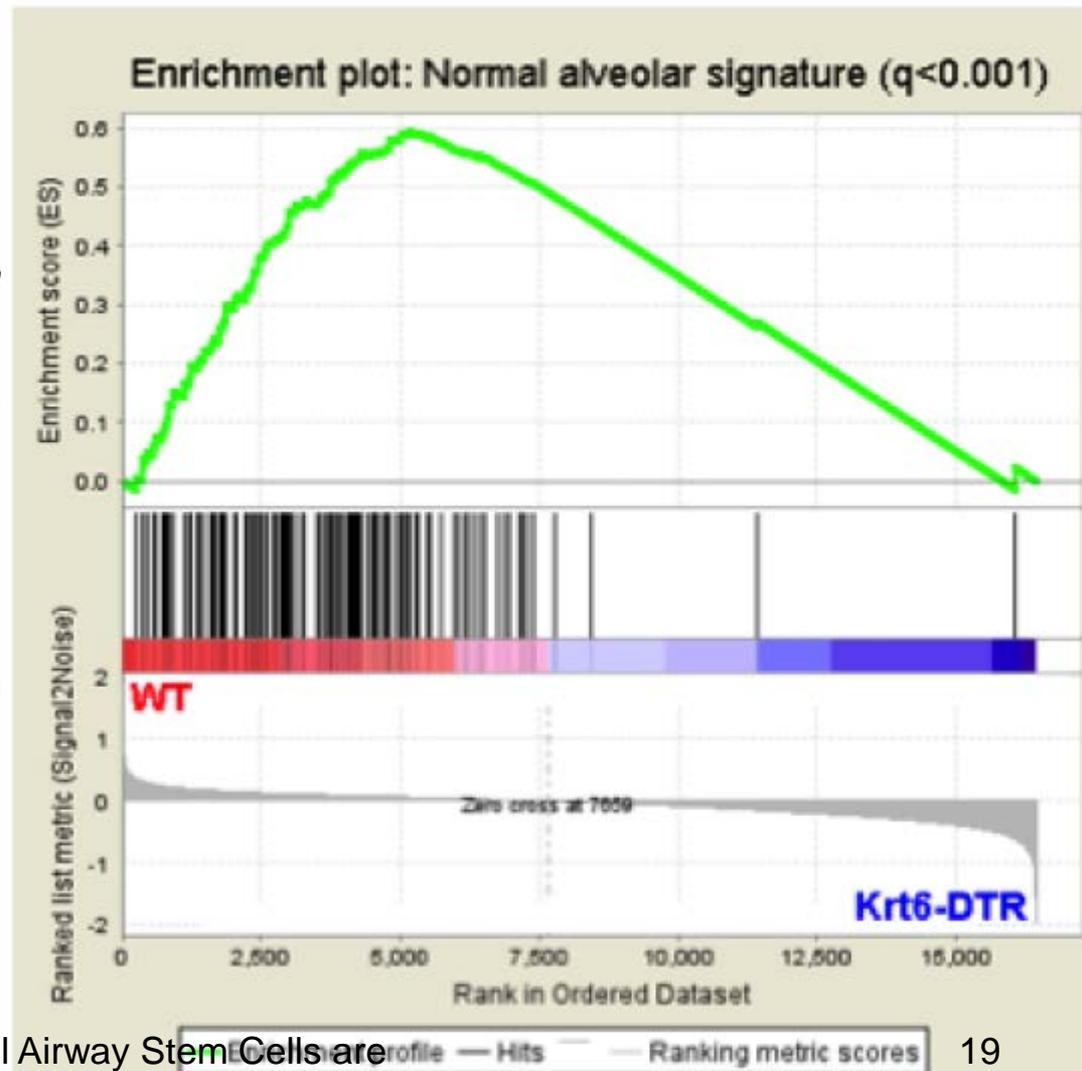
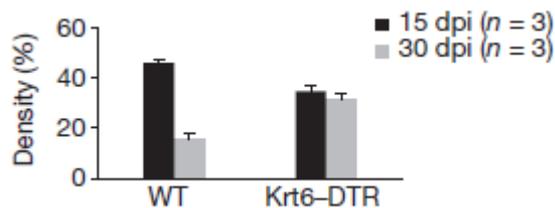
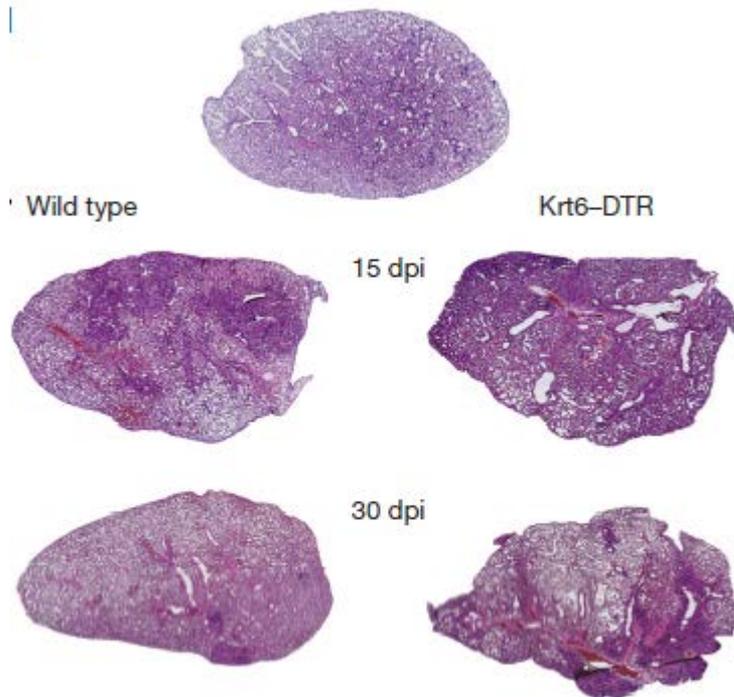
Test des Modells in vivo:

