
**Monitoring der
Bleomycin-induzierten Lungenfibrose
durch repetitive
Lungenfunktionsmessung im
Maus-Modell und die Rolle der
Protein-Arginin Methylierung für die
Fibroseentwicklung**

Catharina Ehlebracht



München 2018

Aus dem Institute for Lung Biology an Disease (ILBD)
des Comprehensive Pneumology Centers (CPC)
ehem. Vorstand: Prof. Dr. Oliver Eickelberg

**Monitoring der Bleomycin-induzierten
Lungenfibrose durch repetitive
Lungenfunktionsmessung im Maus-Modell
und die Rolle der Protein-Arginin
Methylierung für die Fibroseentwicklung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Catharina Ehlebracht
aus Herne

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Eickelberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Rosenecker

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. Ali Önder Yildirim

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Catharina EHLEBRACHT, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema , 'Monitoring der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose durch repetitive Lungenfunktionsmessung im Maus-Modell und die Rolle der Protein-Arginin Methylierung für die Fibroseentwicklung' selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Unterschrift Doktorandin: Catharina Ehlebracht

Ort, Datum: München den 10.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	v
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Lungenfibrose: Definition	3
1.1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen/ Diffus parenchymatöse Lungenerkrankungen (ILD/DPLD)	4
1.1.2 Idiopathische Lungenfibrose (IPF)	4
1.2 Diagnose, Ätiologie und Verlauf der Idiopathischen Lungenfibrose	6
1.2.1 Usual interstitial pneumonia (UIP)	6
1.2.2 Klinische Manifestation und Verlauf	7
1.2.3 Ätiologie	9
1.2.4 Pathogenese der IPF	9
1.2.5 Therapeutische Ansätze	10
1.3 Bleomycin-induzierte Lungenfibrose im Maus-Modell	11
1.4 Lungenfunktionsmessung als Krankheitsmonitoring der IPF	14
1.4.1 Lungenfunktionsmessung bei Mäusen	15
1.4.2 Repetitive Lufu im Bleomycin-Modell	16
1.5 PRMTs Definition und Überblick	17
1.5.1 Klassifikation	18
1.5.2 Coactivator-associated Arginin Methyltransferase 1 (CARM1)	20
1.5.2.1 Lokalisation, Struktur und Substrate	21
1.5.2.2 CARM1 und IPF	22
2 Ziel der Arbeit	23
3 Methoden und Material	25
3.1 Experimentdesign	26
3.1.1 CARM1 Versuchsreihe	27
3.2 Versuchsarbeit	28
3.2.1 Mäuse	28
3.2.2 Intubation	29

3.2.3	Lungenfunktion	30
3.2.4	Instillation	31
3.2.5	Präparation	32
3.3	Probenaufarbeitung und Datengewinnung	33
3.3.1	BAL, Zellfärbung und Zellzählung	33
3.3.2	Histologie	35
3.3.3	Morphologische Untersuchungen	37
3.3.4	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	40
3.3.4.1	Quantitative PCR	42
3.3.5	Western Blots	44
3.3.6	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Krankheitsmonitoring im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose	47
4.1.1	Histologie	48
4.1.1.1	Semiquantitative Morphologie und quantitative Stereologie	50
4.1.2	Lungenfunktionsmessung	51
4.1.2.1	Single-Lufu-Gruppe	51
4.1.2.2	Repetitive-LuFu-Gruppe	53
4.1.3	Zellzahlen in der Bronchoalveolären Lavage	54
4.2	Realtime PCR	56
4.3	Bleomycin-induzierte Fibrose bei CARM1 ^{+/-} Mäusen	58
4.3.1	Western Blot	59
4.3.2	Histologie	60
4.3.3	Lungenfunktion	61
5	Diskussion	65
6	Ausblick	77
7	Zusammenfassung	81
8	Summary	85
A	Geräte und Material	89
A.1	Geräte	89
A.2	Material	90
A.2.1	Farben für histologische Färbungen	90
B	Tabellen	93
B.1	Tabellarische Messwerte single-Lufu	93
B.2	Tabellarische Werte repetitive-Lufu	93
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

1.1	UIP in HRCT und Histologie	7
3.1	Experimentdesign	27
3.2	Histologie: gesundes Lungengewebe vs. Fibrose	39
3.3	Screenshot CAST-	39
4.1	Histologie single Lufu-Gruppe	48
4.2	Histologie repetitive-Lufu-Gruppe	49
4.3	Morphologie und Stereologie	50
4.4	Kollagenanteil repetitive-Lufu-Gruppe	51
4.5	Lungenfunktionsparameter single-Lufu-Gruppe	52
4.6	Lungenfunktionsparameter LuFu-Gruppe	54
4.7	Zellzahlen der Bronchoalveolären Lavage (BAL), single-Lufu-Gruppe	55
4.8	qRT-PCR Col1a und PAI-1	57
4.9	qRT-PCR PRMTs	58
4.10	Western Blot CARM1	59
4.11	Histologie Carm1 ^{+/-}	60
4.12	fig: Kollagenanteil Carm1	61
4.13	LuFu CARM1 ^{+/-} vs. Wildtyp Tag 21	62
4.14	LuFu Carm1 ^{+/-} vs. Wildtyp Tag 28	62
4.15	LuFu CARM1 ^{+/-} vs. Wildtyp Tag 21 und 28, Normdaten	63
5.1	Korrelation Kollagenanteil und Lufu	67

Tabellenverzeichnis

3.1	Messkriterien und Zählpunkte	40
3.2	Primer-Liste	44
A.1	Farben für HE-Färbung	90
A.2	Farben für Masson-Trichrom-Färbung	91
A.3	Farben für May-Grünwald-Giemsa Färbung	91
B.1	Compliance single-Lufu-Gruppe	93
B.2	Resistance single-Lufu-Gruppe	93
B.3	Inspiratory Capacity single-Lufu-Gruppe	93
B.4	Newtonian Resistance single-Lufu-Gruppe	94
B.5	Compliance repetitive-Lufu-Gruppe	94
B.6	Resistance repetitive-Lufu-Gruppe	94
B.7	Inspiratory Capacity repetitive-Lufu-Gruppe	94
B.8	Newtonian Resistance repetitive-Lufu-Gruppe	94

Abkürzungsverzeichnis

BAL	Broncho Alveoläre Lavage
CARM1	Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1
CAST	Computer Assisted Stereological Toolbox
DDAH	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase
DIP	Desquamative Interstitial Pneumonia
EAA	Exogen Allergische Alveolitis
ECM	Extracellular Matrix
HRCT	High Resolution Computed Tomography
IHC	Immunohistochemistry
IIP	Idiopathic Interstitial Pneumonia
ILD	Interstitial Lung Disease
IPF	Interstitial Pulmonary Fibrosis
Kg	Kilogramm
KG	Körper Gewicht
LuFu	Lungen Funktionsmessung
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NSIP	Non Specific Interstitial Pneumonia
PBS	Phosphat Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PRMT	Protein Arginine Methyltransferases
RB-ILD	Respiratory Bronchiolitis-associated Interstitial Lung Disease
UIP	Usual Interstitial Pneumonia

Kapitel 1

Einleitung

Die Idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine interstitielle Erkrankung des Lungengewebes, die bis zum heutigen Tag nur ungenügend verstanden und behandelbar ist. Über einen schwer vorhersagbaren Zeitraum hinweg, findet ein bindegewebiger Umbau der Lunge statt, der schließlich zum Funktionsverlust des betroffenen Lungengewebes führt. Die Patienten zeigen eine zunehmende Dyspnoe-Symptomatik begleitet von einer stetigen Verschlechterung der Lungenfunktion. Oft ist ein tödlicher Verlauf der Erkrankung innerhalb weniger Jahre ab Diagnosestellung zu beobachten [14, 103]. Zufriedenstellende Therapiemöglichkeiten gibt es bisher keine. Als ultima Ratio bleibt lediglich die Lungentransplantation. Einzig das antifibrotisch und antiproliferativ wirksame Medikament Pirfenidon konnte bislang in mehreren klinischen Phase III Studien die Krankheitsprogression bremsen und das progressionsfreie Überleben verlängern [66] .

Die Pathomechanismen, die der Entstehung einer IPF zugrunde liegen, sind bisher zu großen Teilen unbekannt. Die Erforschung der Krankheitsentwicklung ist daher von großer Bedeutung und brachte in den vergangenen Jahren eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten hervor.

Um den Verlauf einer Lungenfibrose wissenschaftlich beobachten und analysieren zu können, wurde unter anderem das Maus-Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose entwickelt (siehe 1.3). Spiegelt es auch nicht exakt die histopathologischen Veränderungen einer IPF wider, so hat es sich dennoch als gängiges Modell zur Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge einer pulmonalen Fibrose-Entwicklung etabliert [77]. Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Fibrose, stehen im Bleomycin-Modell verschiedene Methoden zur Verfügung. Ein wesentlicher Bestandteil des Modelles ist die

histologische Aufarbeitung des Lungengewebes der Versuchstiere. Hierdurch lässt sich u.a. das Ausmaß der Fibrosierung bestimmen und mithilfe verschiedener Färbemethoden sind Rückschlüsse auf die Beschaffenheit des fibrotischen Gewebes möglich.

Um jedoch einen Eindruck der funktionellen Veränderungen zu bekommen, die mit der Entwicklung einer Lungenfibrose einhergehen, eignet sich die histologische Untersuchung nicht. Es hat sich daher seit einigen Jahren auch die Lungenfunktionsmessung bei Mäusen etabliert (siehe 1.4.1). Das Verfahren wird derzeit zumeist mittels der sehr invasiven Methode der Tracheotomie durchgeführt und erlaubt daher keine mehrfachen Untersuchungen an derselben Maus über längere Zeiträume hinweg, da ein unbeeinträchtigt Fortleben der Versuchstiere nach Tracheotomie nicht möglich ist. Die deutlich weniger invasive Methode der Intubation von Mäusen dagegen bietet die Möglichkeit, Lungenfunktionsmessungen an mehreren Zeitpunkten durchzuführen. Dadurch werden potentiell Krankheitsverläufe der individuellen Maus messbar.

Bezüglich der mutmaßlichen Pathogenese einer IPF gibt es derzeit verschiedene Erklärungsansätze. Nach aktuellem Erkenntnisstand ist vor allem eine Dysregulation der alveolären Epithelzellen mit einer überschießenden Fibroproliferation für die fortschreitende Fibrosierung des Lungenparenchyms verantwortlich [65, 108, 109].

Nachdem in den vergangenen Jahren der posttranslationalen Protein Arginin Methylierung durch Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) zunehmend eine wichtige Bedeutung bei der Regulierung zahlreicher, grundlegender zellulärer Prozesse beigegeben wird [13], finden sich vermehrt Hinweise darauf, dass die Enzymklasse der PRMTs auch in der Pathogenese diverser Lungenerkrankungen, so auch bei der IPF, eine zentrale Rolle spielt [136].

Yildirim et al. gelang 2006 der Nachweis von PRMTs in der Lunge von Mäusen, wobei sich die höchste Dichte in den Epithelzellen der Atemwege und in alveolären Epithelzellen vom Typ II fand [133]. O'Brien et al. stellten 2010 fest, dass speziell das Fehlen von PRMT4/CARM1 (Coactivator-associated arginine Methyltransferase 1) bei Mäusen mit einem entsprechenden Gen-Knockout eine Störung der Entwicklung und Differenzierung von alveolären Epithelzellen Typ II zur Folge hatte [89]. Sarker et al. konnten in ihrer Studie von 2015 wiederum zeigen, dass CARM1 offenbar wichtige Funktionen bei Prozessen der Zellalterung erfüllt [107]. So führte ein Knockdown von CARM1 zu einer negativen Beeinflussung von Sirtuin 1 und HuR, beides Proteine die Einfluss auf den Zellzyklus haben und der Zellalterung entgegenwirken. Die IPF wiederum ist eine

Erkrankung, die ihren Häufigkeitsgipfel zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade hat. Sie ist damit eine Erkrankung des älteren Menschen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen, und unter der Annahme, dass der Fibroseentwicklung eine Dysregulierung der alveolären Epithelzellen zugrunde liegt, ist die Hypothese naheliegend, PRMT4/CARM1 könne eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der IPF spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde, unter Verwendung des Bleomycin-Maus-Modelles, die pulmonale Fibrose-Entwicklung mithilfe repetitiver Lungenfunktionsmessungen untersucht, um diese Art des Krankheitsmonitorings potentiell für künftige Arbeiten zu etablieren.

Überdies wurde die Enzymklasse der PRMTs im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose untersucht, um Rückschlüsse auf deren mögliche Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose ziehen zu können. Eine eigene Versuchsreihe galt dabei PRMT4/CARM1, dessen Beteiligung an der Pathogenese fibrotischer Lungenerkrankungen u.a. aufgrund der Ergebnisse von Yildirim, O'Brien und Sarker sehr wahrscheinlich scheint.

1.1 Lungenfibrose: Definition

Der Begriff der Lungenfibrose wird vereinfachend verwendet um die große Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) zusammenzufassen. Synonym ist auch der Begriff 'diffus parenchymatöse Lungenerkrankungen' (DPLD) gebräuchlich. Es handelt sich hierbei um eine Vielzahl verschiedener Lungenerkrankungen, denen entzündliche Veränderungen und eine Fibrosierung des Lungenparenchyms gemein sind. Die Art und Ausprägung der Lungengewebsveränderungen sind dabei von unterschiedlicher Qualität. Klassischerweise betreffen sie sowohl das Lungenepithel als auch das Interstitium und das Endothel der pulmonalen Blutgefäße [81].

Grundsätzlich ist bei den interstitiellen Lungenerkrankungen zu unterscheiden, ob eine bekannte Ursache ausgemacht werden kann oder ob es sich um eine idiopathische Lungenfibrose (IPF) handelt.

1.1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen/ Diffus parenchymatöse Lungenerkrankungen (ILD/DPLD)

Zu den bekannten Auslösern einer ILD/DPLD gehören z.B. exogene Faktoren wie Stäube und sonstige Allergene bei der exogen allergischen Alveolitis (EAA), Zigarettenrauch, Systemerkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen (z.B. Lupus Erythematoses, Sklerodermie) und Vaskulitiden (z.B. Morbus Wegener) und verschiedene Medikamente (z.B. Bleomycin, Amiodaron). Auch eine Sarkoidose oder eine Lymphangioloiomatose und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie z.B. chronisch aktive Hepatitiden und chronische Darmerkrankungen, können diffuse Lungenparenchymschäden im Sinne einer ILD/DPLD verursachen. Durch Therapie der Grunderkrankung b.z.w. Vermeidung entsprechender Noxen (bei EAA) sind die entzündlichen und fibrotischen Veränderungen des Lungenparenchyms oft zu einem Teil reversibel [81]. Gut die Hälfte aller Fälle von ILD/DPLD kann jedoch nicht mit einer eindeutigen Ursache in Zusammenhang gebracht werden und wird daher unter dem Begriff der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) zusammengefasst. Eine Sonderrolle innerhalb dieser IIP nimmt die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ein.

1.1.2 Idiopathische Lungenfibrose (IPF)

Die idiopathische Lungenfibrose wurde seit Beginn des Jahrhunderts in diversen wissenschaftlichen Publikationen beschrieben und erfuhr im Laufe der Zeit verschiedene Einteilungen und Klassifikationen.

Schon 1935 beschrieben Hamman und Rich in einer klinischen Studie vier Fälle von Patienten mit einer ungewöhnlich fulminanten Form der pulmonalen Fibrose.[44]

Die Patienten hatten sich über einen Zeitraum von drei Jahren hinweg jeweils mit relativ unspezifischen Symptomen vorgestellt, wobei eine ausgeprägte Dyspnoe im Vordergrund gestanden hatte. Bei leicht variablen Verläufen zeigten alle vier Patienten eine rasche Verschlechterung der respiratorischen Situation und starben innerhalb kurzer Zeit (ein bis knapp fünf Monate nach Symptombeginn) an respiratorischem Versagen (in drei Fällen) b.z.w. an einer dekompensierten Rechtsherzinsuffizienz infolge einer ausgeprägten Lungenfibrose (in einem Fall).

Histopathologisch fanden Hamman und Rich in allen Fällen diffuse Infiltrate und Fibroseherde unterschiedlichen Alters über beide Lungenflügel verteilt. Bemerkenswert war

die Abwesenheit einer offensichtlichen Ursache für den Beginn der Beschwerden und das ausgeprägte fibrotische Geschehen. Hamman und Richs Beobachtungen gelten als Erstbeschreibung der acute interstitial Pneumonia (AIP oder Hamman-Rich Syndrom). Die AIP wurde zunächst der IPF zugeordnet, jedoch gilt sie inzwischen aufgrund des akuten, oft dramatischen Verlaufes als eigenständige Entität.

Eine erste, strukturierte Einteilung der interstitiellen Pneumonien nahm schließlich Liebow Mitte der 60er Jahre vor [76]. Seine Klassifikation orientierte sich an histopathologischen Merkmalen in Gewebeproben betroffener Patienten. Er unterschied die folgenden fünf Formen der interstitiellen Pneumonie:

- Usual interstitial pneumonia (UIP)
- Desquamative interstitial Pneumonia (DIP)
- Bronchiolitis obliterans with interstitial pneumonia (BIP)
- Lymphoid interstitial pneumonia (LIP)
- Giant cell interstitial pneumonia (GIP)

Nachdem sich in den folgenden Jahren zeigte, dass die GIP ätiologisch mit der Exposition gegenüber Metallstäuben (hard metal lung) assoziiert war und die LIP mit Autoimmunerkrankheiten und Immundefizienz, entsprachen diese beiden Entitäten nicht mehr der Definition einer idiopathischen Lungenfibrose.

Katzenstein und Myers etablierten schließlich in einer Übersichtsarbeit von 1998 eine neue histologische Einteilung für die Klassifikation der IPF, wobei sie die UIP und DIP beibehielten und darüber hinaus die Begriffe der acute interstitial pneumonia (AIP), der nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) und der respiratory bronchiolitis associated interstitial lung disease (RB-ILD) als Äquivalent der DIP aufgriffen [60].

Verschiedene klinische Studien und eine zunehmende Genauigkeit in der histopathologischen Diagnostik zeigten jedoch, dass sich die UIP wesentlich von den anderen IPF-Formen unterscheidet, da sie zum einen kaum auf eine Therapie mit Steroiden anspricht und zum anderen eine sehr schlechte Prognose aufweist [59]. In dem ersten consensus Statement der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) zur Diagnose und Therapie der IPF ist daher seit 2000 die UIP als Äquivalent und charakteristisches histopathologisches Muster der IPF definiert [115].

1.2 Diagnose, Ätiologie und Verlauf der Idiopathischen Lungenfibrose

Gemäß den offiziellen Leitlinien zur Diagnose und Therapie der idiopathischen pulmonalen Fibrose, herausgegeben als offizielles Statement der ATS/ERS/JRS/ALAT¹, ist "die IPF [...] definiert als eine bestimmte Form einer chronischen, progredient verlaufenden, fibrosierenden interstitiellen Pneumonie unbekannter Ursache, die primär bei älteren Erwachsenen auftritt, auf die Lungen begrenzt ist und mit dem [...] histopathologischen und/oder radiologischen Muster einer UIP einhergeht" [14][103].

Als Voraussetzungen für die Diagnose einer IPF sehen die Leitlinien folgende Kriterien vor:

1. Ausschluss anderer bekannter Ursachen einer IID
2. Vorliegen eines UIP-Musters im HRCT
3. Bei Patienten mit chirurgischer Lungenbiopsie entsprechende Vereinbarkeit von Histologie und HRCT mit UIP

1.2.1 Usual interstitial pneumonia (UIP)

Die Definition der UIP aus radiologischer Sicht beinhaltet ein, im high resolution CT (HRCT) sichtbares, basal und subpleuraständiges Verteilungsmuster fibrotischer Veränderungen des Lungenparenchyms. Charakteristisch ist ein retikuläres Zeichnungsmuster, oft in Begleitung von Traktionsbronchiektasien. Typischerweise stellen sich die Veränderungen als heterogenes, fleckiges Honigwabenmuster (Honeycombing) dar. Fibrotische Areale sind durchsetzt von zystischen Lufteinschlüssen [115]

Als wichtiges Diagnosekriterium wird auch die Abwesenheit von mit der UIP unvereinbaren Merkmalen angeführt. Dazu gehören z.B. ein Verteilungsmuster auf die Ober- und Mittellappen, ausgedehnte Milchglasveränderungen (>retikuläre Zeichnung) und eine Konsolidierung die sich auf ein Bronchialsegment oder einen Lungenlappen beschränkt. Das histologische Bild einer UIP zeichnet sich definitionsgemäß durch eine starke Heterogenität schon bei geringer Vergrößerung aus. Normales Lungenparenchym wechselt

¹American Thoracic Society (ATS), European Respiratory Society (ERS), Japanese Respiratory Society (JRS) und Latin American Thoracic Association (ALAT).

sich mit fleckig verteilten, schwach entzündlichen Infiltraten und Arealen von Fibrose ab. Die Veränderungen finden sich, analog zum Bild im HRCT, vornehmlich subpleural und paraseptal und zeichnen sich durch einen hohen Kollagenanteil und fibroblastische Herde (fibroblast foci) aus. Das Honigwabemuster stellt sich mikroskopisch als Mischung von Fibrose und zystischen Lufteinschlüssen dar, siehe Abbildung 1.1 [115].

Von enormer Wichtigkeit für die korrekte Diagnosestellung einer UIP im Rahmen der IPF, ist die Kenntnis des klinischen Beschwerdebildes und der ausführlichen Anamnese des Patienten.