Krt6-DTR

8dpi -> Toxinaussetzung

15dpi -> Verlust der Krt5 und Krt6 Zellen

Verglichen zum WT -> Verlust von 90% d.
Krt5 und über 99% d. Krt6



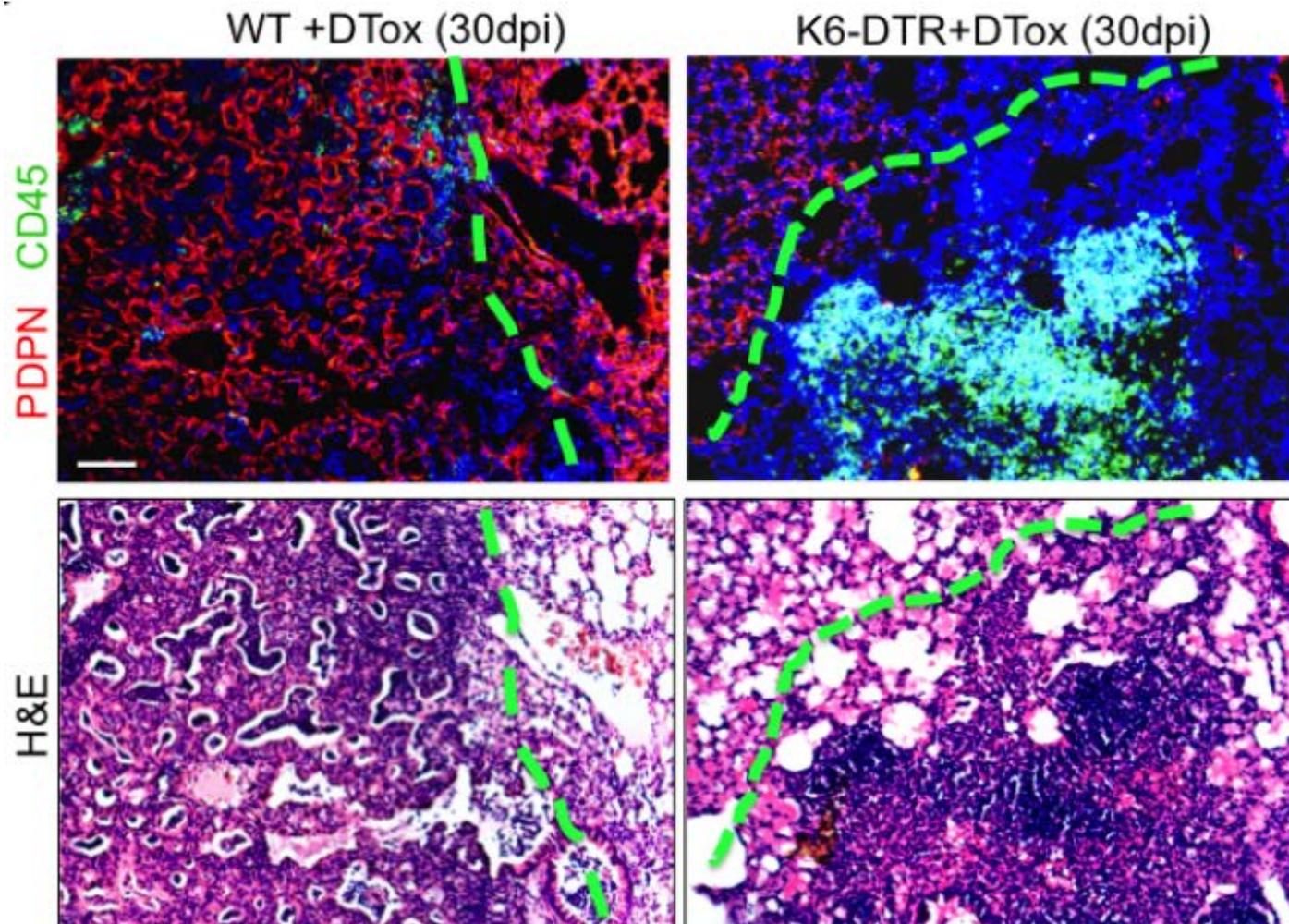
Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration



Effekt von ablitierten DASC auf die Lungenregeneration

WT: 30dpi keine Infiltration
alveolare Gen-Set-Übereinstimmung!

Krt-DTR: 30dpi noch immer Infiltration!
weniger alveolare Gen-Set
Übereinstimmung!



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

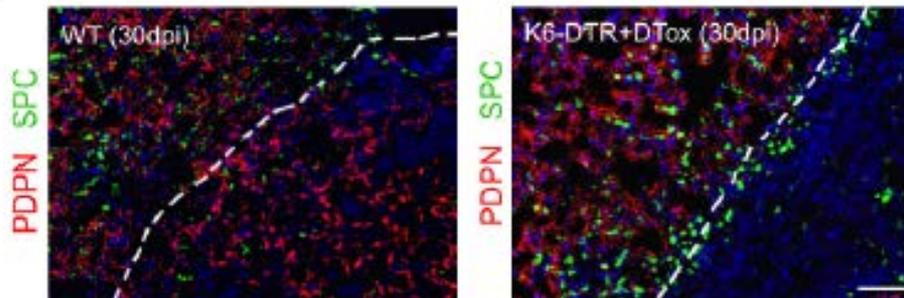


Histologische Basis der Verdichtungen

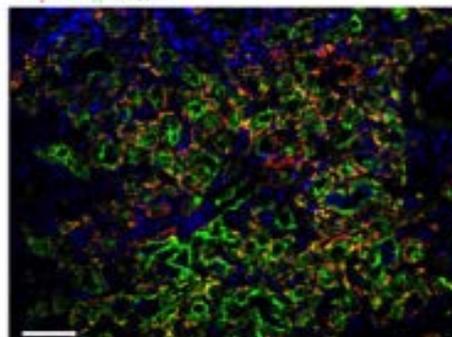
Teil 1

WT: 30dpi -> exprimiert Anti- Pdpn
(Pneumozyt Typ I)

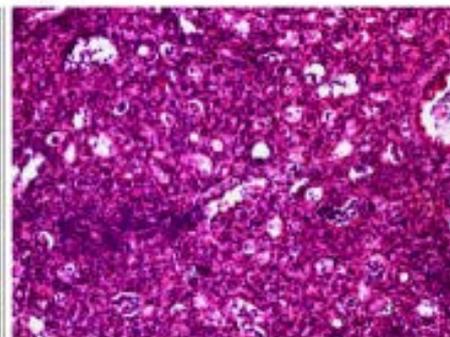
Krt-DTR: 30dpi -> exprimiert Anti-CD45
(Leukozytinfiltration)



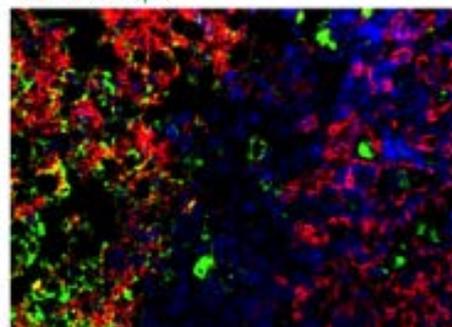
PDPN Aqp5



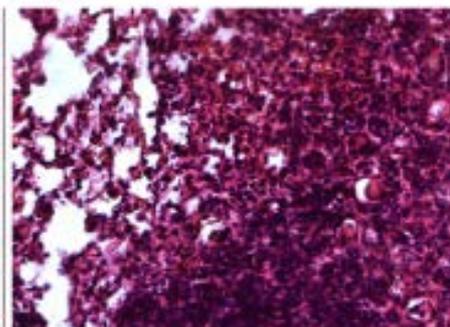
H&E



PDPN Hopx



H&E



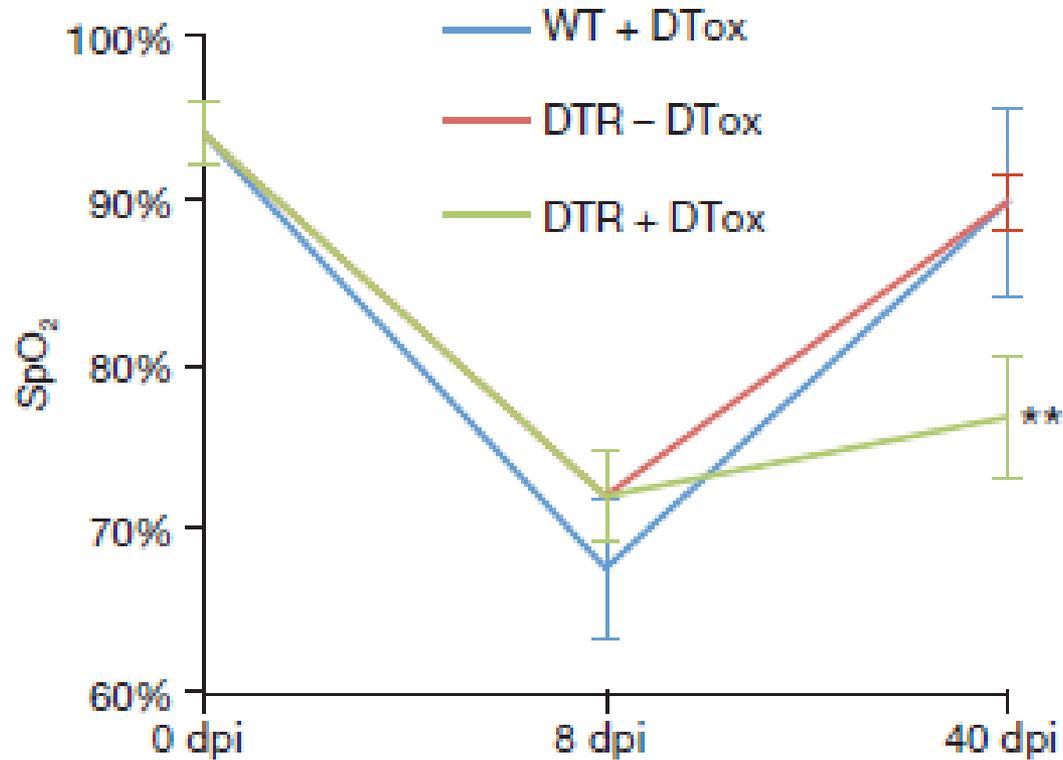


Histologische Basis der Verdichtungen

Teil2

WT: 30dpi -> exprimiert Anti- Pdpn
(Pneumozyt Typ1), ABER nicht alle PZ-TI-
Marker (wie Hopx)

Krt-DTR: 30dpi -> exprimiert Anti-CD45
(Leukozytinfiltration)





Effekt von ablierten DASC auf O₂-Sättigung

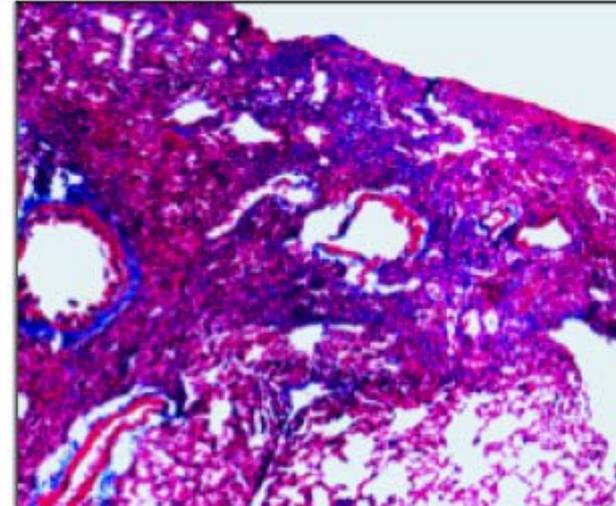
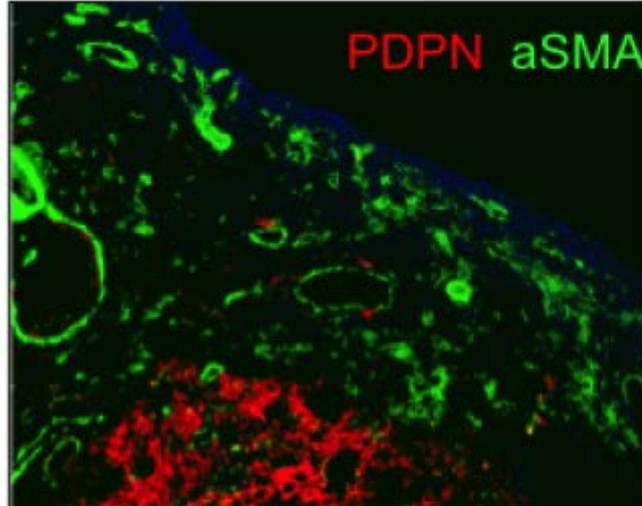
0dpi: sowohl WT und DTR-Dtox ~95%