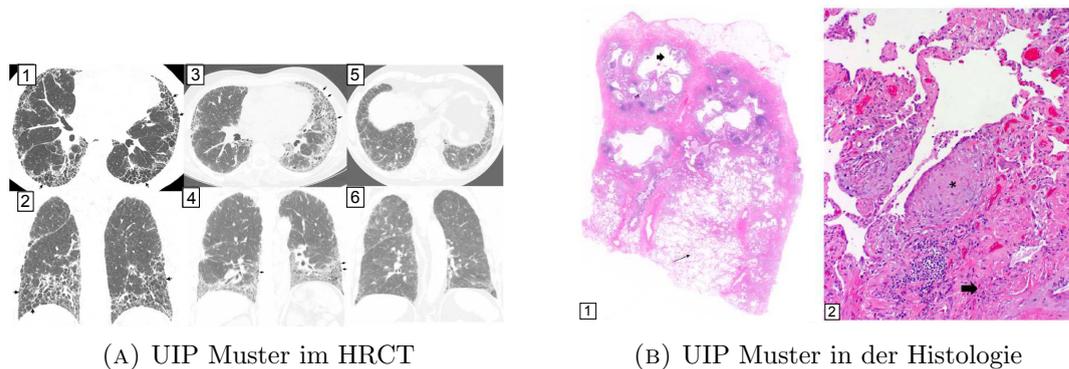


ABBILDUNG 1.1: Das Muster einer UIP hier im HRCT (A) und im histologischen Präparat (B). Die HRCT-Bilder (A)[1-4] zeigen die UIP in stärkerer [1+2] und geringerer [3+4] Ausprägung (Pfeile), während es sich bei [5+6] um das Muster einer 'möglichen' UIP handelt. Das histologische Präparat (B) zeigt den Anschnitt einer Lungenbiopsie mit UIP Muster. Der dünne Pfeil in (B)1 markiert Reste normalen Lungengewebes, der dicke Pfeil typisches Honigwabemuster. In (B)2 ist ein fibroblastischer Focus (*) sowie ältere Fibroseareale (dicker Pfeil) zu sehen. Die Abbildungen stammen aus der Veröffentlichung von Raghu et al. [103]

1.2.2 Klinische Manifestation und Verlauf

Die IPF ist eine Erkrankung des mittleren bis höheren Alters. Typischerweise wird die Diagnose zwischen dem 55 bis 65 Lebensjahr gestellt. Eine Erkrankung vor dem 50 Lebensjahr ist selten [102].

Der Symptombeginn ist oft unspezifisch und schleichend. Im Mittelpunkt der Beschwerden steht eine Belastungsdyspnoe, häufig begleitet von chronischem, unproduktivem Husten. Nicht selten geben Patienten an, sich von einem Infekt der Atemwege „nicht mehr richtig erholt“ zu haben.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Zunahme der Dyspnoe, die Lungenfunktion verschlechtert sich. Insbesondere eine Abnahme der Forcierten Vitalkapazität (FVC) und der Diffusionskapazität (D_LCO) sprechen für eine Krankheitsprogredienz und sind

mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert [24][43][56]. Radiologisch lassen sich anhand einer Quantifizierung der fibrotischen Veränderungen im HRCT Aussagen zu Krankheitsschwere und zur Prognose des Krankheitsverlaufes treffen [73]. Die Entnahme chirurgischer Biopsien der Lunge zur Diagnosestellung einer UIP und Einschätzung der Krankheitsprognose ist von umstrittenem Nutzen, da mithilfe des HRCTs eine ausreichend hohe Diagnose-Sensitivität erreicht werden kann [33] [100] und letztlich unklar ist, inwieweit das chirurgische Trauma einer Biopsieentnahme akute Exazerbationen der IPF provozieren kann. Ähnlich unklar ist der diagnostische und prognostische Nutzen der bronchoalveolären Lavage bei IPF-Patienten. Kinder et al beschrieben eine Erhöhung der Neutrophilen-Zahl als unabhängigen Marker für eine verfrühte Mortalität unter IPF-Patienten [64]. Eine Erhöhung der Lymphozyten hingegen weist auf eine unerkannte exogen allergische Alveolitis als Ursache für die fibrotischen Veränderungen hin [90]. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Studien, die sich mit verschiedensten Biomarkern als Prädiktoren des Krankheitsverlaufes einer IPF beschäftigen (u.a. BNP, Metalloproteasen, Surfactant Proteine) [73] [135]. Die Untersuchungen haben derzeit jedoch überwiegend experimentellen Charakter und werden noch nicht in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt.

Auskultatorisch ist ein feinblasiges Knisterrasseln in den basalen Lungenabschnitten typisch. In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung können zudem Hypoxie-typische Veränderungen wie Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel beobachtet werden. Die Patienten leiden an einer zunehmenden respiratorischen Insuffizienz mit Beschwerden auch in Ruhe. Todesursache ist oft ein respiratorisches Versagen oder eine komplizierende Komorbidität [19] (siehe auch Review Artikel von Kim et al. [63]).

Der klinische Verlauf der IPF variiert jedoch von Patient zu Patient. Es werden sowohl schleichende als auch relativ rasch progrediente Verlaufsformen mit akuten Exazerbationen beobachtet [25]. Daten aus umfangreichen Langzeitstudien liegen bisher nicht vor. Studien der letzten Jahre gehen jedoch von einer mittleren Überlebenszeit von zwei bis drei Jahren ab Diagnosestellung aus [102][104]. In diesem Zusammenhang wird, berechtigterweise, oft der Vergleich zu malignen Tumorerkrankungen gezogen, die größtenteils eine bessere Prognose aufweisen.

1.2.3 Ätiologie

Wie die Bezeichnung 'idiopathisch' bereits impliziert, ist die Ätiologie der IPF bis zum heutigen Tag nicht geklärt. Es werden eine Reihe prädisponierender Faktoren diskutiert, die in Hinblick auf mögliche therapeutische oder prognostische Ansätze Gegenstand diverser wissenschaftlicher Arbeiten sind.

Unter anderem hat die Mehrzahl der IPF-Patienten nachweislich eine positive Raucher-Anamnese [12]. Überdies wird eine mögliche familiäre Genese angenommen, da in bis zu 5 % der Fälle eine familiäre Häufung beobachtet wird [48][115]. Des Weiteren werden ein asymptomatischer gastroösophagealer Reflux [101], chronische Virusinfektionen (z.B. Epstein-Barr Virus, Hepatitis C und Andere) [116][120][123][134] und eine chronische Exposition gegenüber diversen organischen und anorganischen Stäuben (z.B. Blei, Holzstaub, Tierstaub etc.) als mögliche Risikofaktoren diskutiert [67][83]. Abgesehen von Fällen familiärer Häufung, wurden auch bei der häufigeren, sporadischen Form der IPF verschiedene Gene mit der Krankheitsentwicklung in Verbindung gebracht. So gelten z.B. transforming growth factor beta-1 (TGF- β), tumor necrosis factor alpha TNF- α und Endothelin-1 (ET-1) gemeinhin als profibrotische Mediatoren, die gehäuft im fibrotischen Lungengewebe von IPF-Patienten nachgewiesen werden können [61] [112] [105] [111]. Auch Interleukin 1 α und β (IL-1) gelten als profibrotische Cytokine, insbesondere, wenn ein Ungleichgewicht zwischen IL-1 und dem Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1 Ra) zulasten des Rezeptorantagonisten besteht [9].

Bisher ist es anhand der detektierten, Risikofaktoren nicht möglich, Rückschlüsse auf Prognose oder Verlauf der IPF zu ziehen. Auch evidenzbasierte Aussagen zu diesbezüglichen Therapieansätzen lassen sich nicht treffen.

1.2.4 Pathogenese der IPF

Trotz jahrzehntelanger Forschung, besteht weiterhin Unklarheit über die genauen Pathomechanismen die der IPF zugrunde liegen. Seit Hamman und Richs Erstbeschreibung der AIP, hielt sich lange die Hypothese einer chronischen Inflammation der peripheren Atemwege, im Sinne einer Alveolitis, die in letzter Konsequenz in die Fibrose führt. Dieser Ansatz einer überschießenden bzw. fehlgeleiteten Immunreaktion ist vor allem deshalb nicht dauerhaft haltbar, weil Therapieversuche mit Immunsuppressiva bisher enttäuschende Resultate lieferten [29]. Aus Mangel an pharmakologischen Alternativen,

wird in der Behandlung der IPF zwar weiterhin mit Kortikosteroiden gearbeitet, ein genereller Nutzen konnte jedoch bis zum heutigen Tag nicht nachgewiesen werden [103]. Erst in den letzten Jahren wird vermehrt mit Pirfenidon gearbeitet, das immerhin eine gewisse antifibrotische Potenz zu haben scheint und damit die derzeit einzige sinnvolle Therapieoption im Sinne einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens darstellt. Seit einigen Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass der UIP/IPF eine gestörte Wundheilung des Alveolarepithels zugrunde liegt. Mutmaßlich führen, noch nicht abschließend charakterisierte, wiederholte Verletzungen des Alveolarepithels zu einer vermehrten Bildung profibrotischer Substanzen, wie z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) [87], Transforming growth factor beta 1 ($\text{TGF}\beta 1$) [61] oder Endothelin-1 (ET-1) [1]. Das geschädigte Alveolarepithel induziert offenbar außerdem die Migration von Fibroblasten und deren Aktivierung in Myofibroblasten. Fibroblasten und Myofibroblasten stellen die Hauptbestandteile fibroblastischer Foci dar, die als charakteristische Merkmale einer UIP/IPF gelten (siehe 1.2.1).

Während , bei normaler Wundheilung, eine rasche Reepithelialisierung stattfinden müsste, scheinen die alveolären Epithelzellen bei Patienten mit IPF in ihrer Funktion stark beeinträchtigt zu sein und sogar prokoagulatorisch und profibrotisch auf die fibroblastischen Foci zu wirken.(siehe auch Reviews von Selman et al. [108] und Harari und Caminati [45])

1.2.5 Therapeutische Ansätze

Die 2011 veröffentlichten, überarbeiteten Leitlinien der ATS/ERS/JRS/ALAT zur Diagnose und Therapie der IPF konstatieren, dass bis heute keine pharmakologische Therapie mit einem definitiv bewiesenen Nutzen existiert. [103] Im Endstadium der IPF bleibt als lebensrettende Maßnahme lediglich die Lungentransplantation.

Nichtsdestotrotz wurden in den Leitlinien eine Reihe von therapeutischen Ansätzen bewertet, die in den letzten Jahren im Rahmen klinischer Studien wissenschaftlich untersucht wurden, und unterschiedlich starke oder schwache Empfehlungen gegen die Nutzung der jeweiligen Präparate abgegeben. Eine schwache Empfehlung gegen ein Medikament bedeutet in diesem Kontext, dass keine generelle Empfehlung für die Nutzung ausgesprochen werden kann, einzelne Patienten jedoch möglicherweise von der Therapie profitieren.

In diesem Sinne werden folgende Substanzen für einen Teil der IPF-Patienten als therapeutische Optionen genannt:

- Kombinationstherapie aus Acetylcystein, Azathioprin und Prednison
- Monotherapie mit Acetylcystein
- Antikoagulanzen
- Pirfenidon

In der deutschen "S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose" von 2013 (übersetzte, angepasste und kommentierte Version des "[...] Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management" von 2011) werden diese Empfehlungen aufgegriffen und kritisch bewertet.[14]

Aufgrund neuerer Erkenntnisse aus aktuellen Studien wird hier eine stark negative Empfehlung für die Kombinationstherapie mit Acetylcystein, Azathioprin und Prednison sowie für die Therapie mit Antikoagulanzen ausgesprochen. Für die Therapie mit Pirfenidon hingegen wird die schwach negative in eine schwach positive Empfehlung umgewandelt.

In jedem Fall wird eine gründliche Evaluation der individuellen Situation jedes Patienten empfohlen. Darauf basierend und unter Einbeziehung der Wünsche des Patienten, sollte die Therapieentscheidung getroffen werden.

1.3 Bleomycin-induzierte Lungenfibrose im Maus-Modell

Die schlechte Prognose und das geringe Wissen um die Entstehungsmechanismen einer IPF, machten und machen es weiterhin notwendig, Modelle zur wissenschaftlichen Erforschung der Erkrankung zu etablieren.

Das bislang bekannteste und am besten studierte Modell auf diesem Gebiet ist das der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen.

Bleomycin ist ursprünglich ein Antibiotikum, das Ende der 60er Jahre entdeckt wurde [117] und auch heute noch als zytotoxisches Chemotherapeutikum zur Therapie u.a. von

Hodentumoren und Lymphomen verwendet wird. Eine bekannte und gefürchtete Nebenwirkung von Bleomycin ist die Entwicklung einer Pneumonitis (Bleomycin induzierte Pneumonitis, BIP) die in einer manifesten Lungenfibrose enden kann [34].

Diese unerwünschte Nebenwirkung des Bleomycins machten sich Adamson und Bowden erstmals 1974 zunutze und untersuchten sie im Maus-Modell [3]. Sie injizierten männlichen Albino-Mäusen über vier Wochen hinweg, zweimal wöchentlich 0,5 mg Bleomycin intraperitoneal und stellten fest, dass dieses Injektionsschema eine rasche und zuverlässige Fibrose-Entwicklung bei den Versuchstieren hervorrief. Aufgrund dieser Ergebnisse schlugen sie das Bleomycin-Maus-Modell zur Erforschung der Lungenfibrose des Menschen vor.

Tatsächlich ist das Bleomycin-Modell in der IPF-Forschung inzwischen weithin etabliert, wobei es im Laufe der Zeit naturgemäß zahlreiche Veränderungen und Anpassungen erfuhr.

Spritzten Adamson und Bowden das Bleomycin noch intraperitoneal, kamen später außerdem die intranasale, intravenöse und schließlich die intratracheale Applikation auf. Der Vorteil der direkt intratrachealen oder wenigstens intranasalen Applikation besteht darin, dass das Bleomycin primär in die Lunge der Mäuse gelangt. Dadurch kommt es zu einer deutlich rascheren Fibrose-Entwicklung, die außerdem primär von den Alveolen ausgeht, statt vom Endothel der pulmonalen Blutgefäße und damit der mutmaßlichen Pathogenese der IPF ähnlicher ist (siehe Review von Moore und Hogaboam [85]).

Während zudem die intraperitoneale oder intravenöse Injektion jeweils mehrere Gaben erfordern und früheste fibrotische Veränderungen erst nach etwa vier Wochen sichtbar werden, genügt bei intratrachealer Bleomycin-Applikation eine einfache Gabe, die bereits nach 14 Tagen sichtbare, fibrotische Veränderungen hervorruft [53]. Nach ca. 21 Tagen ist in der Regel eine manifeste Lungenfibrose zu beobachten.

Eine Besonderheit der einmaligen intratrachealen Bleomycin-Applikation besteht jedoch darin, dass sich die fibrotischen Veränderungen nach etwa 28 Tagen zurückbilden, sofern die Mäuse nicht vorher versterben [38][70]. Dieser Umstand ist insofern hinderlich, da bei therapeutischen Studien schwierig zu differenzieren ist, ob eine Besserung des Krankheitsbildes auf das getestete Medikament oder die selbstlimitierende Natur der Bleomycin-induzierten Fibrose zurückzuführen ist.

Obgleich der relativ akute Verlauf der Fibrose-Entwicklung des Bleomycin-Modells im

Gegensatz zum natürlichen, schleichenden Verlauf der IPF beim Menschen steht, scheinen sich die zugrundeliegenden Pathomechanismen dennoch mehr zu ähneln als zunächst angenommen [96][77]. Das Bleomycin-Modell ist damit derzeit weiterhin das Fibrose-Modell mit der höchsten klinischen Relevanz.

Da sich zeigte, dass C57Bl/6 Mäuse sensibel auf Bleomycin reagieren, während Balb/c Mäuse dagegen praktisch resistent sind und keine Fibrose entwickeln [79], werden regelmäßig erstere zur Untersuchung herangezogen. Je nach Quelle erhalten die Tiere bei intratrachealer Applikation in den meisten Arbeiten 1,25 bis 5 U/Kg/KG Bleomycin [85]. Da die Wirksamkeit des Bleomycins zwischen verschiedenen Herstellern variieren kann, ist es üblich, in entsprechenden Vorversuchen das optimale Dosis-Wirkungs-Verhältnis zu bestimmen, bei dem die Mäuse eine möglichst maximale Fibrose bei geringer Mortalitätsrate entwickeln [70].

Zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes haben sich bis heute vor allem folgende Verfahren etabliert:

- Histologie mit verschiedenen morphologischen Untersuchungen
- Bronchoalveoläre Lavage mit Zellzählung
- Assays zur Bestimmung des Kollagen- oder Hydroxyprolinegehaltes der Lunge
- Lungenfunktionsmessungen

Hinzu kommen spezielle Untersuchungen wie PCR, Western Blot oder Cytokin-Bestimmungen, die sich nach den Erfordernissen der Fragestellung des jeweiligen Experimentes richten.

Die Anwendung von Lungenfunktionsmessungen im Bleomycin-Modell ist noch relativ neu. Warum sie einen Erkenntniszugewinn bedeutet und sich potentiell eignet um das Krankheitsmonitoring im Bleomycin-Modell erheblich zu verbessern, soll in den folgenden beiden Abschnitten erläutert werden und ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

1.4 Lungenfunktionsmessung als Krankheitsmonitoring der IPF

Die Lungenfunktionsmessung beim Menschen dient im Allgemeinen dazu, die respiratorische Kompetenz eines Patienten zu quantifizieren und objektiv messbar zu machen. Von Interesse ist dabei, wie gut der Gasaustausch und die mechanische Atemarbeit funktionieren und in welchem Maße die Lunge perfundiert ist.

Durch Messung und Berechnung verschiedener Atemflussgeschwindigkeiten, Lungen- und Atemzugvolumina und thorakaler Druckverhältnisse mittels Spirometrie und Bodyplethysmographie, lassen sich Rückschlüsse auf diese Grundlagen der Lungenfunktion ziehen.

Im klinischen Alltag sind Lungenfunktionsmessungen ein unverzichtbarer Bestandteil der pulmonalen Diagnostik. Bereits Mitte des 19ten Jahrhunderts studierte der britische Chirurg John Hutchinson, der als Erfinder der Spirometrie gilt, den Zusammenhang zwischen Lungenerkrankungen und einer herabgesetzten Vitalkapazität an über 2000 Patienten [49]. Seine Entdeckungen bildeten einen der Grundsteine der modernen Lungenfunktionsdiagnostik.

Heute werden Lungenfunktionsmessungen insbesondere auch zur Verlaufsbeobachtung und Therapieeinstellung diverser Lungenerkrankungen wie Asthma, COPD und nicht zuletzt der Lungenfibrose herangezogen.

Zu den gängigsten bei der Lungenfunktionsmessung erhobenen Parametern gehören die Totale Lungenskapazität (TLC), die forcierte Vitalkapazität (FVC), die forcierte Einsekundenkapazität (FEV_1), die Diffusionskapazität (D_LCO) sowie die Compliance (C) und Resistance (R) der Atemwege. Zusätzliche Informationen liefern Blutgasanalysen, Pulsoxymetrie und die Bronchospasmyse- bzw. Provokationstestungen [16].

Es gilt mögliche Störungen der Lungenfunktion zu detektieren. So können obstruktive von restriktiven Ventilationsstörungen und Diffusions- von Perfusionsstörungen differenziert werden.

Die Lungenfibrose und damit auch die IPF, ist durch eine restriktive Ventilationsstörung gekennzeichnet. Das heißt, das Lungengewebe ist nicht mehr in der Lage, sich adäquat auszudehnen. Die restriktive Ventilationsstörung geht mit einer Minderung der Lungencompliance und gleichzeitig einer Abnahme der Lungenvolumina TLC, FVC und FEV_1 einher. Das Verhältnis von FEV_1 zu VC, genannt Tiffeneau-Index, bleibt häufig normal

oder erhöht sich sogar zugunsten der FEV_1 . Herabgesetzt ist bei der Lungenfibrose außerdem die Diffusionskapazität (D_LCO), da der Gasaustausch über die verdickten oder bindegewebig durchsetzten Alveolen nicht mehr möglich ist. Die IPF gehört damit zu den Erkrankungen, die sich durch eine Diffusionsstörung auszeichnen.

Vitalkapazität, Einsekundenkapazität, Diffusionskapazität und körperliche Belastbarkeit (z.B. im sechs-Minuten-Gehtest), sind allesamt essentielle Parameter, die sowohl für die Diagnose einer IPF als auch insbesondere zu deren Verlaufsbeobachtung herangezogen werden. Die Erhebung dieser Parameter ist deshalb im klinischen Alltag von so großer Bedeutung, weil erst dadurch, in Zusammenschau mit den Befunden aus Patientenanamnese, Bildgebung (HRCT), klinischen und Laboruntersuchungen, eine Quantifizierung des Krankheitsverlaufes und eine Abschätzung der Überlebensprognose möglich wird. In den Deutschen Leitlinien für Diagnose und Management der IPF heißt es dazu: *„Eine longitudinale Veränderung physiologischer Parameter ist eindeutig ein wichtiger, wenn nicht in der klinischen Routine der wichtigste Prädiktor der Mortalität bei IPF. Eine Abnahme der FVC im Verlauf von 6 oder 12 Monaten ist konsistent mit einem verringerten Überleben assoziiert“*[14].

Die Lungenfunktionsmessung im Bleomycin-Modell hat bisher keinen annähernd gleichen Stellenwert, obgleich sie in der Diagnostik der IPF beim Menschen eine so zentrale Rolle spielt.

1.4.1 Lungenfunktionsmessung bei Mäusen

Lebt die Lungenfunktionsmessung beim Menschen zu einem beträchtlichen Teil von der Mitarbeit des Patienten, so ist diese von einer Versuchsaus nicht notwendigerweise zu erwarten. Nun gibt es verschiedene Möglichkeiten dennoch verwertbare Untersuchungsergebnisse der unkooperativen Maus zu erhalten.

Bates et al. beschrieben 2003 den Zusammenhang zwischen Messgenauigkeit und Invasivität bei der Lungenfunktionsmessung von Mäusen [10]. Demzufolge erfordert ein zunehmendes Maß an Messgenauigkeit immer gleichzeitig ein zunehmendes Maß an Invasivität bei der Messung. Am unteren Ende der Invasivität siedelten sie die Bodyplethymographie der unbeeinträchtigten Versuchsaus an, die den Wert 'enhanced Pause=Penh' liefert. Während sich die Maus frei in einem abgedichteten Raum bewegt, werden die Druckänderungen innerhalb dieses Raumes gemessen. Die Untersuchung kann prinzipiell beliebig oft durchgeführt werden und eignet sich daher für wiederholte Messungen. Bates

et al. schlossen jedoch, dass diese Messmethode kein sinnvolles Abbild der mechanischen Lungenfunktion liefern könne.

Als anderes Extrem stellten sie die Lungenfunktionsmessung der narkotisierten und paralysierten Maus mittels Tracheotomie dar. Diese Methode erlaubt die präzisesten und spezifischsten Messungen, da sämtliche Beatmungsparameter kontrolliert werden und die oberen Atemwege (Nasen- und Rachenbereich) die Messwerte nicht verfälschen können. Der entscheidende Nachteil der Tracheotomie besteht jedoch darin, dass sie nicht mit dem Überleben der Versuchsmaus nach der Messung vereinbar und daher für repetitive Untersuchungen unbrauchbar ist.

Eine Methode, die die Autoren bei ihrer Betrachtung außer Acht ließen, war die Lungenfunktionsmessung der narkotisierten und *intubierten* Maus, was schlicht darauf zurückzuführen ist, dass die Intubation von Mäusen, zum Zweck der Lungenfunktionsmessung zum Zeitpunkt der Veröffentlichung kaum bekannt war. Erste Ansätze in diese Richtung untersuchten Brown et al. 1999 [18] und Glaab et al. 2004 [40].

Die Methode soll im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

1.4.2 Repetitive Lufu im Bleomycin-Modell

Obleich *wiederholte* Lungenfunktionsmessungen ein unerlässlicher Bestandteil der Verlaufsbeobachtung einer IPF beim Menschen sind, haben sie sich bisher im Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose nicht etabliert.

Seit einigen Jahren ist es immerhin zunehmend verbreitet, bei den Mäusen per Tracheotomie einmalige Lungenfunktionsmessungen durchzuführen. Auf diese Weise können funktionelle 'Ist'-Zustände der Mauslunge mit Ergebnissen aus der Histologie und anderen Untersuchungen verglichen werden. Echte Verlaufsbeobachtungen der Krankheitsentwicklung sind so jedoch unmöglich, da die Tracheotomie mit dem Überleben der Mäuse unvereinbar ist (s.o.).

Unabhängig von der Fibrose-Forschung, stellten De Vleeschauwer et al. in ihrer Arbeit von 2011 die repetitive Messung der Lungenfunktion an intubierten Mäusen als Werkzeug zur Langzeitbeobachtung vor [2]. Sie verglichen Messungen nach der 'Forced Oscillation Technique' (FOT, siehe Kapitel 3.2.3) an tracheotomierten mit denen an intubierten Balb/c Mäusen und kamen zu dem Schluss, dass beide Methoden vergleichbare Ergebnisse lieferten. Damit ist es gelungen, ein Maximum der Messgenauigkeit mit einem Maß an Invasivität zu verbinden, das noch mit dem unbeeinträchtigten Fortleben

der Versuchsm Maus zu vereinbaren ist.

Nachdem damit alle Grundlagen für ein aktives Krankheitsmonitoring geschaffen sind, ist der nächste logische Schritt für die IPF-Forschung, repetitive Lungenfunktionsmessungen im Bleomycin-Modell anzuwenden, um die funktionelle Krankheitsentwicklung der Lungenfibrose zu untersuchen.

Ein wirksames Instrument zur Lungenfunktionsmessung bei Kleintieren, schaffte die Firma Scireq mit dem flexiVent™. Das Gerät ermöglicht die Lungenfunktionsmessung *in vivo* an Kleintieren von Maus bis Hund. Dabei ist es möglich, z.B. an der narkotisierten Maus, praktisch alle Lungenfunktionsparameter zu messen, die man für die Diagnose und Verlaufsbeobachtung einer Lungenfibrose benötigt (Details in Kapitel 3.2.3). Dadurch eröffnen sich potentiell neue Möglichkeiten z.B. in Bezug auf Wirksamkeitsstudien neuer Medikamente.

1.5 PRMTs Definition und Überblick

Es ist seit Langem bekannt, dass die posttranslationale Modifikation von Histonen und Proteinen von zentraler Bedeutung für eine Vielzahl zellulärer Vorgänge ist. Die meisten Proteine erhalten ihre endgültige Funktion erst durch eine posttranslationale Modifikation. Gut bekannt und vielfach untersucht sind z.B. die posttranslationale Acetylierung, Glycosylierung und Phosphorylierung.

1967 beschrieben Paik und Kim erstmals außerdem eine Protein Arginin Methylierung in Thymus-Zellen von Kälbern.[92]. 1968 veröffentlichten sie eine Beschreibung des methylierenden Enzymes, das sie aus den Thymus-Zellen isoliert hatten und nannten es Protein Methylase 1 [93].

Seitdem hat sich das Verständnis für diese Art der posttranslationalen Modifikation erheblich erweitert. Neben der Protein Methylase 1 wurden noch weitere Enzyme derselben Familie entdeckt. Inzwischen ist bekannt, dass diese, in Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) umbenannte Enzymklasse, die Übertragung von Methyl-Gruppen auf die Guanidin-Gruppe von Arginin-Resten an Proteinen katalysiert. Dabei wird die Methyl-Gruppe des Donator-Moleküls S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) durch die PRMTs entfernt. Bei der Reaktion entsteht A-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) während die

Methyl-Gruppe auf das terminale Stickstoff-Atom der Guanidin-Gruppe (Akzeptor-Molekül) transferiert wird [13][37][82][128]. Bei Säugetieren können, nach aktuellem Wissensstand, ein bis maximal zwei Methyl-Gruppen übertragen werden. Durch die Methylierung resultieren drei verschiedene Arginin-Residuen. Am häufigsten kommt das ω -N^GN^G-asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) vor, darüber hinaus kann ω -N^GN^G-symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) oder ω -N^G-Monomethylarginin (MMA) entstehen. Die Methylierung des dritten, internen Stickstoff-Atoms der Guanidin“-Gruppe, das δ -Guanidin-Stickstoff-Atom, konnte bisher nur bei Hefeproteinen nachgewiesen werden [139].

In den vergangenen Jahren zeigte sich mehr und mehr, dass eine Regulierung zahlreicher zellulärer Vorgänge wie der Transkription, Translation, Proliferation, Signal-Transduktion und DNA-Reparatur u.a. durch PRMTs stattfindet (siehe auch Review von Bedford und Richard [13]). Im Rahmen dessen konnte z.B. eine Beteiligung der PRMTs an kardiovaskulären, neurologischen (z.B. Multiple Sklerose) und viralen Erkrankungen (HIV, Hepatitis) sowie verschiedenen Krebsarten festgestellt werden [8][30]. Auch auf dem Gebiet der Lungenerkrankungen zeichnen sich zunehmend wichtige Funktionen der PRMTs ab [136].

1.5.1 Klassifikation

Bis zum heutigen Tag wurden neun PRMTs beim Menschen charakterisiert. Zwischenzeitlich rechnete man außerdem die Proteine FBXO10 und 11 den PRMTs zu bzw. herrschte eine Zeit lang Unklarheit darüber, ob FBXO11 auf Chromosom 2p16 als PRMT9 klassifiziert werden sollte. Inzwischen besteht weitestgehende Einigkeit, dass PRMT9 tatsächlich auf Chromosom 4q31.23 lokalisiert ist und die FBXO-Proteine nicht zu den PRMTs gehören [78][132].

Die PRMTs 1-9 werden in drei Klassen eingeteilt, wobei PRMTs aller drei Klassen dazu in der Lage sind, MMA zu generieren. MMA kann insofern als Zwischenprodukt betrachtet werden.

Der Klasse I werden PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6 und PRMT8 zugerechnet. Sie können aus dem Zwischenprodukt MMA, ADMA erzeugen. Klasse II wird von PRMT5 repräsentiert, das in der Lage ist MMA zu SDMA umzuwandeln. Nach aktuellsten Erkenntnissen gehört auch PRMT9 der Klasse II an [132]. PRMT7 wird neuerdings der PRMT-Klasse III zugeordnet, da es als einziges PRMT ausschließlich MMA

generiert [32][140].

Im Folgenden sollen einige Eigenschaften der einzelnen PRMTs kurz beleuchtet werden. CARM1 wird in einem separaten Abschnitt dargestellt.

PRMT1 war das zuerst von Paik und Kim entdeckte PRMT, das sie zunächst Protein Methylase 1 getauft hatten. Der Großteil aller Methylierungen im Säugetier-Organismus, etwa 80-85%, wird durch PRMT1 bewältigt [119]. Es ist in praktisch allen Arten von Körperzellen vorhanden und in eine Vielzahl von Prozessen involviert. So wurden u.a. Funktionen bei der Signal-Transduktion, der DNA-Reparatur und der Regulierung des Zellzyklus nachgewiesen. Gemeinsam mit PRMT4/CARM1 fungiert es außerdem als Regulator der Gen-Transkription [68]. Im Zusammenhang mit diesen Funktionen spielt PRMT1 auch bei mehreren Krebsarten eine wichtige Rolle. Jüngst konnte z.B. eine regulatorische Funktion bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden [5]. Die Tatsache, dass Mäuse mit einem homozygoten Knockout des PRMT1-Gens das Embryonalstadium nicht überschreiten, unterstreicht die Wichtigkeit der Enzymfunktion von PRMT1 [95].

PRMT2 kommt in den meisten menschlichen Geweben vor. Über die Funktion ist u.a. bekannt, dass es mit einigen Hormon-Rezeptoren als Coaktivator interagiert zu denen der Östrogen-Rezeptor- α und der Androgen-Rezeptor gehören [99]. Nach jüngeren Erkenntnissen wirkt PRMT2 über Interaktion mit Cyclin D1 auf den Zellzyklus und hat außerdem einen negativen Effekt auf die Proliferation von Brustkrebs-Zellen [138].

PRMT3 weist als Besonderheit eine Zinkfinger-Domäne (ZnF) auf, die dem Enzym die Bindung an ribosomale und RNA-assoziierte Proteine ermöglicht [6][35][118]. Bisher ist nicht viel über die Funktion des Enzymes bekannt, die Entdeckung des wirksamen Inhibitors der Methyltransferaseaktivität von PRMT3, SGC707, soll jedoch weitere Aufschlüsse geben [57].

PRMT5 war das erste PRMT, das der Klasse II zugeordnet werden konnte. Es nimmt eine wichtige Rolle innerhalb der Kontrolle der Gen-Transkription ein, da es, wie PRMT1 und PRMT4/CARM1 in der Lage ist Histone zu methylieren[17]. Die Enzymfunktion von PRMT5 ist mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert, u.a. mit Darmkrebs, Lymphomen und Lungenkrebs [127][137]. Da PRMT5 einige Tumorsuppressorgene regulieren kann, wird es mitunter als Onkogen/Onkoprotein bezeichnet [94][131].

PRMT6 kommt vornehmlich im Zellkern vor und ist wie PRMT1, PRMT4/CARM1

und PRMT5 dazu in der Lage Histone zu methylieren [50]. Es besitzt zudem autome-thylierende Eigenschaften [36] und konnte mit einer negativen Regulierung der HIV-Proteine *Rev* (regulator of viral protein expression) und *Tat* (transactivator protein) in Verbindung gebracht werden [51][75].

PRMT7 wird als bisher einziges der Klasse III der Arginin Methyltransferasen zugeord-net, da es lediglich MMA generieren kann [140]. Auch PRMT7 methyliert Histone und kann die Reaktion auf DNA-Schäden regulieren. Es besitzt dadurch schützende Funk-tionen für die DNA [58]. Nach neueren Erkenntnissen induziert PRMT7 außerdem die Expression von Metalloprotease 9 (MMP9) in Brustkrebszellen. Eine höhere Expression von PRMT7 ist dabei mit einer erhöhten Invasivität und Aggressivität der Tumorzellen assoziiert [7].

PRMT8 ist in seiner Struktur PRMT1 sehr ähnlich. Im Gegensatz zu PRMT1 und allen anderen PRMTs, ist es aufgrund seiner Molekularstruktur an die Plasmamembran ge-bunden und kommt vornehmlich im Gehirn vor [72]. In Kooperation mit PRMT1 scheint es auf die neuronale Differenzierung zu wirken [114].

PRMT9 ist das bislang letzte, identifizierte Mitglied der PRMT-Familie. Es wurde erst-mals 2005 von Lee et al. auf Chromosom 4q31 identifiziert und als möglicher Kandidat für die Bezeichnung PRMT9 vorgeschlagen [72]. Zwischenzeitlich zog man auch das F-Box Protein FBXO11 als PRMT9 in Betracht [26]. Aktuell besteht jedoch weitgehend Konsens darüber, dass PRMT9 tatsächlich auf Chromosom 4q31 liegt. Jüngst konnte es, neben PRMT5, als zweites Mitglied der Typ-II PRMTs identifiziert werden, das neben MMA auch SDMA generiert [132].

1.5.2 Coactivator-associated Arginin Methyltransferase 1 (CARM1)

PRMT4 wurde erstmals 1999 unter der Bezeichnung Coactivator-associated Arginin Me-thyltransferase 1 (CARM1) von Chen et al. beschrieben [20]. Sie fanden heraus, dass CARM1 im Zellkern an Proteine der p160-Familie bindet und dadurch eine Steigerung der transkriptionellen Aktivierung nukleärer Hormonrezeptoren (NR) bewirkt. Zu der p160-Familie, deren Proteine sich durch eine atomare Masse von 160 kD auszeichnen, gehören die Steroid-Rezeptor Coaktivatoren (SRC) 1, 2 und 3. SRC2 ist auch unter den Bezeichnungen GRIP1, TIF2 oder NCOA2 und SRC3 unter p/CIP, RAC3, AIB1, AC-TR, TRAM1 und NCAO3 bekannt. Chen et al. konnten außerdem eine Methylierung

von Histon H3 durch CARM1 nachweisen.

1.5.2.1 Lokalisation, Struktur und Substrate

Das CARM1-Gen ist auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert. CARM1 kommt bei Mensch und Maus sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor und besteht aus 608 Aminosäuren [20]. Strukturell setzt sich CARM1 aus einem katalytischen Kern mit Methyltransferase-Aktivität zusammen, der in seinem Aufbau im Wesentlichen dem aller übrigen PRMTs entspricht, sowie zwei begleitenden Domänen am C- und N-terminalen Ende der PRMT-aktiven Seite des Moleküls [122].

CARM1 unterscheidet sich wesentlich von den übrigen PRMTs, indem es keine Glycin-Arginin reichen Regionen an Proteinen, GAR-Motive genannt, methyliert [71]. Stattdessen scheint es Prolin-, Glycin-, Methionin und Arginin-reiche Regionen (PGM Motive) zu bevorzugen [21]. Die Suche nach Substraten von CARM1 gestaltete sich insofern zunächst etwas erschwert.

Inzwischen ist es dennoch gelungen eine Vielzahl an CARM1-Substraten zu identifizieren und zahlreiche zelluläre Prozesse mit dem Enzym in Verbindung zu bringen. Es hat u.a. co-aktivierende Effekte auf verschiedene Transkriptionsfaktoren. So wirkt es z.B. auf NF- κ B und dessen Eigenschaften als Transkriptionsfaktor und Regulator immunologischer Prozesse sowie Entzündungsreaktionen [27]. CARM1 kooperiert außerdem mit PRMT1 und p300 in der Regulierung des wichtigen Tumorsuppressorgens p53 [4]. Auch in Verbindung mit β -catenin, dem Coaktivator des Wnt-Signalweges, konnten synergistische Funktionen nachgewiesen werden [69], was insofern interessant ist, als dass der Wnt/ β -catenin Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IPF zu spielen scheint [23][41][86][110].

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend auch Zusammenhänge zwischen verschiedenen Krebserkrankungen und CARM1 hergestellt. Bei Darmkrebszellen konnte eine positive Regulierung des Wnt/ β -catenin Signalweges durch CARM1 festgestellt werden [91] und die Überexpression von CARM1 in Brustkrebszellen ist mit einer erhöhten Aggressivität, Proliferationsrate und Invasivität sowie einer generell schlechten Prognose assoziiert [22][42]. Jüngst wurde diesbezüglich die Hypothese aufgestellt, die Rolle von CARM1 bei Brustkrebs sei unter Umständen abhängig von der Splicevariante des Enzyms [113][125].

Schließlich scheint CARM1 wichtige Funktionen bei der Erhaltung einiger physiologischer Prozesse zu haben. So werden dem Enzym regulatorische Funktionen bei der enchondralen Ossifikation und Chondrozytenproliferation [52], sowie der Myogenese [11] und dem Glykogen-Stoffwechsel in Muskeln [126] nachgesagt. Auch ist CARM1 offenbar essentiell für die Pluripotenz embryonaler Stammzellen von Mäusen [129]. Mäuse mit einem homozygoten Knockout des CARM1-Gens sind nicht überlebensfähig. Sie sterben während oder kurz nach der Geburt [130].

1.5.2.2 CARM1 und IPF

Bislang existieren keine Erkenntnisse darüber, ob CARM1 und die idiopathische Lungenfibrose miteinander in Zusammenhang stehen, das Enzym ist jedoch aus mehreren Gründen interessant für die IPF-Forschung. Wie zuvor dargestellt, besitzt CARM1 zahlreiche regulatorische Funktionen und greift u.a. in den Wnt/ β -catenin Signalweg sowie in die NF- κ B abhängige Genexpression ein. Sowohl der Wnt/ β -catenin Signalweg als auch NF- κ B konnten mit der pulmonalen Fibrosebildung assoziiert werden [23][74].

Zusätzlich ist bekannt, dass die PRMTs sowohl in bronchialen als auch alveolären Epithelzellen exprimiert werden [133]. Letztere stellen aller Wahrscheinlichkeit nach den zentralen Ausgangspunkt der IPF dar [15] [108]. O'Brien et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2010 schließlich eine Hyperproliferation alveolärer Epithelzellen vom Typ II und eine fehlerhafte Differenzierung in Abwesenheit von CARM1 [89] und Sarker et al. brachten CARM1 2015 in Verbindung mit zellulären Alterungsprozessen, die auch für die Entwicklung einer IPF von Wichtigkeit sind, da die IPF als Erkrankung des 'alternden Menschen' gilt [107]. CARM1 scheint alles in Allem von ausgesprochener Wichtigkeit für die korrekten Differenzierung und Proliferation alveolärer Epithelzellen zu sein, die wiederum von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der IPF sind.

Aus diesem Grund stellt CARM1 einen interessanten Ansatzpunkt zur Entdeckung neuer Aspekte der IPF-Pathogenese und potentieller Therapieoptionen dar.

Kapitel 2

Ziel der Arbeit

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine schwere und trotz zahlreicher, wissenschaftlicher Untersuchungen, noch immer ungenügend verstandene Erkrankung, ohne zufriedenstellende Therapiemöglichkeiten. Die Pathomechanismen, die der Entwicklung einer IPF zugrunde liegen, sind im Wesentlichen weiterhin unbekannt, wobei sich in den letzten Jahren die Hypothese etabliert hat, eine überschießende Fibroproliferation alveolärer Epithelzellen, sei für die fortschreitende Krankheitsentwicklung verantwortlich. Zur Erforschung der IPF, wurden mehrere Fibrose-Modelle im Tierversuch entwickelt, von denen eines der gängigsten das Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose bei Mäusen ist. Eine Schwierigkeit dieses Modelles besteht jedoch darin, dass die Fibrose-Entwicklung nicht bei allen Versuchstieren gleich ist und die Möglichkeiten des Krankheitsmonitorings begrenzt sind. Um zu wissenschaftlich validen Forschungsergebnissen zu gelangen, sind daher prinzipiell große Untersuchungsgruppen notwendig, was sich, schon aus ethischen Gründen, selten realisieren lässt.

Da bisher zur Beobachtung des Krankheitsverlaufes hauptsächlich histologische Untersuchungen herangezogen werden, ist immer nur die Betrachtung eines Gruppenschnitts möglich, nicht jedoch der einzelnen Maus über längere Zeit hinweg. Soll z.B. ein neuer Wirkstoff auf seine therapeutische Wirkung getestet werden, wäre nur schwer zu differenzieren, ob Veränderungen im histologischen Bild tatsächlich auf den Wirkstoff zurückgehen oder vielmehr den interindividuellen Unterschieden der Krankheitsausprägung bei den einzelnen Mäusen geschuldet sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Zum Einen galt es die repetitive Lungenfunktionmessung als Instrument zum Krankheitsmonitoring im Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose zu untersuchen. Im Vordergrund stand dabei die Hypothese, dass durch die vergleichsweise schonende Methode der Lungenfunktionsmessung mittels Intubation, repetitive Untersuchungen durchgeführt werden können, die eine genaue Beurteilung des Krankheitsverlaufes erlauben. Überdies ermöglicht die Lungenfunktionsmessung einen Eindruck der funktionellen Veränderungen im Laufe einer Lungenfibrose.

Zum Anderen lag ein Augenmerk auf der Untersuchung der Pathomechanismen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und hier speziell auf der Rolle die Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) möglicherweise im Zusammenhang damit spielen. Im Fokus stand bei den Untersuchungen PRMT4/CARM1, da dieses Enzym mutmaßlich vermehrt in alveolären Epithelzellen vorkommt, die wiederum eine zentrale Rolle in der Pathogenese der IPF spielen, und u.a. die Abwesenheit von CARM1, in anderen Arbeiten, mit einer Hyperplasie dieser Epithelzellen assoziiert werden konnte [89]. Eine Beteiligung von PRMT4/CARM1 könnte wichtige Anhaltspunkte für künftige Forschungs- und Therapieansätze liefern.