8dpi: sowohl WT und DTR-Dtox ~70%

40dpi: WT ~ 90% und DTR-Dtox ~ 75%

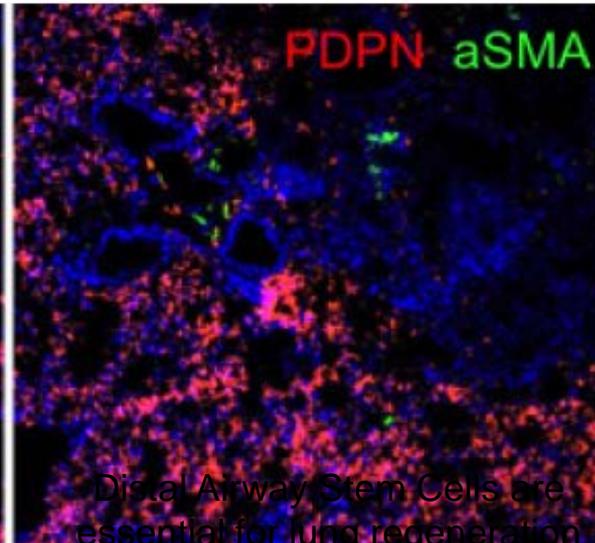
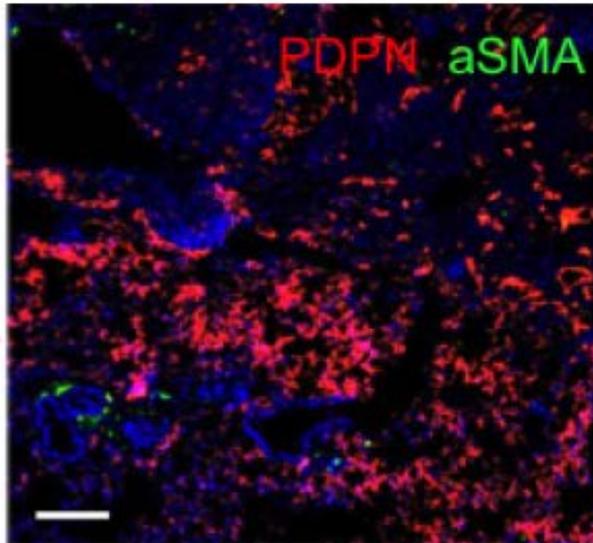


DTR +DTox (30dpi)



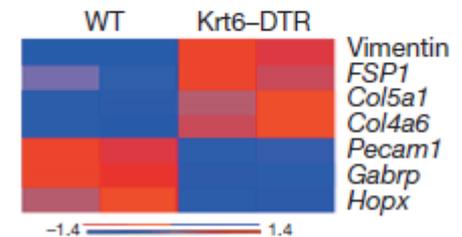
WT + DTox

DTR - DTox



Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration

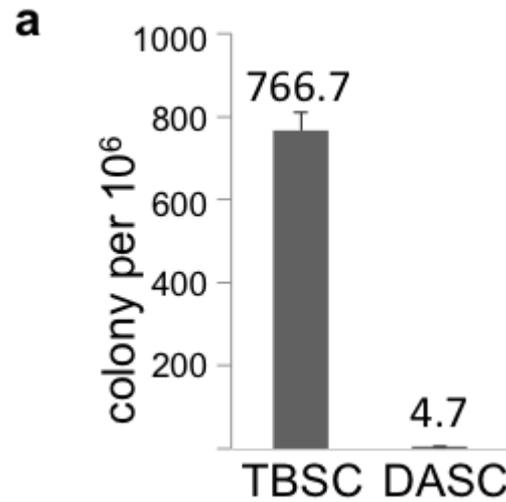
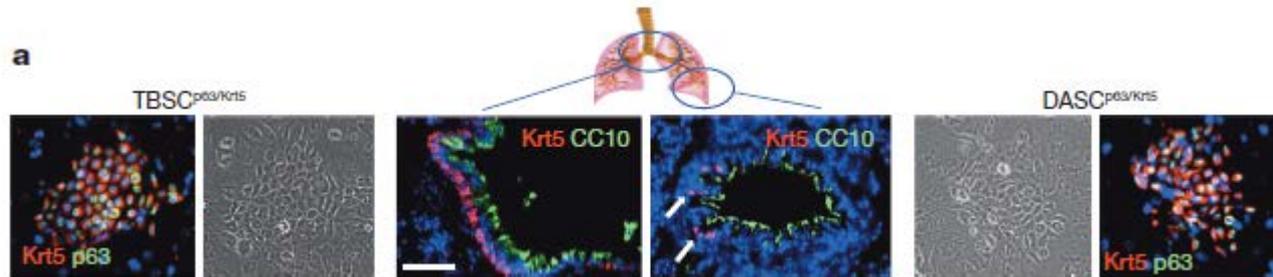
Gene ontology	-fold
Chemokine activity	8.2
TNF receptor binding	5.1
Cytokine activity	3.8
Matrix metalloproteinases	2.9
Chemotaxis	2.8
Inflammatory response	2.5
Tube development	-2.2
Vasculature development	-2.2





Effekt von ablierten DASC auf Lungenfunktion

- A-SMA -> in WT: nicht vorhanden
 - > in DTR-Dtox: vorhanden!
 - > pre-fibrotischer Status der Lunge
- Masson's trichrome blue
- > in WT: nicht vorhanden
 - > in DTR-Dtox: vorhanden!
- > Marker für Fibrose



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration



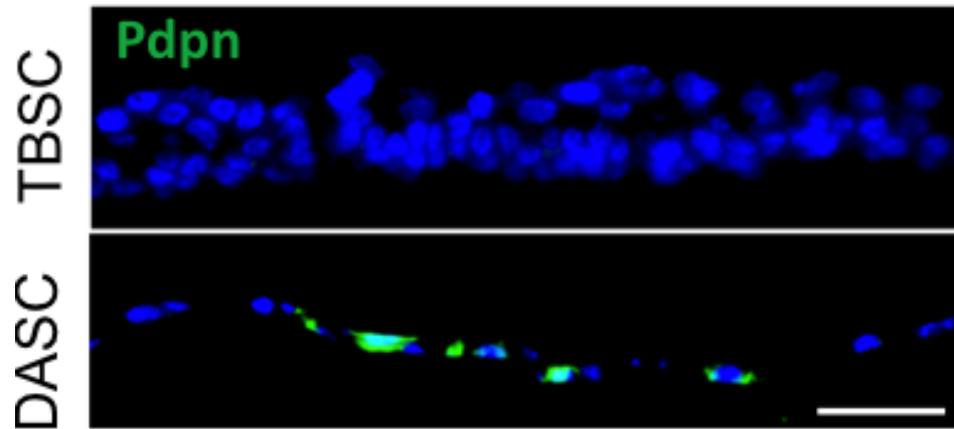
Unterschiede der DASC und TBSC

Krt5-Zellen reichlicher prox. als dist. Lunge

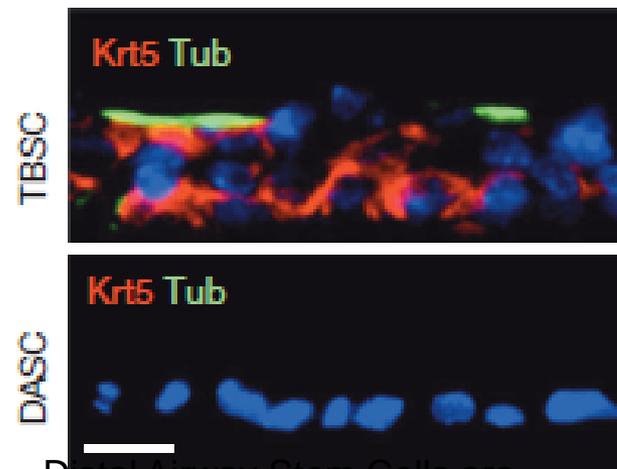
100fach weniger DASC (in dist.) als TBSC (in prox.)