Kapitel 3

Methoden und Material

Um die Entwicklung und den Verlauf der Lungenfibrose näher untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit das murine Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose angewendet und den Erfordernissen der unter Kapitel 2 formulierten Arbeitsziele angepasst. Ein besonderes Augenmerk während der ersten Versuchsreihe lag auf der Etablierung eines Krankheitsmonitorings durch repetitive Lungenfunktionsmessungen.

Innerhalb dessen galt es außerdem einen ersten Eindruck über Veränderungen in der Expression einzelner Gene zu gewinnen, wobei der Fokus auf den Genen der Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) lag. In einer zweiten Versuchsreihe wurden nähere Untersuchungen zur Rolle der PRMTs bzw. insbesondere PRMT4/CARM1 im murinen Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose angestellt.

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, gibt es verschiedene Varianten des murinen Modells der Bleomycin-induzierten Fibrose. Vor allem die Applikationsarten und Dosen des Bleomycins unterscheiden sich. Die Variante dieses Versuches wurde Instituts-intern in mehreren Vorversuchen erprobt und im Zuge dessen von möglichen Fehlerquellen befreit. Es wurde Bleomycin der Firma Sigma-Aldrich[®] mit der Referenznummer B5507 verwendet. Die Applikationsart des Bleomycins war intratracheal. Näheres dazu unter 3.2.4

3.1 Experimentdesign

Vor Beginn der Tierversuche wurde ein Ethikantrag über den geplanten Versuchsverlauf sowie die dafür benötigte Anzahl an Versuchstieren gestellt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Das murine Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose wurde hier wie folgt angewendet: Zu Beginn des Versuchs erhielten die Versuchstiere eine definierte Dosis von 5U/Kg/KG des Fibrose auslösenden Reagenz Bleomycin b.z.w. die äquivalente Volumenmenge an Kochsalzlösung (PBS= Phosphat Buffered Saline) zur Kontrolle, intratracheal appliziert.

Der Zeitpunkt der ersten Lungenfunktionsmessung und Instillation war als Tag 0 definiert. Als sinnvolle Untersuchungszeitpunkte ab Tag 0 wurden die Tage 7, 14, 21, 28 und 56 festgelegt.

Da ein Hauptaugenmerk dieses Versuchs auf dem Krankheitsmonitoring der Mäuse lag und damit auf der Lungenfunktionsmessung (Lufu), wurden die Versuchstiere in zwei grundsätzliche Gruppen aufgeteilt.

Repetitive-Lufu-Gruppe:

Die Mäuse der repetitive-Lufu-Gruppe wurden an Tag 0, noch vor der Bleomycin/PBS-Instillation und zu den genannten Zeitpunkten (Tag 7, 14, 21, 28, 56), einer Lungenfunktionsmessung unterzogen, gewogen und anschließend in ihre Käfige zurückgesetzt. Erst am letzten Versuchstag (Tag 56) erfolgte die Präparation und Probengewinnung wie in 3.2 beschrieben. Die repetitive-Lufu-Gruppe, bestand aus n=26 Tieren, wovon n=8 PBS erhielten und n=18 Bleomycin

Single-Lufu-Gruppe:

Die zweite, größere Gruppe Mäuse wurde weiter unterteilt auf fünf Untergruppen, entsprechend den fünf Untersuchungszeitpunkten, und diese unterschieden sich wiederum in PBS- und Bleomycin- Tiere. Den Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils n=6 Bleomycin-Mäuse an den Tagen 7 und 14 sowie n=8 an den Tagen 21, 28 und 56 zugeordnet. Bei einer insgesamt begrenzten Anzahl zur Verfügung stehender Versuchstiere, wurden der Bleomycin-Gruppe zu den späteren Versuchszeitpunkten jeweils zwei Mäuse mehr zugeteilt, um ggf. Ausfälle aufgrund der Bleomycin-induzierten Krankheitsentwicklung zu kompensieren. In der Kontrollgruppe waren jeweils n=6 PBS-Mäuse. Erst an den

ihrer Gruppe entsprechenden Versuchstagen, wurden diese Mäuse einer Lungenfunktionsmessung unterzogen, gewogen und zum Zweck der Probengewinnung präpariert. Die Einteilung der Gruppen ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

Die Unterteilung in die beiden genannten Hauptgruppen (repetitive- und single-Lufu), diente der Beobachtung des Krankheitsverlaufs der Fibrose bei den Mäusen aus zwei verschiedenen Perspektiven: Während in der single-Lufu-Gruppe immer nur eine Betrachtung des Krankheitsgeschehens in Momentaufnahme möglich war, da die Tiere bei der Präparation der Lunge notwendigerweise starben, erlaubte die gering invasive, repetitive Lungenfunktionsmessung in der repetitive-LuFu-Gruppe, eine Verlaufsbeobachtung der Krankheit bei jedem einzelnen Tier über die Gesamte Dauer des Versuches hinweg.

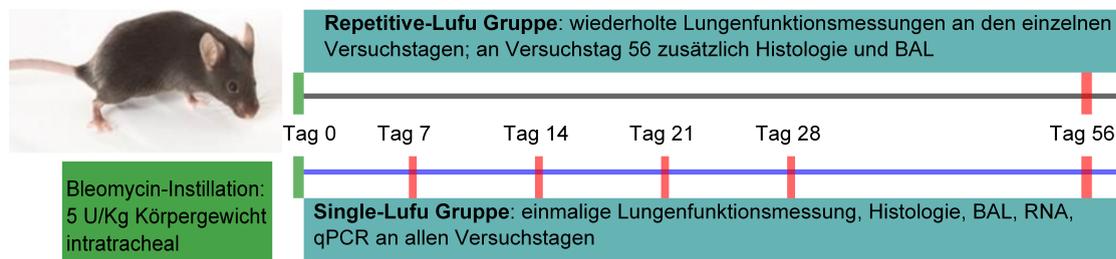


ABBILDUNG 3.1: Experimentdesign

3.1.1 CARM1 Versuchsreihe

Neben der zuvor beschriebenen ersten Versuchsreihe, wurde noch eine weitere durchgeführt, bei der die Untersuchung von CARM1 im Vordergrund stand.

Es bestand die Möglichkeit die Fibrose-Entwicklung parallel bei Wildtyp-Mäusen sowie bei Mäusen mit einem heterozygoten Knockout des CARM1-Gens zu beobachten (CARM1^{+/-}). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Mäuse mit einem Fehlen des CARM1-Gens auf beiden Allelen, einem homozygoten Knockout (CARM1^{-/-}), nicht überlebensfähig sind. Die Tiere versterben kurz nach der Geburt [130].

Da die Expression des CARM1-Gens jedoch bereits bei einem heterozygoten Knockout (CARM1^{+/-}) signifikant herabgesetzt ist (siehe 4.3.1), lassen sich, durch die Beobachtung dieser Tiere im Bleomycin-Modell, gegebenenfalls wichtige Schlüsse auf die Funktion des CARM1-Gens in der Fibrose-Entwicklung ziehen.

Mit Rücksicht auf die Kenntnis der Krankheitsentwicklung im Bleomycin-Modell, wurden in diesem Versuchsabschnitt lediglich die Tage 21 und 28 nach PBS- bzw. Bleomycin-Applikation betrachtet. Es fand eine Unterteilung der Versuchstiere in insgesamt acht Gruppen statt. An beiden Versuchstagen sollten jeweils Wildtyp und CARM1^{+/-} Mäuse nach PBS und Bleomycin-Applikation untersucht werden.

Im Rahmen von institutsinternen Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Sterblichkeit der Carm1^{+/-}-Mäuse bei Verwendung von 5U Bleomycin pro Kg/KG zu hoch war. Aufgrund dessen musste die Dosis des Bleomycins in dieser Versuchsreihe auf 3U/Kg/KG gesenkt werden. Unter diesen Bedingungen entwickelten sowohl Wildtyp- als auch Carm1^{+/-}-Mäuse (immer noch) eine Fibrose, jedoch ging die Sterblichkeit auf ein akzeptables Maß zurück.

Zu Beginn des Versuches (definiert als Tag 0) erhielten insgesamt n=24 Carm1^{+/-} und n=38 Wildtyp-Mäuse PBS (n=26, davon n=16 Wildtyp- und n=10 Carm1^{+/-}-Tiere) bzw. Bleomycin (n=36, davon n=22 Wildtyp- und n=14 Carm1^{+/-}-Tiere) intratracheal appliziert. An den Versuchstagen 21 und 28 wurden Lungenfunktionsmessungen durchgeführt und die Tiere, wie unter 3.2.5 beschrieben präpariert. Repetitive Lungenfunktionsmessungen fanden nicht statt.

Die Probengewinnung und Aufbereitung war identisch mit dem Vorgehen der ersten Versuchsreihe.

3.2 Versuchsarbeit

In diesem Abschnitt sollen die einzelnen Komponenten der Experimente sowie die eigentliche Versuchsarbeit geschildert werden.

3.2.1 Mäuse

Im Hauptversuch dieser Arbeit wurden ausschließlich weibliche C57Bl/6 Wildtyp-Mäuse aus dem Charles River Labor im Alter von 8-10 Wochen verwendet.

Für die CARM1-Versuchsreihe wurden ebenfalls weiblich C57Bl/6 Wildtyp-Mäuse aus

dem Charles River Labor eingesetzt. Das Alter variierte zwischen 8-16 Wochen. Hinzu kamen C57Bl/6 Mäuse mit einem heterozygoten Knockout des CARM1-Gens (=CARM1^{+/-}) aus institutseigener Zucht im Alter von 15-17 Wochen. Die Betreuung und Versorgung der Tiere wurde durch ausgebildete Tierpfleger gewährleistet. Die Haltung aller Versuchstiere erfolgte in Kleinkäfigen mit ordnungsgemäßer Frischluftzufuhr. Maximal vier bis fünf Mäuse waren zusammen in einem Käfig untergebracht. Wasser und Trockenfutter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2.2 Intubation

Um bei Mäusen eine Lungenfunktionsmessung durchführen zu können, wird in den meisten Laboratorien und veröffentlichten Arbeiten eine Tracheotomie durchgeführt. Dabei erfolgt eine chirurgische Freilegung und Kanülierung der Luftröhre (Trachea), wodurch eine verhältnismäßig große Wundfläche entsteht. Da dieses Vorgehen sehr invasiv ist und keinesfalls mehrfach durchgeführt werden kann, kam für die angestrebten repetitiven Lungenfunktionsmessungen in diesem Experiment nur eine Intubation der Mäuse in Betracht, wie sie von De Vleeschauer beschrieben wurde [2]. Die Intubation wurde hier sowohl für die Instillation (siehe 3.2.4) zu Beginn des Experimentes als auch für alle Lungenfunktionsmessungen im Verlauf genutzt.

Die Intubation und Lungenfunktionsmessung einer Maus erfordert deren zuverlässige Narkotisierung. Aufgrund ausgezeichneter Ergebnisse bei den Vorversuchen dieses Experimentes, wurde für die Narkose hier eine Mischung aus 500 µg/kg/KG Medetomidin (Domitor[®], Orion Pharma), 5 mg/kg/KG Midazolam (Dormicum, Roche) und 50 µg/kg/KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Janssen), abgekürzt MMF, verwendet. Die Narkose lässt sich mit einer Mischung aus 2,5 mg/kg/KG Atipamezol (Antisedan[®], Orion Pharma), 500 µg/kg/KG Flumazenil (Flumazenil HEXAL, Hexal[®]) und 1,2 mg/kg/KG Naloxon (Naloxon-Actavis, Actavis) antagonisieren.

Die Mäuse wurden intraperitoneal mit einer entsprechend gewichtsadaptierten Dosis MMF narkotisiert und nach vollständigem Einsetzen der Narkose mit den Vorderzähnen an eine gespannte Schnur gehängt. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Zunge der Maus vorsichtig zu einer Seite hin aus dem Mund vorgezogen und zwischen zwei Fingern fixiert. Die Intubation erfolgte mit einer 18G (1,3 x 33 mm) Braunüle[®] unter Zuhilfenahme eines Lichtleitkabels zur besseren Orientierung. Hierbei suchte man zunächst

den Kehldeckel der Maus auf und stellte die Stimmlippen und die Trachea dar. Nun konnte unter Sicht die Braunüle[®] vorgeschoben werden. Nach erfolgter Intubation war eine Kontrolle der korrekten, intratrachealen Lage der Braunüle[®] nötig. Hierzu wurde die Maus an das Kleintierbeatmungsgerät MiniVent (A.1) angeschlossen und die Thoraxexkursion beobachtet. Bei korrekter Intubation hob und senkte sich der Brustkorb in der eingestellten Beatmungsfrequenz. Der MiniVent konnte bei Bedarf zur Zwischenbeatmung der narkotisierten Maus genutzt werden.

3.2.3 Lungenfunktion

Für die Lungenfunktionsmessung wurde der FlexiVent[™] der Firma SCIREQ[®] verwendet (A.1). Es handelt sich dabei um ein Gerät zur Lungenfunktionsmessung, das für die Anwendung bei Kleintieren optimiert wurde.

Mithilfe des FlexiVents[™] lassen sich unter anderem die folgenden Parameter der Lungenfunktion ermitteln: Compliance (C), Resistance (R), Elastance (E), Tissue Damping (G), Inertance (I), Tissue Elastance (G) sowie die Inspiratory Capacity (IC). Die Messungen beruhen zu großen Teilen auf der Forced Oscillation Technique (FOT) bzw. auf Druck-Volumen-Manövern (siehe SCIREQ[®]/Techniques & Measurements).

In dieser Arbeit kamen die Messmanöver SnapShot (FOT), Primewave (low frequency FOT=LFOT) und TLC (deep inflation manoeuvre) zum Einsatz. Alle Messmanöver wurden standardmäßig mit einer Wellenform-Analyse ('Waveform Analyzer') ausgewertet. Es folgten Analysen mit dem Single Compartment Model (SCM) und dem Constant Phase Model (CPM) [10]. Neben den oben genannten Funktionsparametern, lieferten diese Modelle außerdem einen 'Coefficient of Determination' (COD) für jede einzelne Messung, der als Qualitätskontrolle diente. Ein COD mit einem Wert von 1 entspricht optimalen Versuchsbedingungen.

Vor Benutzung des FlexiVents[™] wurde das Gerät, gemäß Anweisungen in der Betriebsanleitung, eingestellt, auf Dichtigkeit geprüft und vor jeder einzelnen Messung kalibriert. Um ein Auskühlen der narkotisierten Mäuse zu verhindern, fanden die Messungen auf einer Wärmeplatte statt.

3.2.4 Instillation

Wie zuvor beschrieben, wurde in dieser Arbeit als Applikationsart des Bleomycins die intratracheale Instillation gewählt.

Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der applizierten Flüssigkeit zu gewährleisten, kam für die intratracheale Instillation der Microsprayer[®] (A.1) mit Hochdruckspritze zum Einsatz. Im Gegensatz zu anderen Applikationsarten, kann bei diesem Verfahren die Flüssigkeit über eine feine Nadel in Mikropartikel von 16-22 µm Durchmesser zerstäubt werden und sich verhältnismäßig homogen verteilen.

Um außerdem zu verhindern, dass durch die manuelle Betätigung der Hochdruckspritze, Unterschiede bei Applikationsschnelligkeit und damit Gleichmäßigkeit zwischen den einzelnen Mäusen entstehen konnten, wurde eine eigens konstruierte Vorrichtung zur Spritzenbetätigung verwendet. Die Hochdruckspritze wurde in die Spritzvorrichtung eingespannt und konnte per Fußpedal betätigt werden. Die Applikationsgeschwindigkeit war damit vereinheitlicht.

Für die Instillation wurde die narkotisierte und intubierte Maus (siehe 3.2.2) vorsichtig von der Zwischenbeatmung am MiniVent getrennt und der Konus der 18G Braunüle[®] abgeschnitten. Das in der Trachea verbleibende Katheterstück wurde mitsamt Maus über den Spritzaufsatz des Microsprayers gestülpt und während des gesamten Vorganges sicher fixiert. Per Fußpedal wurde die Hochdruckspritze des Microsprayers ausgelöst und anschließend zwei bis drei Sekunden gewartet. Hierdurch sollte eine sichere Verteilung der Flüssigkeit gewährleistet werden. Entfernt man die Braunüle[®] zu schnell, ist es möglich, dass Restflüssigkeit darin verbleibt. Wartet man hingegen zwei bis drei Sekunden, gelangt auch die Restflüssigkeit, durch die erhaltene Eigenatmung der Maus, in deren Lungen. Nun musste die Maus zügig vom Microsprayer getrennt und extubiert werden. Die Narkose wurde durch subkutane Injektion mit der unter 3.2.4 beschriebenen Wirkstofflösung antagonisiert und die Mäuse zum Aufwachen in einen separaten Käfig gesetzt.

3.2.5 Präparation

Im Anschluss an die zuvor erfolgte Lungenfunktionsmessung, wurde die Maus in Rückenlage und mit überstrecktem Hals auf einer, mit Alufolie präparierten Styropor-Unterlage fixiert und das Fell mit Ethanollösung besprüht (desinfiziert und erleichtert die Präparation).

Die Femoralarterien der Maus wurden freipräpariert und durchtrennt. Durch dieses Vorgehen kam es rasch zum Ausbluten der Maus und der Tod trat ein bevor die Narkosetiefe nachlassen konnte. Bei Bedarf kann an dieser Stelle eine Blutprobe entnommen werden. Als nächstes wurde die Bauchhaut der Maus in Längsrichtung bis unter das Kinn eingeschnitten und zur Seite präpariert. Die obere Faszie der Halsloge wurde eröffnet und, unter Schonung der Halsgefäße, die darunter liegenden Muskeln zur Seite gedrängt oder abpräpariert. Die Trachea wurde freigelegt und durch eine vorsichtige Querinzision eröffnet. Für die später stattfindende Bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde eine Metallkanüle mit circumferierenden Einkerbungen eingeführt und mit einem Bindfaden fest fixiert.

Nun folgte zunächst die vorsichtige Eröffnung des Peritoneums unter Schonung des Darmes und der anderen Abdominalorgane. Durch leichtes Abdrängen des Darmes nach unten, konnte ein Zugang zum Zwerchfell geschaffen und das Zwerchfell anschließend inzidiert werden. Dadurch wird ein Pneumothorax verursacht, die Lunge der Maus fällt zusammen. Dieser Vorgang ist wichtig, um bei der folgenden Eröffnung des Thorax eine Verletzung des Lungengewebes zu verhindern. Sobald der Thorax über eine mediale Sternotomie eröffnet war, wurden die Thoraxhälften zu den Seiten hin an der Unterlage fixiert und damit Herz und Lunge freigelegt. Der Thymus wurde aufgesucht und entfernt.

Eine BAL wurde durchgeführt (Details unter 3.3.1)

Um die Lungengefäße von Erythrozyten zu befreien¹ wurde nun eine Spülung des Lungenkreislaufes vorgenommen indem man den linken Herzvorhof einschnitt, den rechten Ventrikel mit einer feinen Kanüle punktierte und über diese mit einer 5 mL Spritze den Lungenkreislauf mit Kochsalzlösung spülte. Der linke Lungenflügel wurde nun für die spätere, histologische Aufarbeitung in Paraformaldehyd (PFA) fixiert, der rechte Lungenflügel in Flüssigstickstoff gefroren und für spätere RNA-Gewinnung bei -80°C aufbewahrt.

¹Dieses Vorgehen ergibt später bessere histologische Ergebnisse.

3.3 Probenaufarbeitung und Datengewinnung

In diesem Abschnitt wird dargestellt, wie die bei der Präparation entnommenen Gewebe- und BAL-Proben bearbeitet und aufbereitet wurden, um daraus anschließend quantifizierbare Daten über den Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu gewinnen.

3.3.1 BAL, Zellfärbung und Zellzählung

Die Durchführung der Bronchoalveolären Lavage (BAL) dient der Ermittlung der leukozytären Zellzahlen im Bronchialsystem², wodurch Rückschlüsse auf z.B. ein entzündliches Geschehen möglich sind.

Die Proben der BAL wurden durch Färbung mit Trypanblau und außerdem durch Erstellung und Färbung von Cytospins[™] aufbereitet. Es kam hier die Cytospin[™]-Zentrifuge der Firma Thermo Fisher Scientific zur Verwendung (A.1).

Über die Metallkanüle in der Trachea der Mäuse und mithilfe von 1ml Einwegspritzen, wurde die BAL mit 3x500 µl PBS vorgenommen. Wichtig ist dabei, die Lavage schonend durchzuführen und keinen Unterdruck in der Spritze zu erzeugen um einerseits das Lungengewebe nicht zu beschädigen und andererseits eine Verfälschung der Ergebnisse (Zellzahlen) zu vermeiden. Die Lavageflüssigkeit wurde in 5 ml Eppendorf[®]-Tubes aufgefangen und anschließend bei 1200 U/min 20 min. lang abzentrifugiert. Die Überstände der Zentrifugation wurden vorsichtig abpipetiert, zu möglichst gleichen Teilen auf zwei neue Eppendorf[®]-Tubes aufgeteilt und für eventuelle, spätere Untersuchungen (z.B. auf Cytokine) bei -80°C eingefroren.

Das zentrifugierte Zellpellet wurde in 500 µl RPMI-Zellkulturmedium resuspendiert, gut durchmischt und 20 µl davon im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gefärbt. Wiederum 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden auf eine Zählkammer (Hämozytometer, Neubauer-Kammer) gegeben und mit einem Objektglas fixiert. Die Färbung mit Trypanblau erlaubt die Abgrenzung von Leukozyten gegenüber Erythrozyten.

Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung der Leukozyten in vier Zählquadraten. Die

²Im Bronchialsystem befinden sich im Normalfall wenige Leukozyten und keine Erythrozyten. Bei einer Verletzung des Lungengewebes ist dennoch eine Kontamination mit Erythrozyten in der BAL möglich, die teilweise das Auszählen der Leukozyten erheblich erschwert.

absolute Zellzahl der Suspension wurde aus dem Mittelwert der Zellzahl von vier Zählquadraten mit der folgenden Formel berechnet: $(n \text{ Zellen}/4) \times 10^4/\text{ml}$ (der Verdünnungsfaktor von 1:2 und das Gesamtvolumen von 500 μl hoben sich in der Formel gegenseitig auf und wurden daher nicht berücksichtigt).

Für die Erstellung der Cytospins[™] wurde eine Zellzahl von maximal 30.000 Zellen pro Objektträger angestrebt. Es erfolgte eine Aufteilung des dementsprechenden Volumens Zellsuspension auf ein bis zwei Cytospin-Trichter. Unter Verwendung von Menzel-Objektträgern und Shandon-Filtern (beides Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden die Cytospin-Trichter beladen und die Zell-Zentrifuge für sechs Minuten bei 400 Umdrehungen gestartet. Die fertigen Cytospins trockneten unter Raumluft.

Zellfärbung

Die getrockneten Cytospins wurden nach May-Grünwald/Giemsa gefärbt, da diese Art der Färbung eine differenzierte Zellzählung ermöglicht. Folgendes Färbeprotokoll kam zum Einsatz:

CYTOSPIN/ZELL-FÄRBUNG NACH MAY-GRÜNWALD UND GIEMSA

Die luftgetrockneten Cytospin-Objektträger...

1. 10 min. in konzentrierter May-Grünwald Lösung färben
2. 2 min. wässern in H₂O
3. 15 min. in Giemsa Lösung (Verhältnis 1:20 Giemsa:H₂O) färben
4. 2 min wässern in H₂O
5. Bei Raumluft trocknen lassen
6. Eindeckeln mit Entellan[®] unter dem Abzug

Die verwendeten Farben sind in Anhang A.3 nachzulesen.

Zellzählung

Die Zählung der Zellen in den gefärbten Cytospins erfolgte bei 20facher Vergrößerung an einem Durchlichtmikroskop. Es wurden randomisiert 200 Zellen in verschiedenen Sichtfenstern ausgezählt und dabei folgende Zellarten berücksichtigt: Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Mithilfe der zuvor berechneten Gesamtzellzahl

(siehe 3.3.1) konnten die absoluten Zahlen der einzelnen Zellarten anteilig hochgerechnet werden.

3.3.2 Histologie

Um einen Eindruck der Gewebeveränderungen im Laufe der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu erhalten, wurde wie zuvor unter 3.2.5 beschrieben, jeweils der linke Lungenflügel der Mäuse entnommen und im Anschluss daran histologisch aufbereitet. Die Aufbereitung umfasste die Einbettung der Lungen in Paraffin, das Schneiden der Paraffinblöcke in repräsentative, histologische Schnittbilder und das Färben dieser Schnittbilder.

Entnahme des Lungengewebes, PFA-Instillation und Einbettung in Paraffin

Die Einbettung der Lungen richtete sich nach dem institutseigenen Protokoll. Im Anschluss an die beschriebene BAL wurde der rechte Lungenflügel am zentralen Bronchus mit einem Bindfaden abgebunden, distal davon der Bronchial- und Gefäßbaum durchtrennt, der Lungenflügel entnommen und in Flüssigstickstoff gefroren. Der linke Lungenflügel wurde mit 6 %igem PFA über 10 Minuten hinweg mit gleichmäßigem Druck von 20 mmH₂O instilliert, ebenfalls hilusnah abgebunden, entnommen und über Nacht in PFA fixiert. Im Anschluss daran wurde der Lungenflügel von überschüssigem Gewebe befreit, gewogen und danach in 2% igem Agar fixiert. Mittels Schneideblock wurde die Lunge im Agar in 2mm breite Streifen geschnitten, die Gewebestücke nebeneinander angeordnet, ohne dabei die Ausrichtung der Schnittflächen zu verändern, und wiederum auf Eis mit Agar fixiert. Es folgte die Übertragung in spezielle Kassetten für die Entwässerung. Die Kassetten mit den Lungengewebesanschnitten wurden in den Entwässerungsautomaten TP 1020 der Firma Leica Biosystems (A.1) gegeben und über ca. 18,5 Stunden hinweg in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der Entwässerung erfolgte die Einbettung der Lungenanschnitte in Paraffin, mithilfe des Einbettautomaten Histostar™ (A.1). Um eine ausreichende Aushärtung der Paraffinblöcke mit dem eingebetteten Lungewebe zu erreichen, wurden sie über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Anfertigen von Schnittpräparaten

Für die Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten der Lunge, wurde hier das Schneidegerät Hyrax M55 der Firma Zeiss verwendet. Die Schneidedicke betrug 3 µm. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte kurz ins warme Wasserbad gegeben, um eine adäquate Ausdehnung zu erreichen und anschließend mit beschichteten Menzel-Gläsern Superfrost® Plus der Firma Thermo Fisher Scientific aufgefangen und luftgetrocknet.

Färbungen

Die fertigen Schnittpräparate wurden mit zwei verschiedenen Färbemethoden aufbereitet, um eine adäquate Beurteilung unter dem Mikroskop zu ermöglichen. Zunächst wurde eine einfache Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt, die sich zur Gewinnung eines ersten Überblickes über morphologische Veränderungen in der Lunge eignet. Die HE-Färbung gilt als Standardfärbung und ist allein aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten annähernd unverzichtbar.

Da bei der Lungenfibrose die Akkumulierung von Kollagen in den Alveolarsepten ein wesentliches Merkmal ist, wurden die Präparate außerdem mit einer Variante der Masson-Trichrom-Färbung bearbeitet. Dabei stellt sich Kollagen als kräftig grün dar, Zytoplasma wird rötlich und Zellkerne werden rotbräunlich angefärbt. Die Masson-Trichrom-Färbung erlaubt eine bessere Abgrenzung der verdickten und kollagenhaltigen Alveolarsepten gegenüber dem normalen Lungengewebe, als es mit einer HE-Färbung möglich ist.

Es wurden jeweils Farben der Firma Merck verwendet (siehe A.1 und A.2). Folgende Färbeprotokolle kamen zur Anwendung:

HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG

Entparaffinieren der Gewebeschnitte:

2x 5 min. Xylolbad,

Absteigende Alkoholreihe, jeweils 1 min.: 2x 100%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70%

Kurz in Aqua dest spülen

1. 5 min. in Mayer's Hämalaun

2. Kurz mit Leitungswasser spülen

3. Kurz in HCL-Alkohol differenzieren

4. 10-15 min. wässern mit Leitungswasser
5. Kurz in Aqua dest spülen
6. 8 min. in Eosin (alkoholisch)
7. 15. Fixieren mit aufsteigender Alkoholreihe jeweils 1min.: 2x 100%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70% und 2x 5 min Xylolbad, Eindeckeln

TRICHROMFÄRBUNG NACH MASSON-GOLDNER

Entparaffinieren der Gewebeschnitte:

2x 5 min. Xylolbad,

Absteigende Alkoholreihe, jeweils 1 min.: 2x 100%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70%

Anschließende Färbung:

1. 10 min. in Weigert's Eisenhämatoxylin
2. 2x 1,5 min. spülen in Leitungswasser
3. 1 min. in 0,3% HCL-Alkohol differenzieren (100 ml 70%iger Alkohol + 1 ml konz. HCL 32%)
4. 2x 1,5 min. spülen in Leitungswasser
5. Kurz in Aqua dest spülen
6. 6 min. in Ponceau-Säurefuchsin
7. Kurz in Aqua dest spülen
8. 2x kurz in 1% Essigsäure spülen
9. Kurz in Aqua dest spülen
10. 5 min. in Phosphormolybdänsäure-Orange
11. 2x kurz in 1% Essigsäure spülen
12. 8 min. in 0,2% Lichtgrün
13. Kurz in 1% Essigsäure spülen
14. Mit Aqua dest abspülen
15. Fixieren mit aufsteigender Alkoholreihe jeweils 1min.: 2x 100%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70% und 2x 5 min Xylolbad, Eindeckeln

3.3.3 Morphologische Untersuchungen

Die fertig gefärbten, histologischen Schnittpräparate der Lungen, wurden in HE und Masson-Trichrom-Färbung morphologisch untersucht.

Um einen Eindruck des Grades der Fibrose zu gewinnen, den die Mäuse im Verlauf des

Versuches entwickelt hatten und diesen in Zahlenwerte zu übersetzen, wurde zunächst ein semiquantitatives Scoring der histologischen Schnittpräparate durchgeführt. Dabei wurden die Präparate in HE-Färbung für den Untersucher geblindet und mithilfe eines Durchlichtmikroskopes auf die Ausprägung der Fibrose hin beurteilt. Als fibrotisch galt solches Lungengewebe, dessen Alveolarsepten deutlich verdickt und bindegewebig durchsetzt oder nicht mehr abgrenzbar waren. Da Alveolargewebe normalerweise ein sehr charakteristisches Aussehen hat, fällt die Unterscheidung zwischen normalem Lungengewebe und Fibrose relativ leicht (zur Veranschaulichung siehe Abbildung 3.2).

Es schloss sich eine quantitative stereologische Untersuchung mithilfe der Computer assisted stereological toolbox (CAST) an, bei der die histologischen Schnittbilder gescannt und mittels Zählraster verschiedene Merkmale ausgezählt wurden, aus denen sich u.a. der Gewebeanteil der Lungen bestimmen ließ.

Fibrose-Scoring

Das hier angewendete Fibrose-Scoring diente dazu, einen groben Eindruck der morphologischen Veränderungen auf histologischer Ebene im Verlauf der Krankheitsentwicklung zu gewinnen. Die Ergebnisse dieser semiquantitativen Analyse werden durch die der quantitativen stereologischen Untersuchung präzisiert.

Es wurde ein Bewertungssystem von 0 - 5 angewendet. Dabei entsprachen die Punktwerte folgenden Ausprägungen der Fibrose: 0 = keine Fibrose, 1 = weniger als 10 % fibrotische Areale, 2 = mehr als 10 % fibrotische Areale, 3 = mehr als 30 % fibrotische Areale, 4 = mehr als 50 % fibrotische Areale, 5 = mehr als 80 % Fibrose oder komplett fibrosiertes Lungenparenchym.

Stereologische Untersuchungen

Für die quantitative Bestimmung des Fibrosegrades in den Lungen der Versuchstiere, wurde das newCAST[™]-System der Firma Visiopharm mit der gleichnamigen Software (siehe A.1) für die stereologische Untersuchung verwendet. Die histologischen Lungenschnittbilder wurden mit dem Olympus Mikroskop BX51 aquiriert und visualisiert.

Bei 20facher Vergrößerung, erstellte die Software zwischen 35 und 45 zufällige Zählfenster, sodass eine unverzerrte Auswahl an Gewebssausschnitten beurteilt werden konnte.

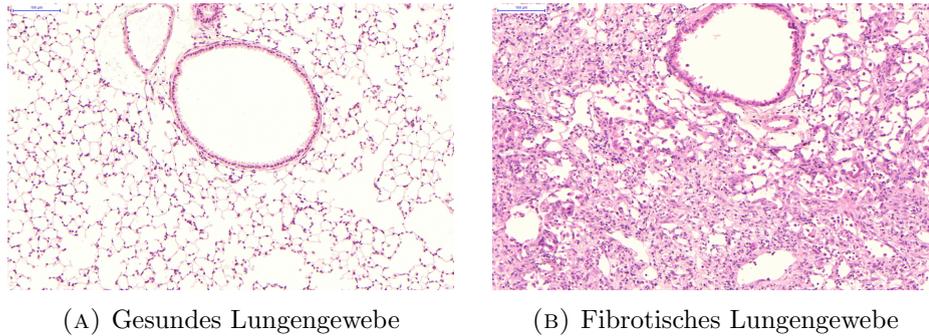


ABBILDUNG 3.2: Vergleich von gesundem und fibrotischem Lungengewebe in HE-Färbung. Am mittleren oberen Rand des Bildes sind jeweils ein Bronchus und ein arterielle Blutgefäß im Anschnitt zu sehen.

Ein Zählraster mit drei Zählkriterien, die in Tabelle 3.1 dargestellt sind, wurde konstruiert. Von Interesse für die hier angewendete Auswertung war, ob die betroffenen Zählpunkte im Septalbereich (Zählpunkt *Septum*=*S*) oder außerhalb dessen z.B. im Bereich eines Bronchus oder Blutgefäßes lagen (Zählpunkt *Non-Septum*=*NS*). Außerdem wurden alle Punkte gezählt, die auf ein verdicktes Alveolarseptum mit Kollagengehalt trafen (Zählpunkt *Kollagen-Septum*=*KS*). Abbildung 3.3 zeigt ein Zählfenster (*F*) mit Zählraster, inklusive aller Zählpunkte am Beispiel eines stark fibrotischen Lungenausschnittes.

Der Zählpunkt Septum wurde mit neun multipliziert. Daraus ergibt sich für die Summe

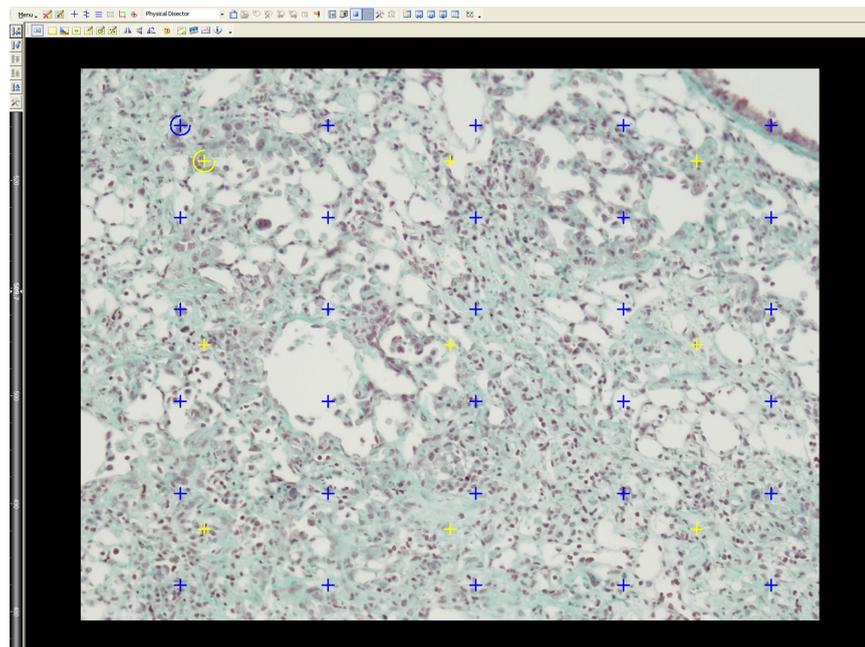


ABBILDUNG 3.3: Screenshot eines Lungengewebeausschnitts mit benutzerdefiniertem Zählraster in 20 facher Vergrößerung; gelbes Kreuz mit Kreis (oben links) für Septum, neun gelbe Kreuze für Non-Septum, 16 blaue Kreuze für Kollagen-Septum; Software Vis/Visiopharm, CAST

TABELLE 3.1: Messkriterien und Zählpunkte

	Septum	Non-Septum	Kollagen Septum
Anzahl Zählpunkte	1 Zählpunkt (gelb, links oben)	9 Zählpunkte (gelb)	16 Zählpunkte (blau)
Kriterien	Befindet sich der Zählpunkt im Bereich von Alveolarsepten?	Liegt der Zählpunkt woanders als im Bereich von Alveolarsepten, z.B. Bronchus oder Blutgefäß?	Liegt der Punkt auf einem Septum das Kollagen aufweist?
Punktwert	Septum = 1, kein Septum = 0	Kein Septum = 1, Septum = 0	Kollagenseptum = 1, alles Andere = 0

der Septum-Zählpunkte (S_i) eines Zählfensters (F_j): $S_{F,j} = 9 \cdot \sum_{i=1}^{k=1} S_i$. Für Non-Septum-Zählpunkte (NS_i) ergibt sich: $NS_{F,j} = \sum_{i=1}^{k=9} NS_i$ und für Kollagen-Septum-Zählpunkte (KS_i): $KS_{F,j} = \sum_{i=1}^{k=16} KS_i$.

Daraus folgen für die Gesamtheit der Zählpunkte pro Probe (Summe über alle Zählfenster) die Berechnungen $S_{ges} = \sum_{j=1}^n S_{F,j}$, $NS_{ges} = \sum_{j=1}^n NS_{F,j}$ und $KS_{ges} = \sum_{j=1}^n KS_{F,j}$, wobei n der Anzahl der Zählfenster entspricht. Um näherungsweise zu berechnen, wie hoch der Anteil des Septalbereiches (im Verhältnis zu Blutgefäßen und größeren Atemwegen) in der Lunge der Mäuse war, wurde die Formel: $AnteilSeptum(AS) = \frac{S_{ges}}{S_{ges} + NS_{ges}} \cdot 100\%$ verwendet. Anschließend wurde näherungsweise der Anteil der kollagenhaltigen Alveolarsepten berechnet: $AnteilKollagen(AK) = \frac{KS_{ges}}{S_{ges} + KS_{ges}} \cdot 100\%$.

Schließlich wurde mit der Formel $Kollagenanteil\% = \frac{AK}{AS} \cdot 100\%$ der Kollagenanteil (AK) prozentual ins Verhältnis zum Septumanteil gesetzt. Für die Auswertung wurde dieser prozentuale Kollagenanteil herangezogen.

3.3.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Um eine quantitative PCR durchzuführen, werden als Ausgangsmaterial DNA-Proben benötigt. In dieser Arbeit war die Expression verschiedener Gene im Lungengewebe von Interesse, weshalb zunächst eine Extraktion der RNA aus dem Lungengewebe erfolgte und diese RNA im Anschluss in cDNA überführt wurde.

RNA-Extraktion

Zum Zweck der RNA-Extraktion wurde zunächst das bei -80°C gefrorene Lungengewebe mithilfe des Mikro-Dismembrator S der Firma Sartorius (A.1) homogenisiert und

das homogenisierte Gewebe anschließend für die RNA-Extraktion verwendet. Folgendes Protokoll fand Anwendung:

RNA EXTRAKTION

RNA-Extraktion aus jeweils 0,2 g homogenisiertem Lungengewebe mithilfe des Roti[®]-Quick-Kits der Firma Carl Roth (Carl Roth[®]/Roti[®]-Quick-Kit), bestehend aus den Quick-Solutions 1-3

1. 2ml der Quick-Solution 1 werden den 0,2 g Lungenhomogenisat in einem 5 ml Tube hinzugefügt
2. Die Mischung 20 min. auf Eis inkubieren
3. Mithilfe einer 2 ml Spritze die Zellsuspension scheren
4. 2 ml gekühlte (4°C) Quick-Solution 2 hinzufügen (die Lösung vor Gebrauch vortexen!)
5. 10 min. oder länger auf Eis inkubieren und alle 2 min. vortexen
6. Bei 4°C und 13.000 rpm 15 min. zentrifugieren. Nach der Zentrifugation bilden sich zwei Phasen. Die obere, wässrige Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführen
7. Das äquivalente Volumen des abpipetierten Überstandes Quick-Solution 3 hinzufügen, vorsichtig mischen und bei -80°C für eine Stunde (oder länger) inkubieren
8. 15 min. bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
9. Den Überstand entfernen, das Zellpellet am Grund des Tubes ist die RNA
10. Das Zellpellet in jeweils 200 µl Quick 1 und Quick 2 resuspendieren
11. Die Schritte 9 und 10 wiederholen
12. Das Gemisch 20 min. bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand entfernen, zu dem verbliebenen Pellet 500 µl 70% igen Alkohol hinzufügen und vorsichtig vermischen
13. Für 10 min. bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren, vorsichtig den Überstand entfernen und das verbliebene Pellet bei Raumtemperatur etwa 10-15 min. trocknen lassen
14. Das Pellet vorsichtig in RNase freiem Wasser resuspendieren

cDNA Gewinnung

Für die Gewinnung von cDNA werden 0,5 bis 1,0 µg RNA benötigt. In dieser Arbeit wurden 0,7 µg je Probe verwendet.

Zunächst musste die RNA-Konzentration der einzelnen Proben ermittelt werden. Mittels NanoDrop 1000 der Firma Thermo Fisher Scientific (A.1), erfolgte die Messung der RNA-Konzentration aus jeweils 2 µl der, wie zuvor beschrieben gewonnenen, RNA-Suspension. Entsprechend der gemessenen Konzentration wurde die für die cDNA-Gewinnung benötigte Menge an RNA-Suspension errechnet, in ein Eppendorf[®]-Tube überführt und mit zweifach destilliertem Wasser (H₂O bidest) aufgefüllt bis eine Gesamtmenge von 20 µl erreicht war. Die Proben wurden kurz auf Eis gelagert, zentrifugiert und anschließend für 10 min. bei 70°C im Thermocycler PTC-200 der Firma MJ Research denaturiert. Es folgte die reverse Transkription der denaturierten RNA. Hierfür wurden zu den 20 µl RNA eine äquivalente Menge Mastermix hinzugefügt, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

4,0 µl	Pufferlösung	100mM Tris-HCl + 500mM KCL (pH 8,3)
8,0 µl	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	25mM
2,0 µl	dNTPs (Nukleosidtriphosphate)	10 mM
2,0 µl	Lösung zufälliger Hexamere	50 µM
1,0 µl	Rnase-Inhibitor	10 U
2,0 µl	Reverse Transkriptase	50 U
1,0 µl	H ₂ O bidest	

Die reverse Transkription erfolgte, wie bereits die Denaturierung, im Thermocycler. Dieses Mal wurden die Proben 10 min. bei 20°C, danach 75 min. bei 43°C und 5 min. bei 99°C erhitzt und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Die fertige cDNA konnte nun bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden.