Air Liquid Interface (ALI)



ALI



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration



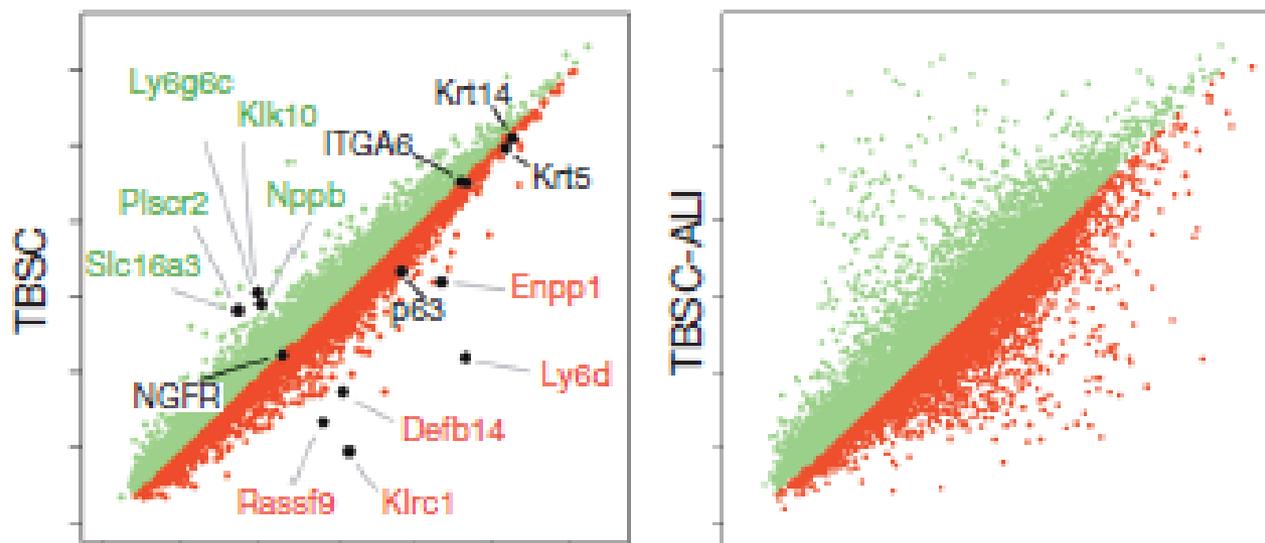
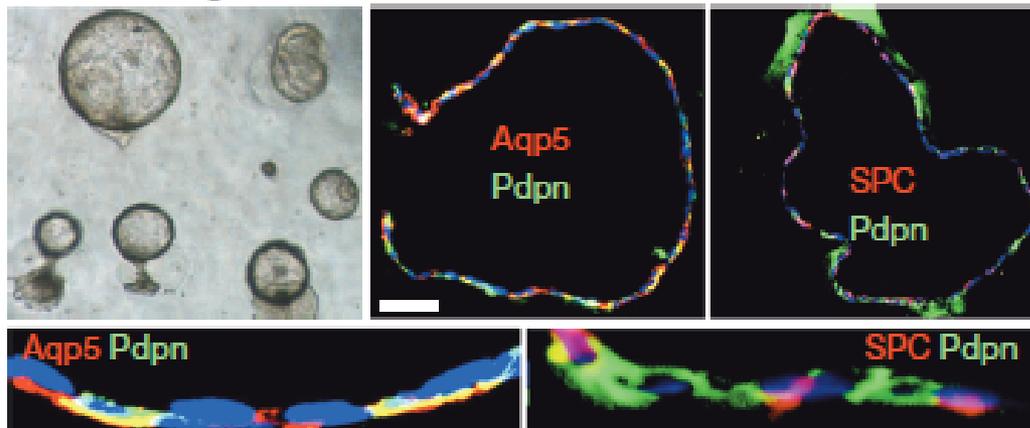
Air Liquid Interface (ALI)

TBSC: geschichtetes Epithel mit Krt5
Basalzellen und apikal Zilien – und
sekretorische Zellen

DASC: einschichtiges Epithel mit
differenzierten Zellen, welche Pdpn
exprimieren



DASC-Matrigel



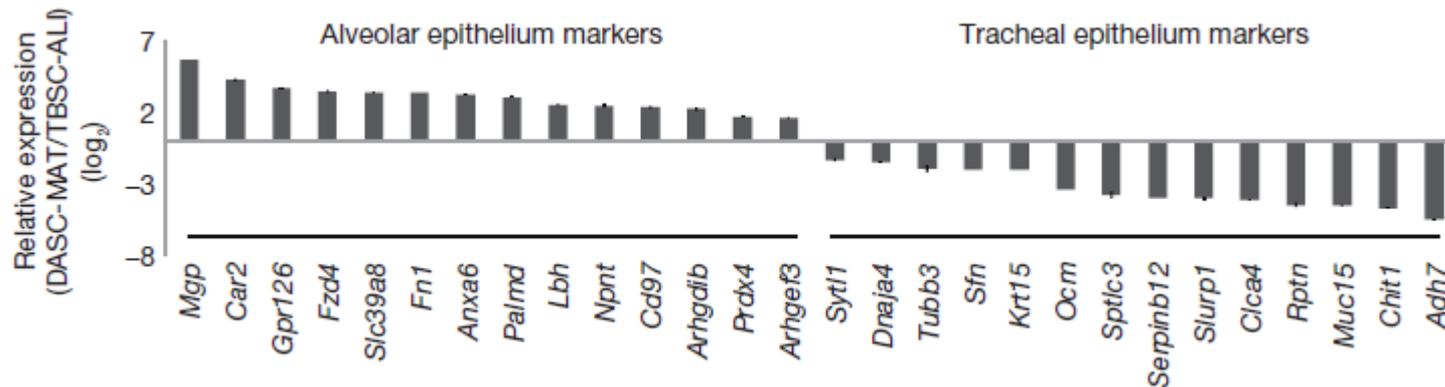
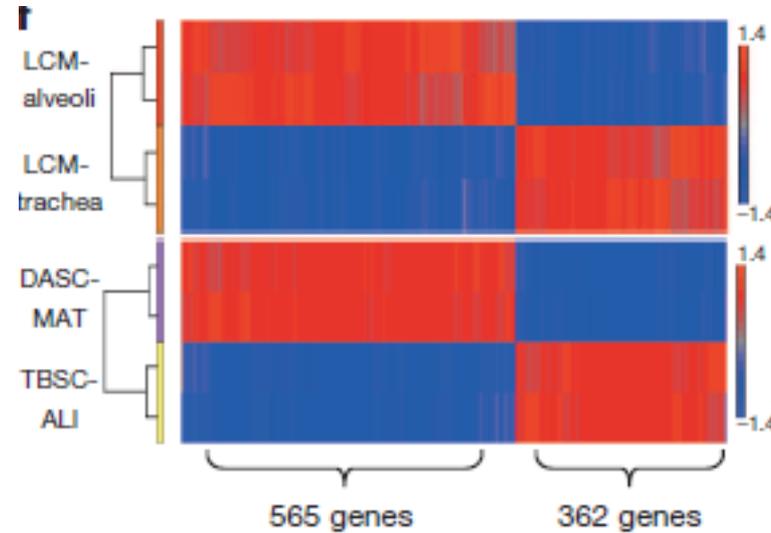
DASC Distal Airway Stem Cells are essential for lung regeneration DASC-MAT



Matrigel

DASC: unilaminar, Alveolar-ähnliche
Regionen, PZ-T1 (Pdpn, Aqp5) und PZ-T2
(SPC)

-> jedoch: wenn DASC Matrigel und TBSCALI
dargestellt werden -> sehr große Variationen in
Genexpressionen

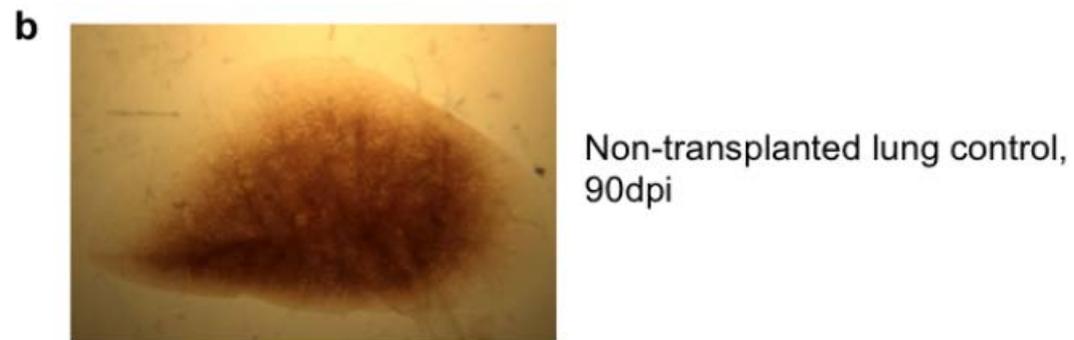
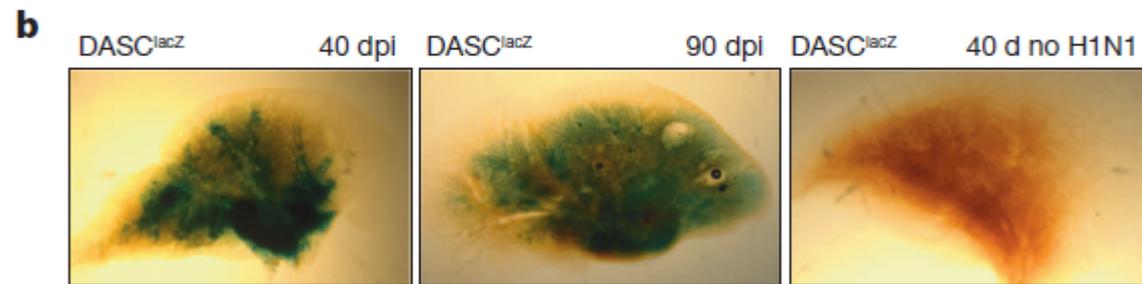
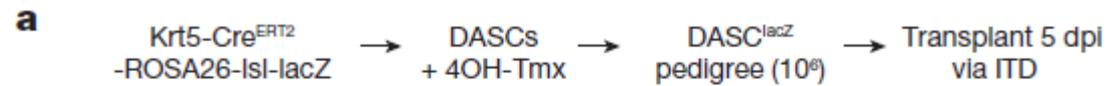




Große Unterschiede in Genexpressionsmuster von DASC-Mat und TBSC-ALI

DASC-Mat -> große Übereinstimmung mit
Alveolen-Data-Set

TBSC-ALI -> große Übereinstimmung mit
Trachealen-Data-Set



Integration von DASC^{lacZ} und TBSC^{lacZ} Genen in geschädigtes Lungengewebe

40dpi (35d post transplantation) -> DASC verteilt sich
von den Atemwegen ausstrahlend

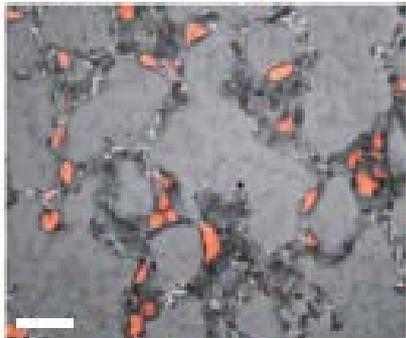
90dpi -> intensivere Musterausbreitung v.a. in
interstitiellen Regionen

40dpi (kein H1N1) -> keine Verteilung von DASC!

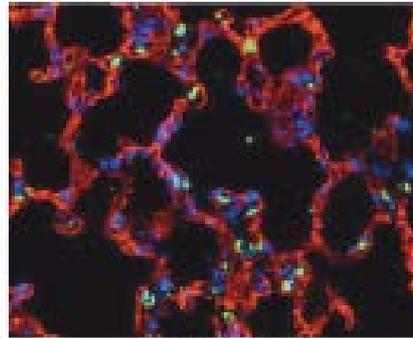
40dpi (keine Transplantation) -> auch keine Verteilung
von DASC!