3.3.4.1 Quantitative PCR

Für die Durchführung der quantitativen oder realtime-PCR (q-PCR), wurden die zuvor transkribierten cDNA-Proben benötigt (siehe 3.3.4). Die 40 µl cDNA-Proben wurden schonend auf Eis aufgetaut und mit 60 µl H₂O bidest verdünnt. Als Fluoreszenz-Farbstoff

kam hier SYBR[®]Green zum Einsatz. Der Ansatz für den Mastermix der q-PCR setzt sich wie folgt zusammen:

13,0 µl	Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR Super-Mix-UDG	Fertiglösung
1,0 µl	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	50 mM
0,5 µl	Primer forward	
0,5 µl	Primer reverse	
8,0 µl	H ₂ O bidest	

Tabelle 3.2 enthält die Liste der verwendeten Primer.

Auf einer PCR-Platte mit 96 Wells, erfolgte die Pipettierung von jeweils 23 µl Mastermix + 2 µl der zu untersuchenden cDNA je Probe. Als housekeeping-Gen kam bei allen Amplifizierungen hprt1 zur Verwendung. Alle cDNA-Proben wurden je Primer doppelt pipettiert und für jeden Primer außerdem eine 'leere' Probe angelegt (Mastermix ohne cDNA). Auf diese Weise sollten einerseits Messungenauigkeiten erfasst bzw. ausgeglichen (Doppelpipettierung) und eventuelle Verunreinigungen ausgeschlossen/detektiert werden (leere Probe).

Die realtime-PCR wurde mithilfe des StepOnePlus[™]-Systems (Siehe Anhang A.1) durchgeführt. Insgesamt umfasste die Messung einer 96-Well Platte 45 Zyklen. Folgendes PCR-Zyklus-Protokoll wurde dabei eingehalten:

Denaturierung:	02:00 min. bei 50°C
	05:00 min. bei 95°C
Annealing:	00:05 min. bei 95°C
	00:05 min. bei 59°C
Amplifikation:	00:30 min. bei 72°C
Schmelzkurvenanalyse:	00:15 min. bei 95°C
	01:00 min. bei 60°C + 0.3°C Schritte bis
	95°C für 00:15 min.

Die Auswertung der quantitativen Messungen erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode als relative Quantifizierung (RQ). Dabei wurde die Differenz der Ct-Werte (Cycle Threshold) zwischen housekeeping- und Zielgen gebildet (ΔC_t) und danach die Differenz zwischen dem ΔC_t -Wert jeder einzelnen Probe und dem Mittelwert der ΔC_t -Werte der PBS-Tiere

des jeweils betreffenden Versuchstages ($\Delta\Delta Ct$). Der erhaltene Wert wurde in die Formel 'n-fache Expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, eingesetzt.

Primer	Richtung	Spezies	Sequenz
PRMT1	fov	Maus	CGA ACT GCA TCA TGG AGA AT
PRMT1	rev	Maus	AGC GTT GGG CTT CTC CAC TAC
PRMT2	fov	Maus	CTA TGG AGG CAC CAG GAG AA
PRMT2	rev	Maus	CTG TAA TGT GCC CCA TCC T
PRMT3	fov	Maus	GTG CCT TGG GAA AAA GAT GA
PRMT3	rev	Maus	TCA ACA ACA GAT GCG CTT TC
PRMT4	fov	Maus	TGT TCA GTG AGC GGA CAG AG
PRMT4	rev	Maus	GTC CTT GAA GTC CGT GTG GT
PRMT5	fov	Maus	TGA CCA ACC ACA TCC ACA CT
PRMT5	rev	Maus	GTG TGT AGT CGG GGC ATT CT
PRMT6	fov	Maus	AAA CCT CTG GTG CTG TCC AC
PRMT6	rev	Maus	TTT CCT CAT GGT CTC CCA CT
PRMT7	fov	Maus	TAC TGC AGG GGC TGA CTT CT
PRMT7	rev	Maus	TCA CCT CAG TGG AGT GCT TG
PRMT8	fov	Maus	CAA GAT GTC CAA GCT GCT GA
PRMT8	rev	Maus	ATG GAG TTC CGG TAC GTG AG
Colla1	fov	Maus	CCA AGA AGA CAT CCC TGA AGT CA
Colla1	rev	Maus	TGC ACG TCA TCG CAC ACA
Hprt1	fov	Maus	CCT AAG ATG AGC GCA AGT TGA A
Hprt1	rev	Maus	CCA CAG GAC TAG AAC ACC TGC TAA
PAI-1	fov	Maus	ATC AAT GAC TTA CTG GCC AAG G
PAI-1	rev	Maus	AGA CTT GTG GAA GAG GCG CTG G

TABELLE 3.2: Primer-Liste

3.3.5 Western Blots

Zum Nachweis der herabgesetzten Protein-Synthese von CARM1 bei CARM1^{+/-}-Mäusen, wurden Western Blots dieser Tiere erstellt und mit denen der Wildtyp-Mäuse verglichen.

Die Durchführung der Western Blots richtete sich nach dem folgenden Protokoll:

Zunächst erfolgte eine Protein-Extraktion aus dem homogenisierten Lungengewebe der Mäuse mithilfe von RIPA(= Radioimmunoprecipitation assay)-Puffer. Unter Zusatz von Complete Mini Proteinase Inhibitors (1:25, Roche) und 1 mM Natriumorthovanadat (New England Biolabs) wurde das Lungenhomogenisat mit dem RIPA-Puffer vermischt und für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) auf seine Proteinkonzentration hin untersucht.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE Analyse (sodium dodecyl

sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Bio-Rad). Hierfür wurden zunächst 20 µg Protein mit Laemmli Ladepuffer vermischt und bei 95°C und 300 rpm für 10 min. im Thermomixer (Eppendorf) gekocht. Die denaturierten Proteine wurden auf 10% iges Mini-PROTEAN[®]Precast Gel aufgetragen und das Gel für eine Stunde bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 40mA und bei 120 V laufen gelassen. Precision Plus Protein[™] Standard diente zur Identifikation der Proteine von Interesse. Der Proteintransfer erfolgte in einer Transblot-Kassette (Bio-Rad) mit Transfer-Puffer für eine Stunde bei 100 V.

Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 5% fettfreiem Milchpulver und PBS blockiert. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit einem polyklonalen anti-CARM1-Antikörper (Verdünnung 1:750, Kaninchen, Abcam) in bei 4°C über Nacht. Als Ladekontrolle diente anti-β-actin Antikörper (Verdünnung 1:50000, Kaninchen, Sigma-Aldrich). Es folgte die Inkubation mit sekundärem, HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:2500, Ziege, Abcam[®]).

Signal-Entwicklung und Quantifizierung

Durch Entwicklung der Membran mithilfe von Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare), wurden die Signale der Proteinbanden visualisiert und mittels Chemidoc[™] XRS System (Bio-Rad) detektiert. Es erfolgte eine densitometrische Analyse unter Verwendung der integrierten ImageLab[™] Software (Bio-Rad). Die Werte von CARM1 wurden auf die von β-actin normalisiert.

3.3.6 Statistische Auswertung

Ausgewertet wurden verschiedene Parameter der Lungenfunktion, u.a. die Compliance (C), Resistance (R), Inspiratory Capacity (IC) und Elastance (E) sowie Zellzahlen der Bronchoalveolären Lavage (BAL), die Expression der Prmt-Gene 1-9 und zusätzlich PAI-1 und Col1a. Außerdem wurden der stereologisch ermittelte Kollagenanteil der murinen Lungen untersucht, sowie die Proteinexpression von Carm1 in der Versuchsreihe mit Carm1^{+/-}-Mäusen.

In der Versuchsreihe mit repetitiven Lungenfunktionsmessungen wurden als Messzeitpunkte die Tage 7, 14, 21, 28 und 56 festgelegt. In der Carm1-Versuchsreihe lediglich die Tage 21 und 28.

Es fand jeweils ein Vergleich der Bleomycin-behandelten Mäuse mit den PBS-behandelten statt. In der Carm1-Versuchsreihe wurden außerdem Wildtyp-Mäuse mit heterozygoten Carm1-Knockout Tieren verglichen.

Für die Auswertung in der repetitiven Lungenfunktionsreihe, wurde zum Vergleich der PBS- vs. Bleomycin-behandelten Tiere der ungepaarte Mann Whitney t Test herangezogen. Bei Vergleichen zwischen Wildtyp- und Carm1^{+/-}-Mäusen mit gleichzeitigem Vergleich PBS- vs. Bleomycin-behandelt, kam hingegen der ANOVA-Test zum Einsatz. Es galt jeweils ein Konfidenzintervall von 95 %.

Kapitel 4

Ergebnisse

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, stand im Zentrum des Interesses dieser Arbeit, die Etablierung der repetitiven Lungenfunktionsmessung, als Instrument zum Monitoring der Krankheitsentwicklung im Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose.

Des Weiteren wurde im Rahmen dessen untersucht, ob und inwieweit die Enzymklasse der PRMTs an der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose beteiligt ist (4.2). Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf Carm1/Prmt4 (siehe 1.5).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden daher die Effekte der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose speziell bei heterozygoten Carm1 knockout-Mäusen ($\text{Carm1}^{+/-}$) beobachtet (4.3).

4.1 Krankheitsmonitoring im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung, sowie die korrespondierenden Daten aus Histologie und BAL dargestellt werden. Dabei werden jeweils die Ergebnisse der Gruppe mit einzelner Lungenfunktionsmessung ('single-Lufu-Gruppe') denen der Gruppe nach repetitiver Lungenfunktion ('repetitive-Lufu-Gruppe') gegenübergestellt.

4.1.1 Histologie

Bei einmaliger Applikation von Bleomycin in die Lunge von Mäusen, ist die dadurch ausgelöste Fibrosierung bekanntermaßen reversibel (siehe Review Artikel von Moeller et al. [84]). Dieser Effekt war in der single-Lufu-Gruppe sehr gut zu beobachten. In den histologischen Präparaten der Lungen dieser Tiere zeigten sich, im Verlauf des Beobachtungszeitraumes über insgesamt 56 Tage hinweg, die typischen Stadien der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose (Abbildung 4.1).

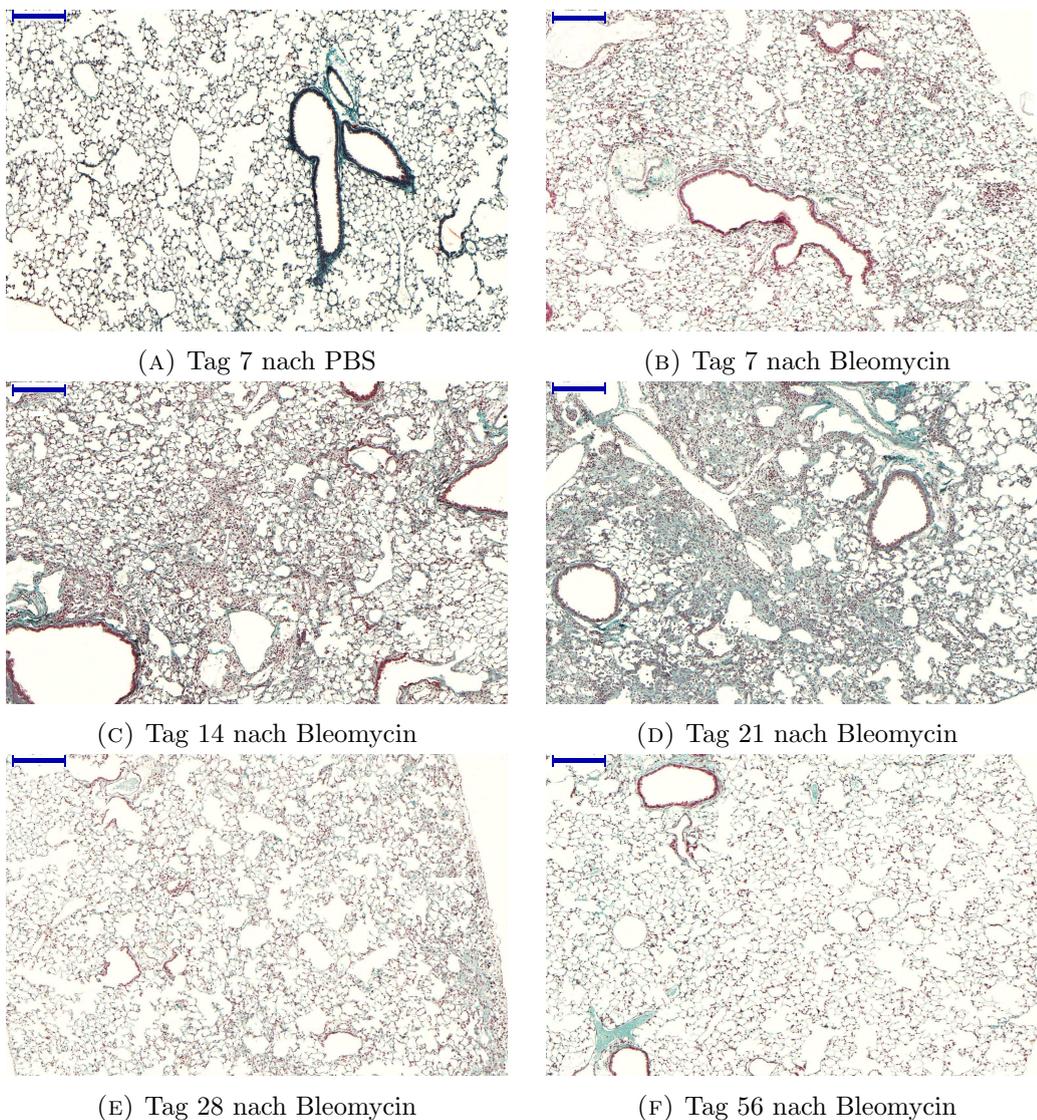


ABBILDUNG 4.1: Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in der single-Lufu-Gruppe über 56 Versuchstage hinweg. (A) Die Lunge eines Versuchstieres das PBS erhielt. (B) Beginnende Entzündung im Alveolargewebe mit Lymphozyten-Infiltration. (C) Die Entzündungsreaktion ist in teils dichte Fibrose umgeschlagen. Alveolarsepten sind schwieriger abgrenzbar. (D) Weiterhin dichte Fibrose im Wechsel mit teilweise erhaltener Alveolarstruktur. (E) Rückgang der Fibrose. (F) Weitestgehende Auflösung der Fibrose. Masson-Trichrom-Färbung, Maßstab entspricht 200 μm

An Versuchstag sieben wurde, bei den Tieren die Bleomycin erhalten hatten, eine entzündliche Zellinfiltration des Lungengewebes sichtbar, die sich herdförmig über die Lunge verteilte. An Versuchstag 14 hatten sich diese Entzündungsherde zu fibrotischen Arealen verdichtet. Die Alveolarsepten zeigten deutliche Verdickungen und einen hohen Kollagenanteil. Die Struktur der Alveolarsepten war an Versuchstag 21 schließlich zu großen Teilen nicht mehr abgrenzbar. Das Lungenparenchym zeichnete sich durch einen hohen Kollagengehalt aus. Es hatte sich eine dichte Fibrose entwickelt. An Versuchstag 28 konnte eine Auflösung der Fibrose beobachtet werden. Von dem dichten Kollagengewebe waren nur noch kleinere Herde übrig. Am letzten Versuchstag schließlich, 56 Tage nach Bleomycin-Instillation, hatten sich auch die letzten Fibroseareale weitestgehend zurückgebildet und das Lungenparenchym imponierte, abgesehen von vereinzelt noch verdickten Alveolarsepten, nun als weitestgehend normal. Abbildung 4.1 zeigt den histologischen Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose.

Analog dazu war bei den Tieren die repetitive Lungenfunktionsmessungen erhalten hatten und erst an Versuchstag 56 präpariert wurden histologisch keine Fibrose mehr nachweisbar. Mikroskopisch ließen sich auch hier noch einzelne verdickte Alveolarsepten ausmachen, insgesamt jedoch stellten sich die Lungen als annähernd krankheitsfrei dar. Siehe Abbildung 4.2.

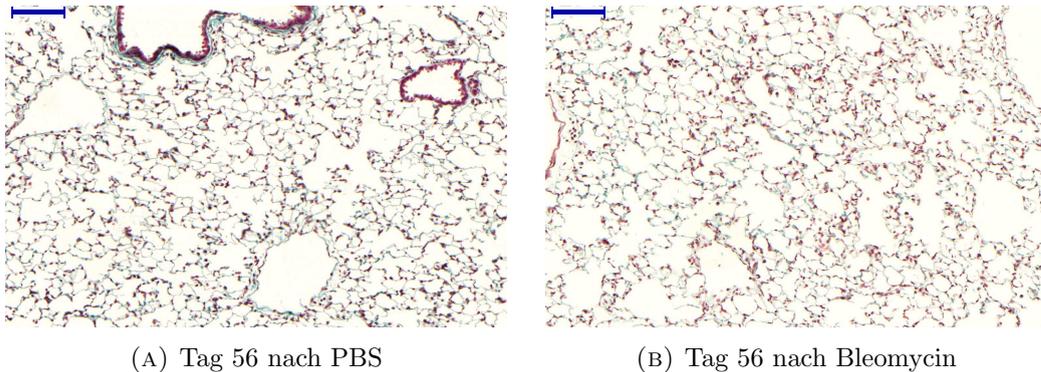


ABBILDUNG 4.2: Histologie der Tiere aus der repetitive-Lufu-Gruppe an Tag 56. (A) Normales Lungengewebe (B) Überwiegend normales Lungengewebe mit einzelnen, fibrotischen Restarealen. Maßstab entspricht 200 μm

4.1.1.1 Semiquantitative Morphologie und quantitative Stereologie

Der Verlauf der Fibroseentwicklung wurde mittels semiquantitativem morphologischem Scoring und quantitativer stereologischer Untersuchung in Zahlenwerte übersetzt, um objektive Vergleichsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Proben zu schaffen (siehe 3.3.3). Wie in Abbildung 4.3 sichtbar, korrelieren sowohl die Werte der semiquantitativen morphologischen als auch der quantitativen stereologischen Untersuchung dabei sehr genau mit dem unter 4.1.1 beschriebenen Verlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose.

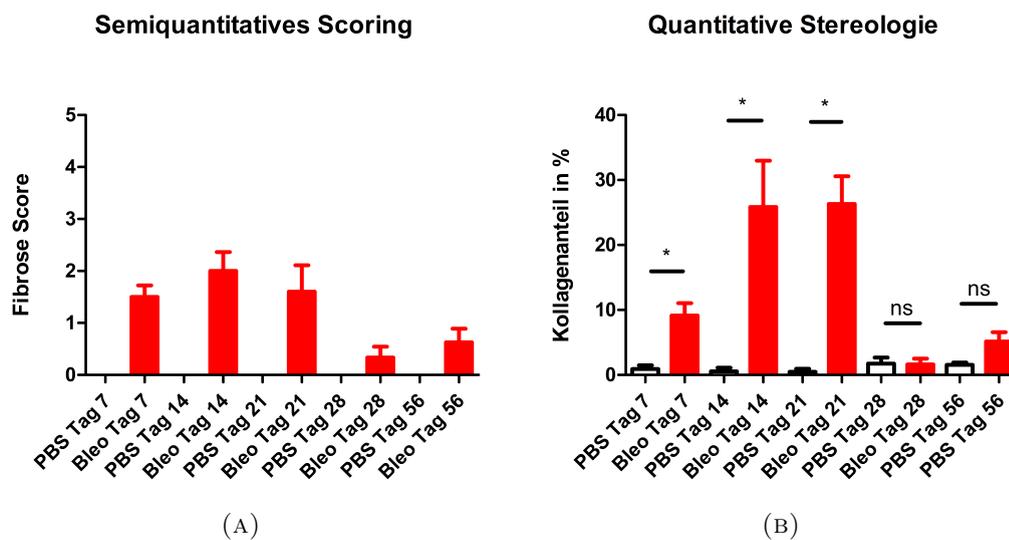


ABBILDUNG 4.3: (A) Semiquantitative Morphologie, Fibrose Scoring (B) Quantitative morphologische Untersuchung (newCAST). Anteil kollagener Alveolarsepten in Relation zum Gesamtalveolargewebe. Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Auswertung der stereologischen Untersuchung mittels newCAST, ergab in der single-Lufu-Gruppe an Versuchstag sieben eine signifikante Erhöhung des Anteils kollagener Alveolarsepten auf $9,167 \pm 1,883$ % bei den Bleomycin-Tieren gegenüber $0,9250 \pm 0,5437$ % bei den PBS-behandelten Mäusen. An Versuchstag 14 wurden $25,84 \pm 7,148$ % (Bleomycin) gegenüber $0,5667 \pm 0,5667$ % (PBS) ermittelt und an Versuchstag 21 $26,33 \pm 4,265$ % im Vergleich zu $0,4750 \pm 0,4750$ % bei den PBS-behandelten Mäusen. An den Versuchstagen 28 und 56 bestanden jeweils nur noch geringe Unterschiede, die sich als nicht signifikant erwiesen.

In der repetitive-LuFu-Gruppe war an Tag 56 ebenfalls kein signifikanter Unterschied des Kollagenanteils, zwischen den Tieren der Bleomycin-Gruppe und den Kontrolltieren, feststellbar. Abbildung 4.4 zeigt den errechneten Anteil kollagener Alveolarsepten der Kontroll- und Versuchstiere, die repetitive Lungenfunktionsmessungen erhielten.