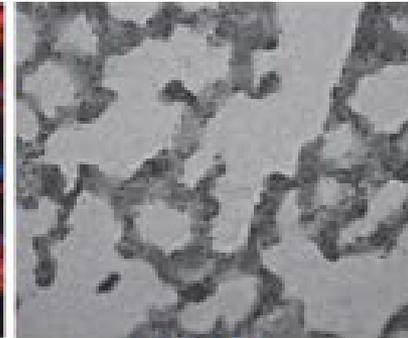
DASC^{lacZ} 90 dpi



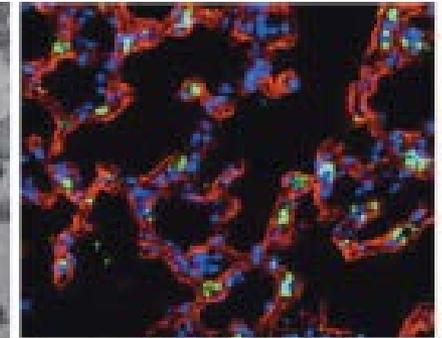
β-gal



SPC 1H8



β-gal



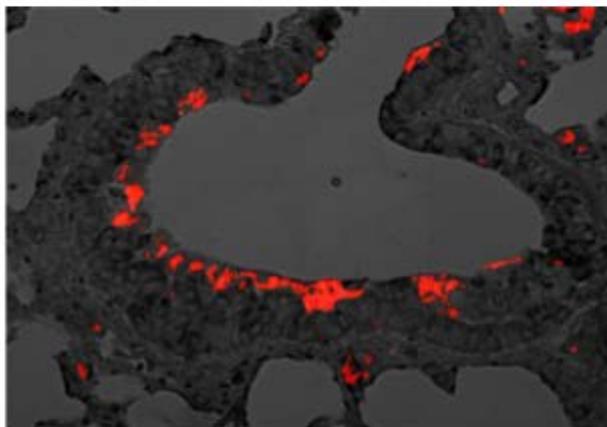
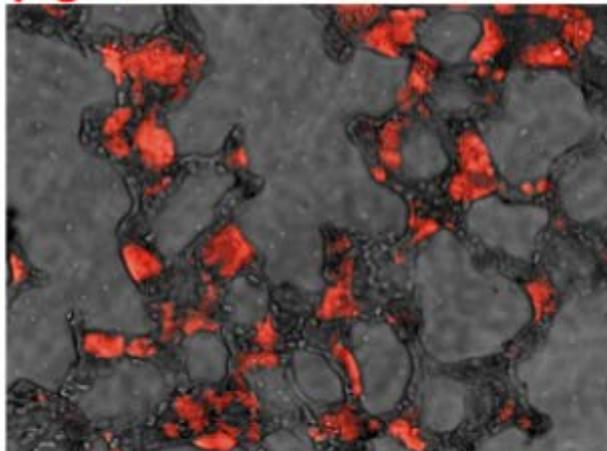
SPC 1H8

Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

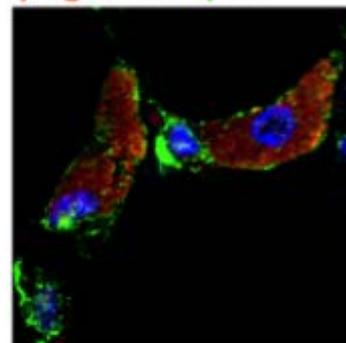


90dpi

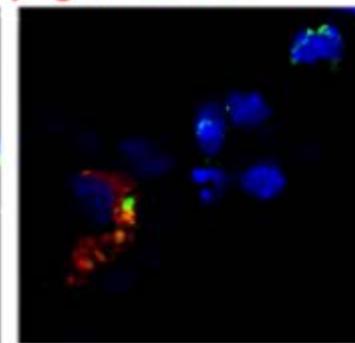
β -gal



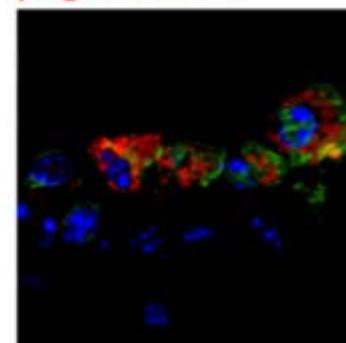
β -gal Pdpn



β -gal SPC



β -gal CC10



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration

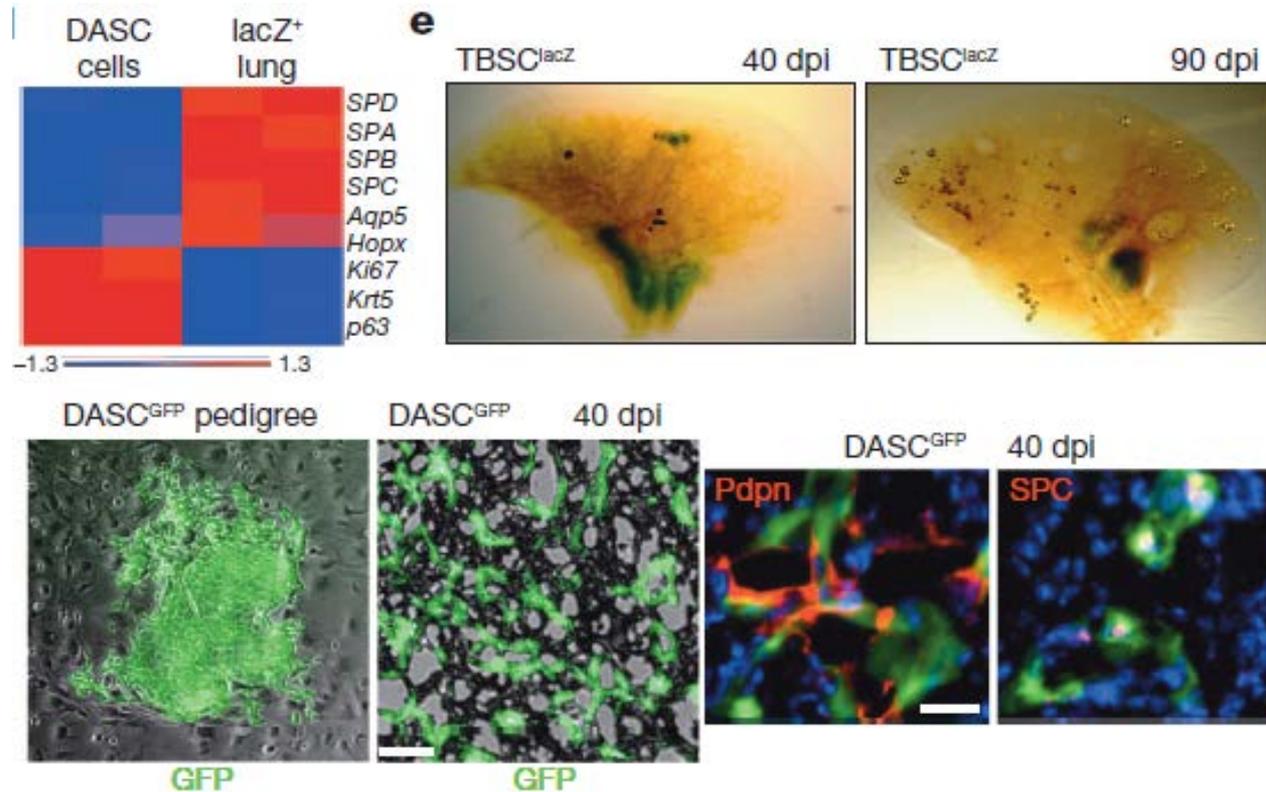


Transplantation von DASC

Teil1

zumindest 40% d. Zellen in Alveolarregionen exprimieren PZ-Marker (Pdpn, 1H8, SPC)

zumindest 80% d. b-Gal-pos.-Zellen in bronchialen Regionen exprimieren sekretorische Zellen Marker (CC10)