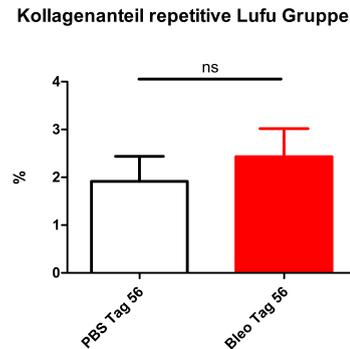


ABBILDUNG 4.4: Quantitative stereologische Untersuchung (newCAST). Anteil Kollagener Alveolarsepten in Relation zum Gesamtalveolargewebe. PBS = $1,914 \pm 0,5248$ % (n=7), Bleo = $2,431 \pm 0,5869$ % (n=16). Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.1.2 Lungenfunktionsmessung

Patienten mit einer Pulmonalen Fibrose weisen in der Regel in der Lungenfunktionsdiagnostik eine restriktive Ventilationsstörung auf (siehe 1.4). Diese spiegelt sich insbesondere in einer Verminderung der Vitalkapazität (VC), der totalen Lungenkapazität (TLC) und der Compliance (C) wider. Der Tiffenau-Index ist in der Regel unverändert oder sogar erhöht, da sich Vitalkapazität und FEV_1 etwa gleichsinnig verringern (siehe 1.4). Im Gegensatz zu obstruktiven Ventilationsstörungen, wie z.B. der COPD, sind der Atemfluss und die Resistance der zentralen Atemwege (R_n) weitestgehend unbeeinträchtigt [81]. Auch die dynamische Resistance (R) als Maß für die Lungenkonstriktion, spielt für die klinische Diagnose der Lungenfibrose beim Menschen kaum eine Rolle. Im Maus-Modell konnte jedoch eine Erhöhung der Resistance nach Bleomycin-Applikation nachgewiesen werden [77].

4.1.2.1 Single-Lufu-Gruppe

Abbildung 4.5 zeigt die Ergebnisse der Lungenfunktionsprüfung bei den Tieren der single-Lufu-Gruppe. An den einzelnen Versuchstagen wurden jeweils die Lungenfunktionsparameter der PBS-behandelten Tiere mit denen der Bleomycin-Tiere verglichen und mittels Mann Whitney Test auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

Die deutlichsten Differenzen zwischen Tieren der Bleomycin- und der PBS-behandelten Gruppe ließen sich dabei an der Compliance (C), Resistance (R) und der Inspiratory

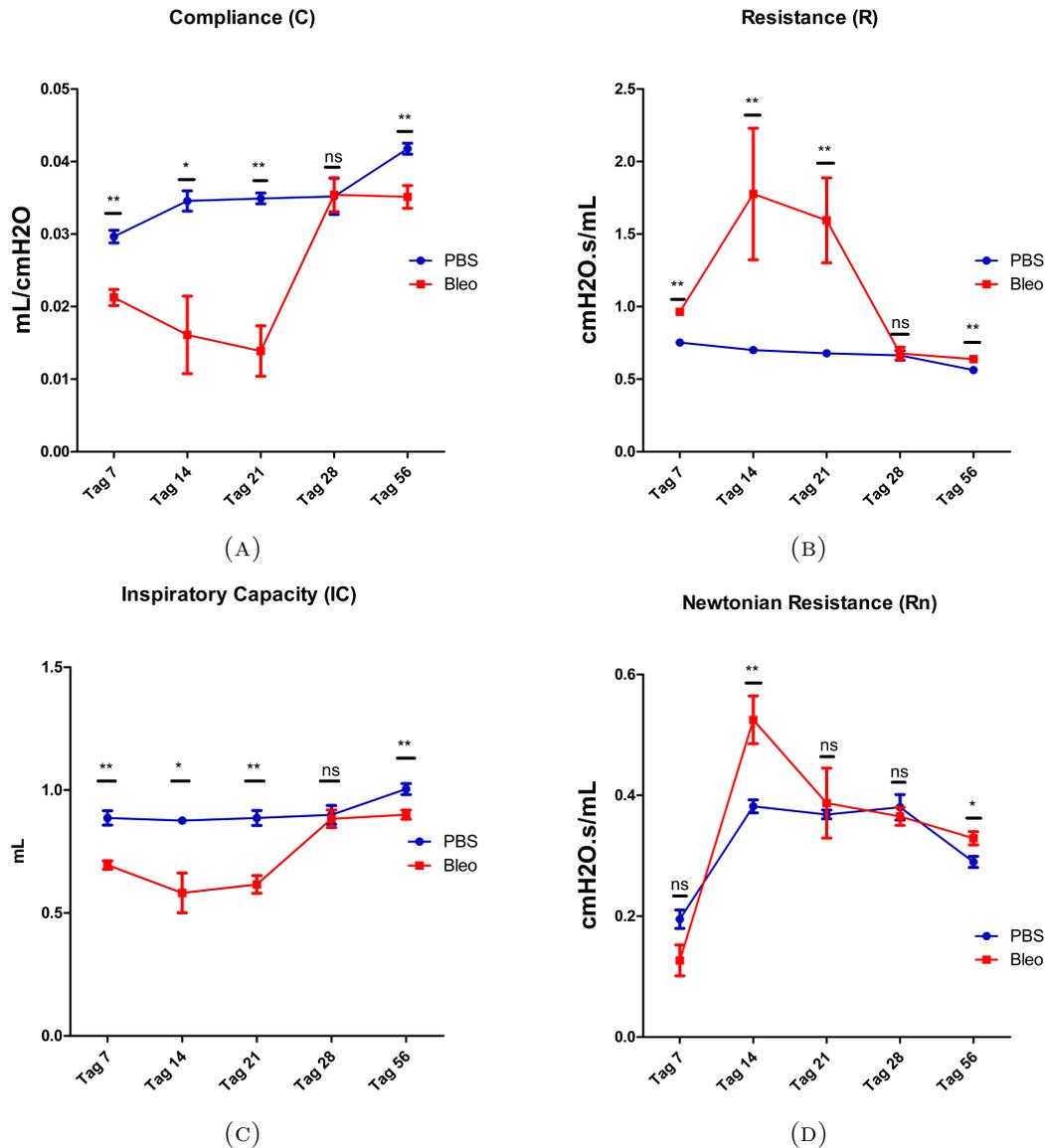


ABBILDUNG 4.5: Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Capacity (IC) ablesen. Bereits an Versuchstag sieben war die Compliance der Bleomycin-Tiere, mit $0,02126 \pm 0,001105$ mL/cmH₂O (n=5) gegenüber den PBS-Tieren mit $0,02966 \pm 0,0008759$ mL/cmH₂O (n=5), signifikant vermindert. An Versuchstag 14 war eine weitere Abnahme der Compliance zu beobachten und an Versuchstag 21 zeigten sich schließlich die niedrigsten Compliance-Werte mit $0,01388 \pm 0,003468$ mL/cmH₂O (n=4) bei den Bleomycin-Tieren gegenüber $0,03491 \pm 0,0007378$ mL/cmH₂O (n=6) bei der Kontroll-Gruppe.

Bezug nehmend auf die histologischen Beobachtungen (4.1) und die Ergebnisse der morphologischen und stereologischen Untersuchung (siehe 4.1.1.1), ist hier eine enge Korrelation zu den Messergebnissen der Compliance erkennbar.

Die Werte der Resistance (R) verhielten sich im Wesentlichen gegenläufig zu den Compliance-Werten. Die höchsten durchschnittlichen Resistance-Messungen bei den Bleomycin-behandelten Mäusen ergaben sich jedoch bereits für Tag 14 mit $1,776 \pm 0,4534$ cmH₂O.s/ml gegenüber $0,7002 \pm 0,02395$ bei den PBS-behandelten Tieren. Auch hier lassen sich die Werte der Lungenfunktionsmessung mit der histologisch sichtbaren Fibroseentwicklung korrelieren.

Signifikante Unterschiede zwischen Bleomycin- und Kontroll-Tieren, waren auch an den Werten der Inspiratory Capacity (IC) zu erkennen. An den Versuchstagen 7, 14 und 21 konnte eine signifikante Abnahme der inspiratorischen Kapazität beobachtet werden, die erst an Tag 28 auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Die Resistance der zentralen Atemwege (R_n), wies unterdessen einen schwankenden Verlauf auf.

Die ausführlichen Werte der Lungenfunktionsmessungen inklusive statistischer Auswertung sind den Tabellen in Anhang B.1 zu entnehmen.

4.1.2.2 Repetitive-LuFu-Gruppe

Die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen in der repetitive-LuFu-Gruppe zeigten einen ähnlichen Trend wie die in der single-Lufu-Gruppe, wobei die Varianzen und Standardabweichungen der repetitiven Messungen deutlich geringer waren und sich insgesamt ein homogenerer Verlauf darstellte.

Die größten funktionellen Unterschiede zwischen Bleomycin- und PBS-Tieren ließen sich wiederum bei der Compliance feststellen. Bereits an Versuchstag sieben war mit 0.02542 ± 0.0007156 mL/cmH₂O bei den Bleomycin-Tieren (n=15) im Vergleich zu 0.03383 ± 0.001147 mL/cmH₂O bei den PBS-behandelten Mäusen (n=8) eine dreifach signifikante Verminderung dieses Funktionsparameters sichtbar (p < 0.0001). Interessanterweise konnte schon ab Versuchstag 14 eine langsame Zunahme der Compliance beobachtet werden, wobei erst an Tag 28 das Ausgangsniveau der Messungen erreicht und auch überschritten wurde. Im Gegensatz zur single-Lufu-Gruppe, bestanden ab Tag sieben, über die gesamte Dauer der Untersuchung hinweg, signifikante Unterschiede der Compliance zwischen Bleomycin- und PBS-Tieren.

Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse der repetitiven Lungenfunktionsmessungen für die Parameter Compliance, Resistance, Elastance und Newtonian Resistance. Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse ist in Anhang B.2 enthalten.

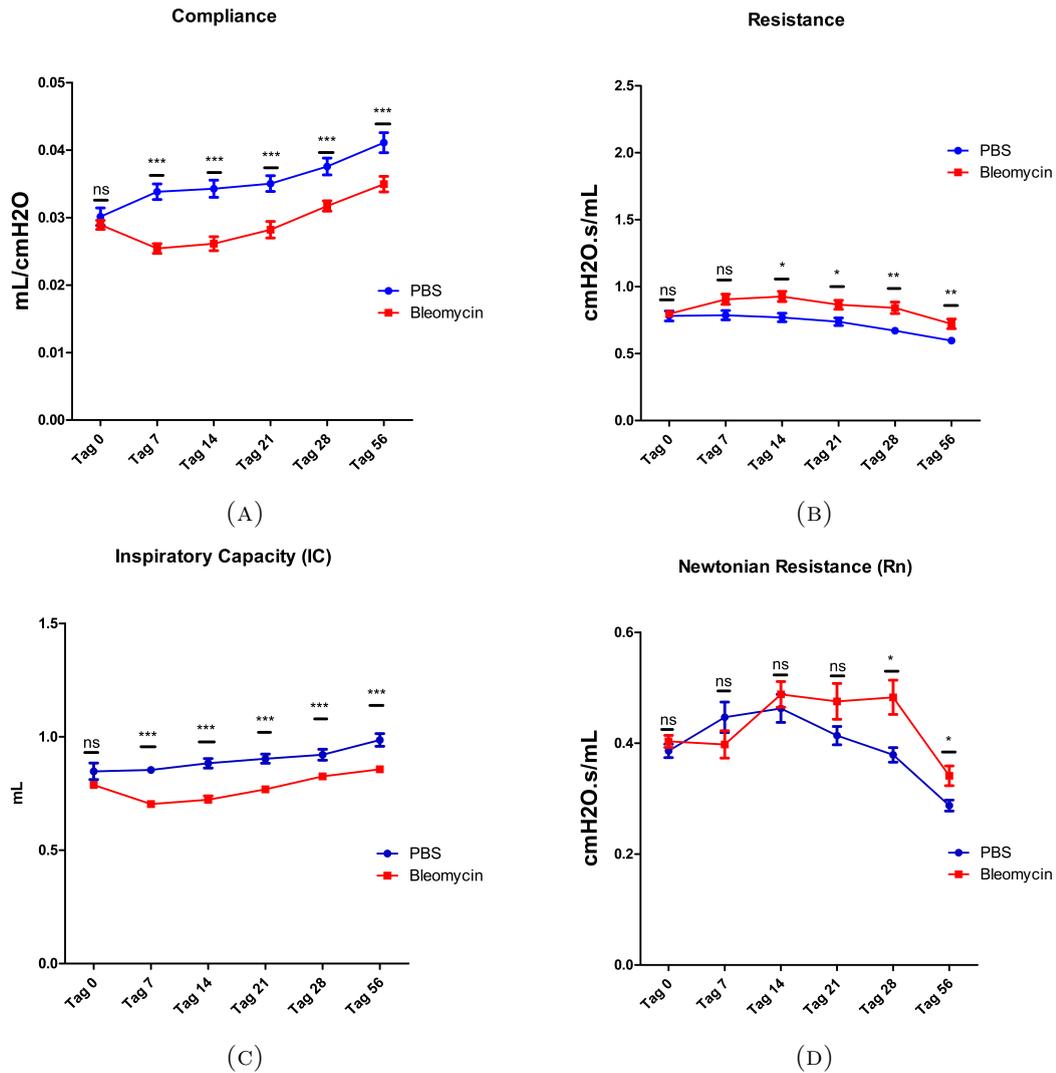


ABBILDUNG 4.6: Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.1.3 Zellzahlen in der Bronchoalveolären Lavage

Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) spielt in der Diagnostik der idiopathischen Lungenerkrankung beim Menschen eine eher sekundäre Rolle [97]. Als charakteristisch jedoch nicht spezifisch für die IPF, ist am ehesten eine milde Erhöhung der neutrophilen und

eosinophilen Granulozyten zu betrachten [88]. In einigen Fällen kann außerdem eine geringgradige Erhöhung der Lymphozyten beobachtet werden. Eine ausgeprägtere Lymphozytose spricht eher für die Diagnose einer exogen allergischen Alveolitis oder anderer ILDs. Es fanden sich Hinweise darauf, dass die prozentuale Erhöhung der neutrophilen Granulozyten möglicherweise mit einer frühen Mortalität bei IPF-Patienten einhergeht [64]. Der prognostische Wert dieser Erkenntnis ist derzeit jedoch noch unklar. Eine BAL wird am ehesten als Ausschlussdiagnostik anderer ILDs durchgeführt [90].

Im Bleomycin-Modell kommt der BAL insofern eine Bedeutung zu, als dass in der Frühphase nach Bleomycin-Applikation (nach etwa drei bis sieben Tagen) eine Entzündungsreaktion in den Lungen der Mäuse einsetzt, die gewöhnlich mit einer Erhöhung der BAL-Zellzahlen einhergeht. In späteren Phasen der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose kann häufig eine ausgeprägte Neutrophilie beobachtet werden [54][85]. Entsprechend

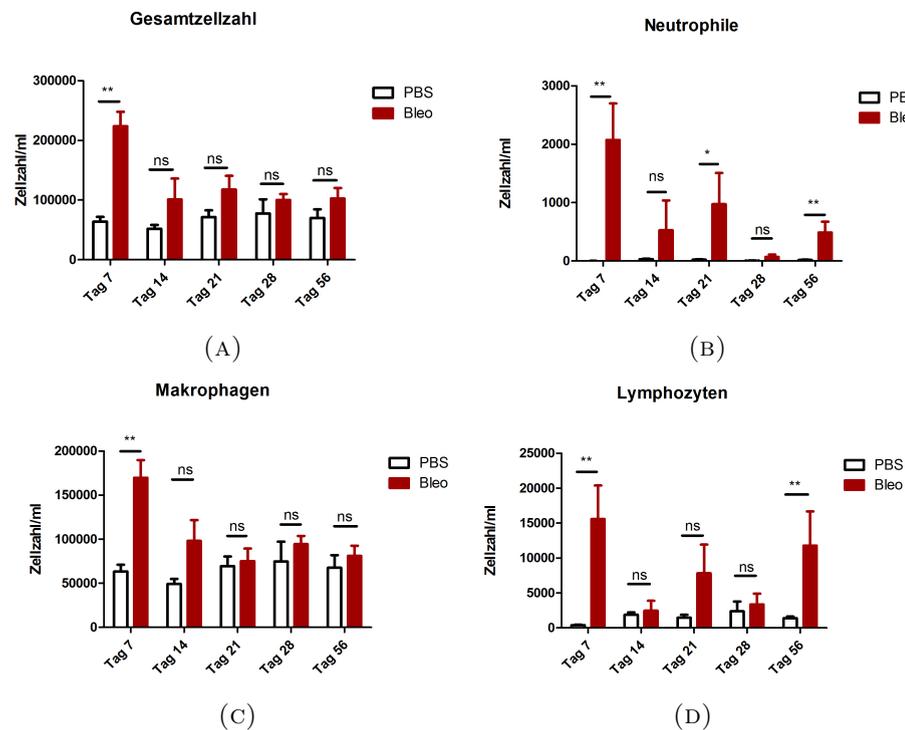


ABBILDUNG 4.7: Absolute Zellzahlen der Bronchoalveolären Lavage. Bei den Tieren der Bleomycin-behandelte Gruppe ist über den gesamten Versuchszeitraum eine unspezifische Erhöhung der Zellzahlen in der BAL sichtbar (A). Signifikante Unterschiede bestanden bei allen Zellarten und der Gesamtzellzahl an Versuchstag sieben. Danach wiesen lediglich die neutrophilen Granulozyten an den Versuchstagen 21 und 56 sowie die Lymphozyten an Tag 56 signifikante Erhöhungen auf, verglichen mit den Werten der PBS-behandelten Mäuse. Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

war auch in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied der Gesamtzellzahlen in der BAL an Versuchstag sieben zu beobachten, während an den übrigen Versuchstagen leichte

Unterschiede bestanden, diese jedoch keine Signifikanzen mehr aufwiesen. Lediglich die Zellzahlen der Neutrophilen zeigten auch an den Versuchstagen 21 und 56 noch eine signifikante Erhöhung bei den Bleomycin-behandelten Mäusen im Vergleich zu den PBS-Tieren. Interessanterweise war an Tag 56 außerdem eine signifikante Erhöhung der Lymphozyten bei den Bleomycin-Tieren zu beobachten.

Abbildung 4.7 zeigt die ermittelten, absoluten Zellzahlen der BAL.

4.2 Realtime PCR

Um einen Eindruck der molekulargenetischen Veränderungen im Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu gewinnen, wurde an den Versuchstagen 7, 21 und 56 die Expression verschiedener Gene mittels qPCR bei den Tieren der single-Lufu-Gruppe untersucht (siehe 4.2).

Nachdem ein wesentlicher Marker der Fibroseentwicklung die Zunahme von Kollagen 1 in der Lunge ist, empfahl sich die Messung der Genexpression von Col1a, das für Kollagen 1 kodiert. An Versuchstag 7 war bereits eine deutliche Hochregulierung von Col1a bei den Bleomycin-Mäusen zu beobachten ($p=0,0152$), die an Tag 21, analog zum erhöhten Grad der Fibrose, noch weiter zunahm ($p=0,0095$). Die Expression von Col1a an Tag 56 entsprach der der PBS-Kontrollgruppe und befand sich damit im Normbereich.

Des Weiteren wurde Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) untersucht. Es handelt sich dabei um ein Protein aus der Strukturfamilie der Serpine, das als Hemmstoff von Urokinase und tPA (tissue Plasminogen activator) fungiert. Beides sind Enzyme der Blutgerinnung bzw. der Fibrinolyse. Es wird inzwischen eine antifibrotische Wirkung von PAI-1 angenommen, da Fibroblasten in fibrotischen Lungen von Mäusen und Menschen, in Anwesenheit von PAI-1, eine erniedrigte bzw. in dessen Abwesenheit eine erhöhte Proliferation zeigen [80].

Übereinstimmend mit diesen Annahmen, konnte an Versuchstag 21, im Stadium der ausgeprägtesten Fibrose, eine signifikante Verminderung ($p=0,0095$) der Expression von PAI-1 in den Lungen der single-Lufu Tiere nach Bleomycin-Instillation nachgewiesen werden. Interessanterweise war an Versuchstag sieben bei den Bleomycin-Tieren eine signifikante *Erhöhung* der Expression von PAI-1, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu beobachten ($p=0,0043$). An Versuchstag 56 war keinerlei Unterschied mehr zwischen PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen zu detektieren.

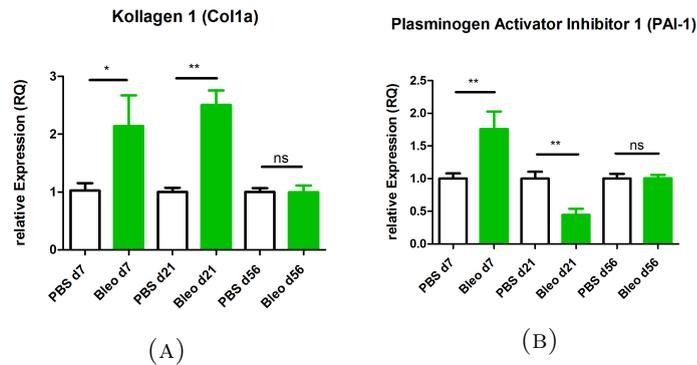


ABBILDUNG 4.8: Relative Genexpression von Col1 (A) und PAI-1 (B) zum Haushaltsgen HPRT, normalisiert auf PBS. An Versuchstag sieben ist eine signifikante Erhöhung der Genexpression von Col1a und PAI-1 bei den Bleomycin-behandelten Mäusen erkennbar. Tag 21 zeigte weiterhin eine signifikante Erhöhung von Col1a und gleichzeitig eine Verminderung der Expression von PAI-1. Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Protein Arginin Methyltransferasen (PRMT) mRNA Expression Level

Nachdem sich die Hinweise darauf mehren, dass die posttranslationale Protein Arginin Methylierung in der Pathogenese verschiedener Lungenerkrankungen eine wichtige Rolle spielt [136], war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, das Verhalten von PRMTs im Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose näher zu untersuchen. In Hinblick auf die Erkenntnisse von O'Brien et al., dass alveoläre Epithelzellen bei PRMT4/CARM1-defizienten Mäusen (CARM1^{+/-}) eine Hyperproliferation und fehlerhafte Differenzierung zeigen, stand dabei insbesondere CARM1 im Fokus des Interesses der Untersuchungen.

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse der qPCR für die PRMTs 1-8.