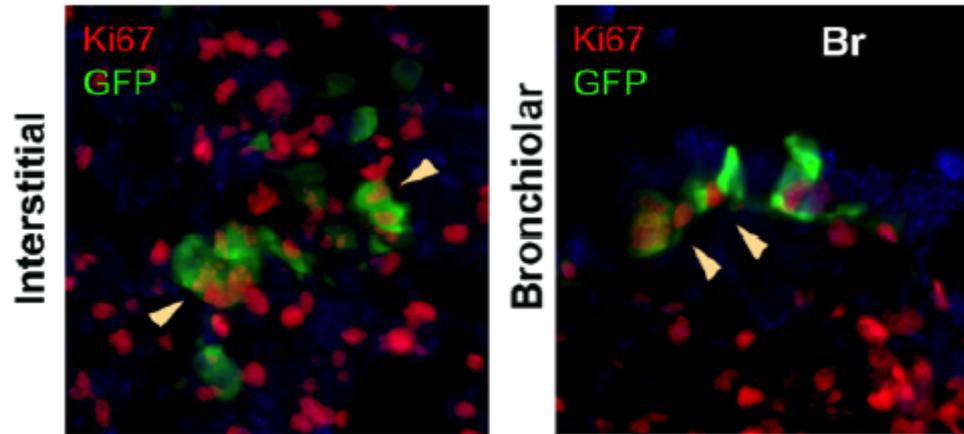
Transplantation von DASC

Teil2

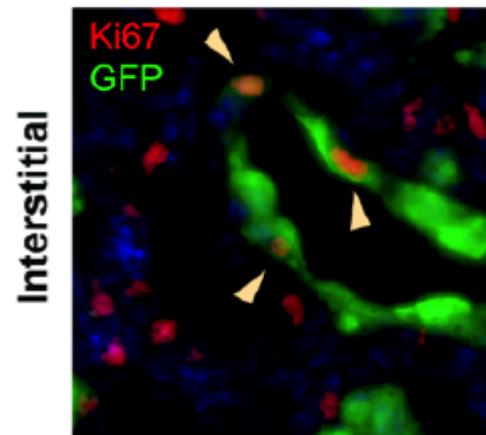
- DASC im geschädigten Lungengewebe -> Differenzierung zu multiplen Epithelzelltypen von Bronchiolen und Alveolen
- TBSC erscheinen begrenzt bei den großen Atemwegen
- transplantierte DASC^{GFP} stellen ähnliches Muster wie Pdpn und SPC dar



7 days post-transplantation DASC^{GFP}



55 days post-transplantation DASC^{GFP}



Distal Airway Stem Cells are
essential for lung regeneration



Persistierende Proliferation der transplantierten DASC

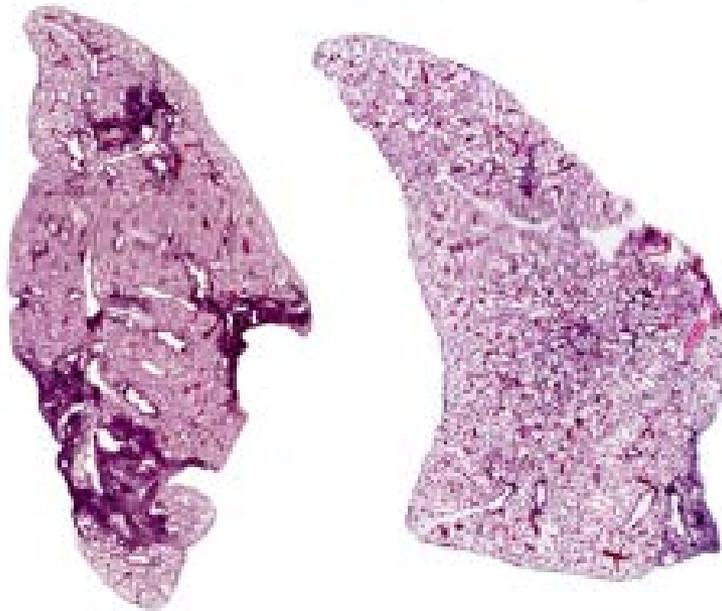
55dpi -> DASC^{GFP} und Ki67
(Proliferationsmarker) zeigen einen
progressiven Verlauf der Expression

→ hohe Lebensfähigkeit & erweiterter
Beitrag zur Regeneration der Lunge



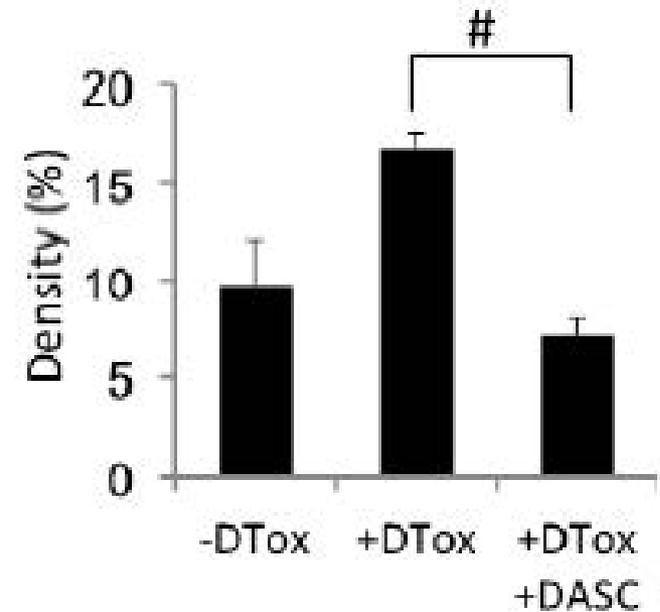
DTR+DTox

DTR+DTox + DASC



40dpi

Lung damage





DASC Transplantation in KRT-DTR-Maus

40dpi: DASC-ablatierte Lungen führen bei DASC Transplantation zur Reduktion der interstitiellen Verdichtung !

Zusammenfassung

Erstaunliche Regenerationskapazität der Lunge nach großflächigen akuten Lungenschädigungen, bei prä-existenten Stammzellen.

DASC differenziert zu multiplen epithelialen Zelllinien (sekret. Bronchialzellen, PZ-T1, PZ-T2) um distale Lunge zu regenerieren.

Zusammenfassung

- Die Untersuchungen bestimmen einen mechanischen Rahmen für das dringliche Konzept der Lungenregeneration und unterstreichen potentielle therapeutischen Strategien, welche diesen Prozess ausbeuten.

**Vielen Dank für die
Aufmerksamkeit!**