Die Veränderungen der Gen-Expression von PRMTs scheinen bei der Bleomycin-induzierten Fibrose in diesem Versuch auf den ersten Blick relativ unspezifisch. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch auf, dass die Gen-Expression der PRMTs bei den Bleomycin-behandelten Mäusen gegenüber den PBS-Kontrollen an Versuchstag sieben fast ausnahmslos signifikant vermindert war. Lediglich PRMT1 und PRMT7 zeigten hier keine signifikanten Änderungen.

Abgesehen von Versuchstag sieben war sowohl an Tag 21 bei PRMT2 und PRMT8 als auch an Tag 56 bei PRMT4/CARM1 jeweils eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression zu beobachten. Obgleich PRMT1 den Großteil aller Protein Arginin Methylierungen katalysiert und ubiquitär im Gewebe vorkommt [119], fanden sich in dessen Genexpression im Lungengewebe der Bleomycin-behandelten Mäuse zu keinem

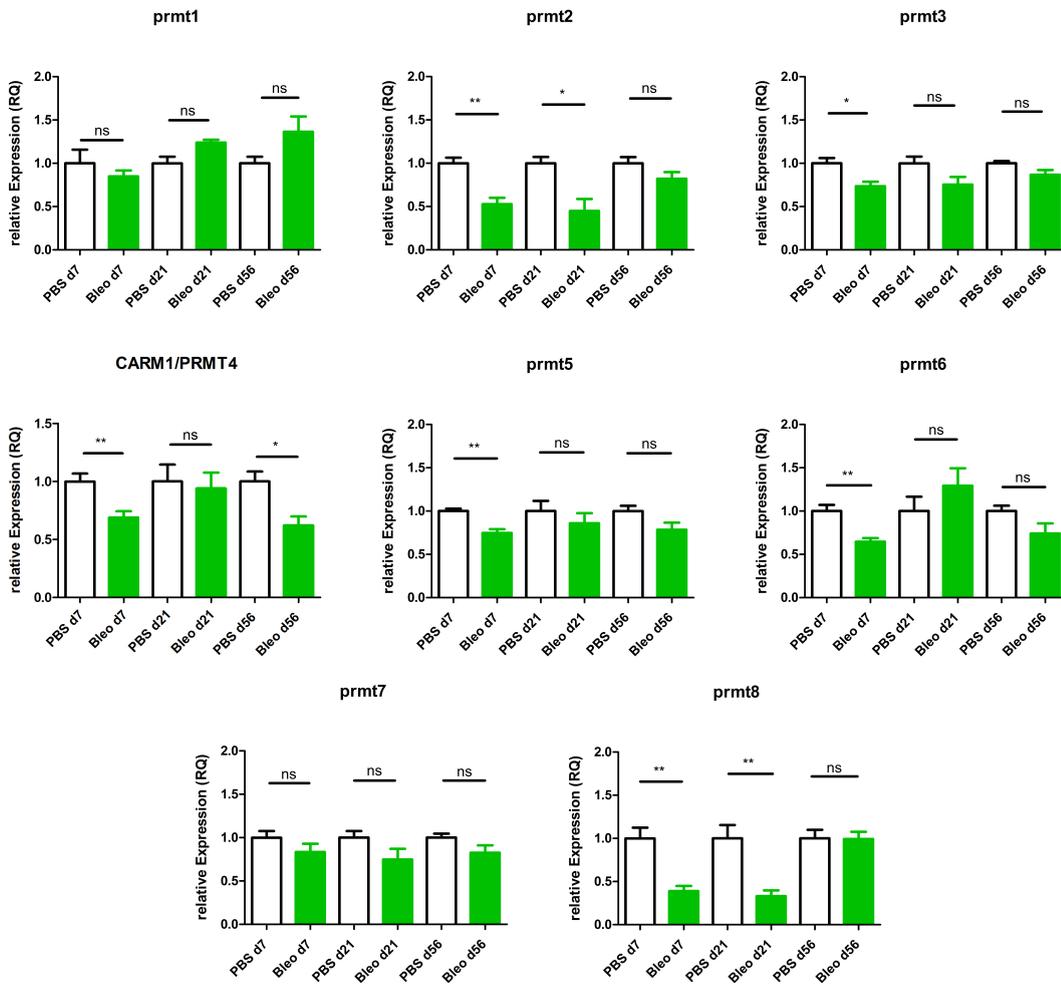


ABBILDUNG 4.9: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR. Auswertung mittels Mann Whitney Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Zeitpunkt signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Werten der PBS-Kontrollgruppe.

4.3 Bleomycin-induzierte Fibrose bei CARM1^{+/-} Mäusen

In einem weiteren Versuch wurde der Verlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose bei heterozygoten CARM1-Knockout-Mäusen (CARM1^{+/-}) beobachtet, um Rückschlüsse auf die Rolle des CARM1-Enzyms in der pulmonalen Fibroseentwicklung ziehen zu können. Nachdem CARM1 offenbar wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung und das Verhalten alveolärer Epithelzellen [89] nimmt und diese wiederum eine zentrale Rolle für die Entwicklung einer IPF, sowie auch der Bleomycin-induzierten Fibrose zu spielen scheinen [108], wäre von Interesse, ob sich die Abwesenheit bzw. die verminderte Expression von

CARM1 signifikant auf die Entwicklung der Bleomycin-induzierten Fibrose auswirkt. Wie in 1.3 beschrieben, liegt eine Besonderheit des Bleomycin-Modelles mit einmaliger, intratrachealer Instillation darin, dass sich die fibrotischen Veränderungen nach drei bis vier Wochen zurückbilden. In der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit (4.1.1) hatte bereits an Versuchstag 28 kaum noch fibrotisches Gewebe in den Lungen der Bleomycin-behandelten Mäuse nachgewiesen werden können, während an Versuchstag 21 eine manifeste Lungenfibrose zu beobachten gewesen war (4.1.1). Diese Entwicklung spiegelte sich auch in den lungenfunktionellen Parametern wider (4.1). Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen lag in der CARM1 Versuchsreihe der Fokus auf den Versuchstagen 21 und 28. Im Folgenden sollen die Ergebnisse aus Histologie und Lungenfunktion der Wildtyp vs. CARM1^{+/-} Versuchsreihe dargestellt werden.

4.3.1 Western Blot

Zu Beginn des Experimentes wurde die Proteinmenge von CARM1 bei Wildtyp und CARM1^{+/-}-Mäusen bestimmt. Als Ladekontrolle diente β -actin. Wie an Abbildung 4.10 erkennbar, konnte nachgewiesen werden, dass die CARM1^{+/-}-Mäuse deutlich geringere Proteinmengen CARM1 zeigten, als die Wildtyp-Tiere. Die Synthese von CARM1 war folglich bei den heterozygoten-Tieren signifikant herunterreguliert.

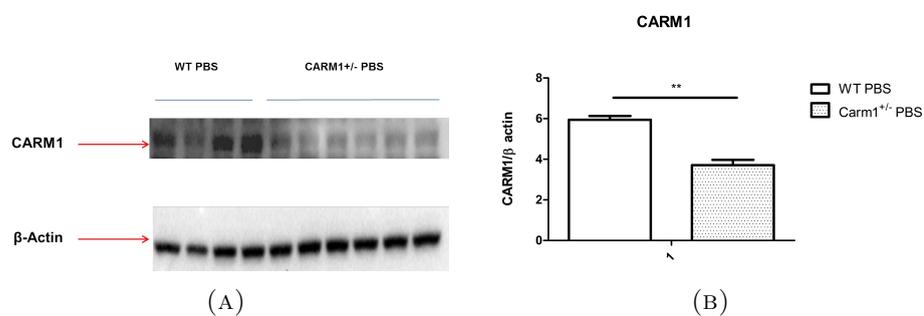


ABBILDUNG 4.10: Western Blot von Wildtyp- im Vergleich zu CARM1^{+/-}-Mäusen. (A) Proteinbanden von CARM1 und β -actin (B) Proteinmenge von CARM1 im Verhältnis zu β -actin. Auswertung mittels Mann Whitney Test; ** p < 0,01;

4.3.2 Histologie

Ähnlich zu den Ergebnissen aus 4.1.1 entwickelten die Mäuse 21 Tage nach Bleomycin-Applikation histologisch eine dichte Lungenfibrose. Der Grad der Fibrosierung imponierte bei den $CARM1^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen tendenziell stärker. Allerdings waren bei einigen der Wildtyp-Mäuse keinerlei fibrotischen Veränderungen zu beobachten.

An Versuchstag 28 zeigten sich bei den Wildtyp-Tieren, ähnlich wie in der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit, insgesamt eine Auflösung der fibrotischen Veränderungen, jedoch wiesen einige der $CARM1^{+/-}$ Mäuse auch an diesem Versuchstag noch eine ausgeprägte Fibrose auf. Einen Eindruck über die histologischen Veränderungen verschafft Abbildung 4.11.

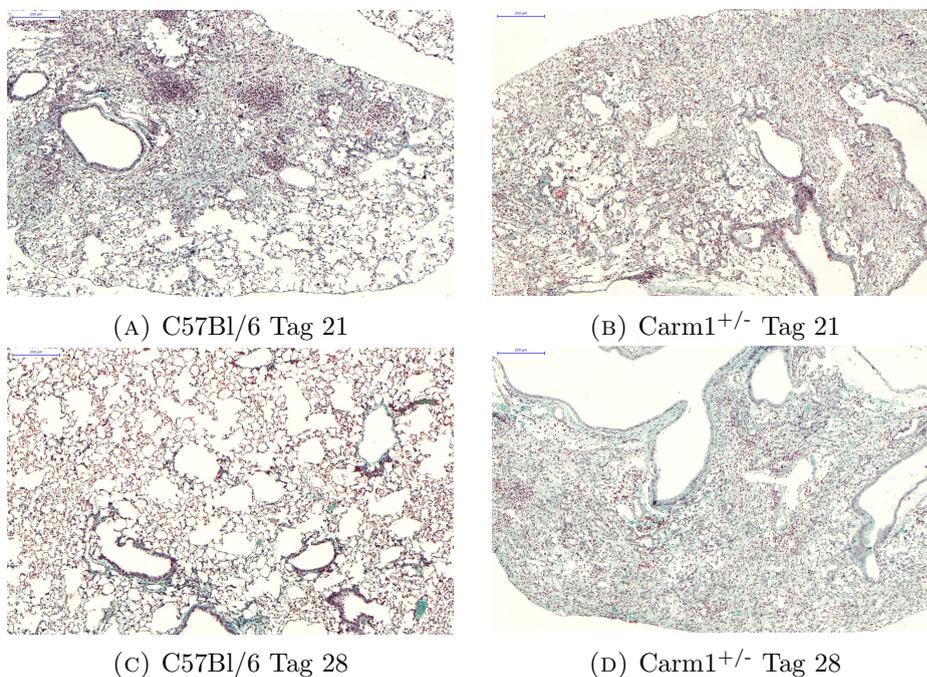


ABBILDUNG 4.11: Histologie Wildtyp (C57Bl/6) (A+C) und $CARM1^{+/-}$ (B+D) 21 und 28 Tage nach Bleomycin-Instillation

Quantitative Stereologie

Die quantitative stereologische Untersuchung der histologischen Schnittbilder mittels newCAST erfolgte identisch wie in der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit (3.3.3).

Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse der newCAST-Analyse von Tag 21 und 28. Es ist

erkennbar, dass der Kollagenanteil bei den $CARM1^{+/-}$ -Tieren nach Bleomycin-Instillation jeweils höher war, als bei den Wildtyp-Tieren. Ein deutlicher Unterschied mit statistischer Signifikanz zwischen diesen beiden Gruppen bestand jedoch nur an Tag 28.

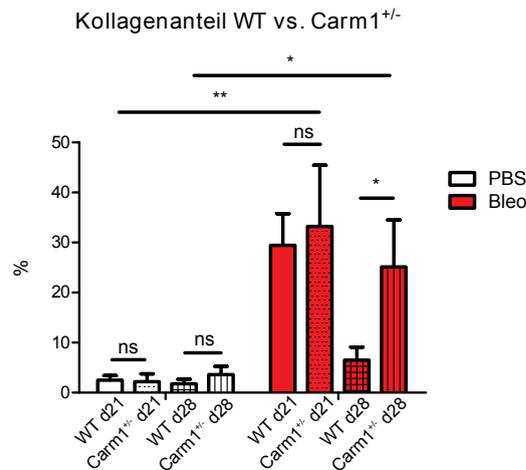


ABBILDUNG 4.12: Quantitative stereologische Untersuchung (newCAST). Anteil kollagener Alveolarsepten in Relation zum Gesamtalveolargewebe. Auswertung mittels two-way ANOVA Test, ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.3 Lungenfunktion

Ferner wurden in dieser Versuchsreihe einmalige Lungenfunktionsmessungen an Tag 21 und 28 nach Instillation durchgeführt.

Nachdem in der Lufu-Versuchsreihe (4.1) zwischen dem histologischen Ausmaß der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und insbesondere den Funktionsparametern Compliance (C) und Inspiratory Capacity (IC) eine Korrelation bestanden hatte, wurden speziell diese beiden Parameter auch hier zur Beurteilung herangezogen. Abbildung 4.13 lässt erkennen, dass an Versuchstag 21 Compliance und Inspiratory Capacity der Bleomycin-behandelten Wildtyp-Mäuse im Vergleich zur PBS-Gruppe deutlich vermindert waren, wie es auch schon in der Lufu-Versuchsreihe zu beobachten gewesen war. Bei den $CARM1^{+/-}$ -Mäusen war dieser Unterschied weniger deutlich. Allerdings schien zwischen den Wildtyp und $CARM1^{+/-}$ -Mäusen hier ein grundsätzlicher Unterschied der Lungenfunktion zu bestehen. Sowohl die PBS- als auch die Bleomycin-behandelte $CARM1^{+/-}$ -Mäuse zeigten tendenziell höhere Werte für Compliance und Inspiratory Capacity als die Wildtyp-Mäuse.

Dieser Unterschied trat umso deutlicher an Versuchstag 28 hervor. Obgleich histologisch eine Differenz des Fibrosegrades zwischen Bleomycin-behandelten Wildtyp- und

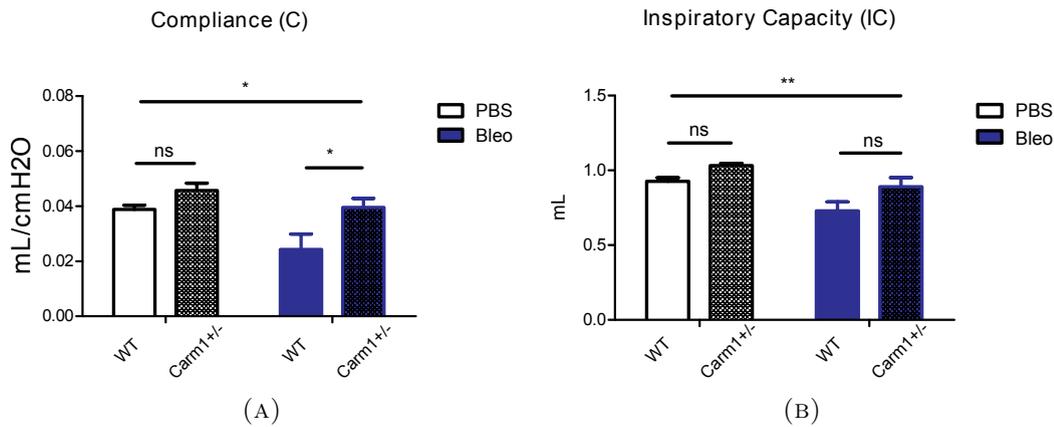


ABBILDUNG 4.13: Compliance (A) und Inspiratory Capacity (B) bei Wildtyp und CARM1^{+/-}-Mäusen 21 Tage nach Bleomycin- bzw. PBS-Instillation. Auswertung mittels two-way ANOVA Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

CARM1^{+/-}-Mäusen sichtbar war (siehe Abbildung 4.12), stellten sich lungenfunktio-
nell hier augenscheinlich keine relevanten Abweichungen dar. Betrachtet man jedoch
die PBS-behandelten Mäuse, so fällt eine signifikante Differenz der Compliance und
Inspiratory Capacity zwischen den Wildtyp- und CARM1^{+/-}-Mäusen auf. Es müssen
folglich unterschiedliche Ausgangswerte der Lungenfunktion angenommen werden. Um

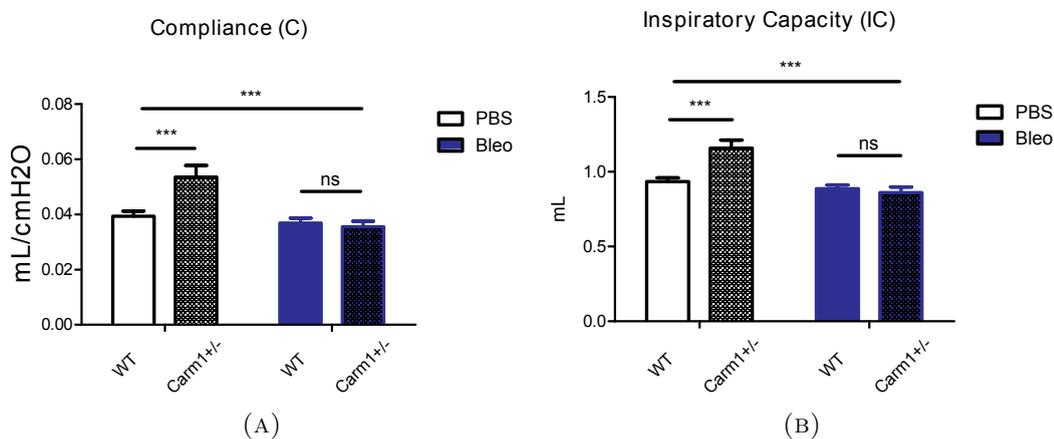


ABBILDUNG 4.14: Compliance (A) und Inspiratory Capacity (B) bei Wildtyp und Carm1^{+/-} Mäusen 28 Tage nach Bleomycin- bzw. PBS-Instillation. Auswertung mittels two-way ANOVA Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

die Relationen zu korrigieren, ist es in diesem Falle sinnvoll, die Ergebnisse der Lun-
genfunktionsmessung jeweils auf die der PBS-behandelten Tiere desselben Genotyps zu
normalisieren. Konkret wurden zu diesem Zweck die Ergebnisse der Lungenfunktion
($Parameter_x = P_x$) von Wildtyp- und CARM1^{+/-}-Mäusen durch den Mittelwert des

entsprechenden Parameters der PBS-behandelten Mäuse ($=P_xMW_{PBS}$) des jeweils selben Genotyps ($=G_y$) geteilt ($norm.Parameter_x von G_y = \frac{P_x G_y}{P_x MW_{PBS} G_y}$). Abbildung 4.15 zeigt die normalisierten Daten der Messwerte von Compliance und Inspiratory Capacity beider Versuchstage.

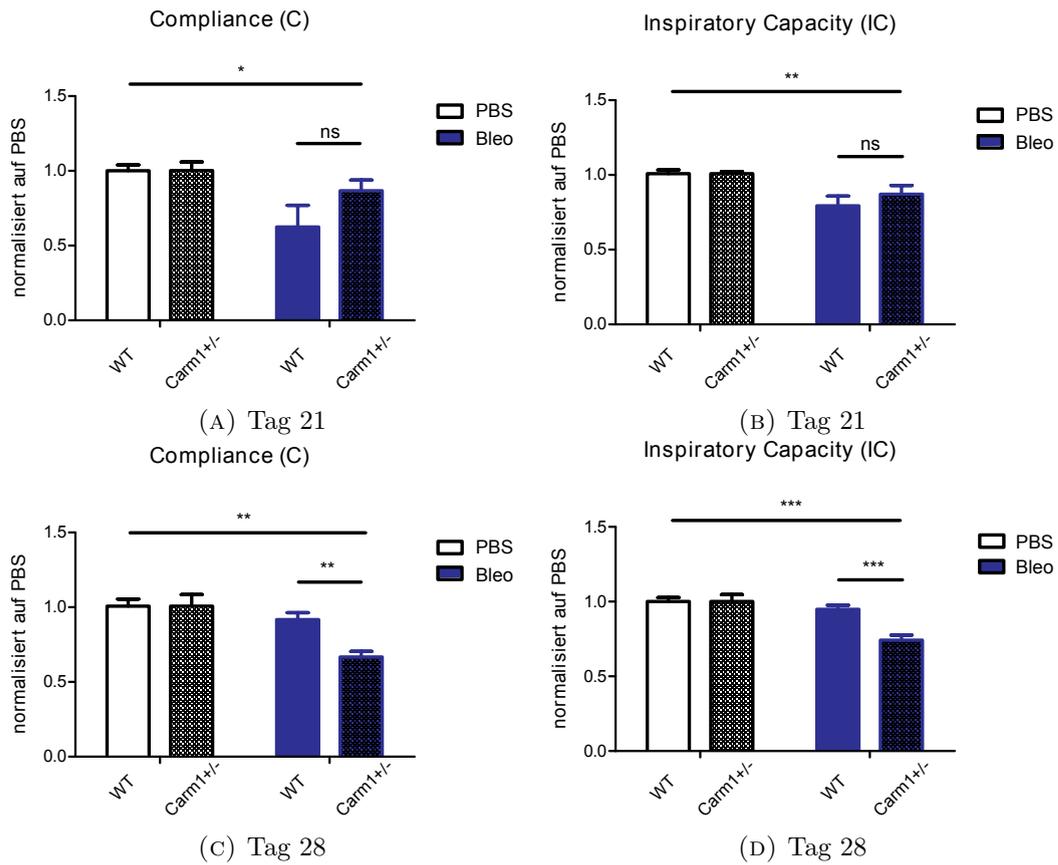


ABBILDUNG 4.15: Auf PBS normalisierte Werte von Compliance und Inspiratory Capacity bei Wildtyp und CARM1^{+/-}-Mäusen 21 und 28 Tage nach Bleomycin- bzw. PBS-Instillation. Auswertung mittels two-way ANOVA Test; ns (nicht signifikant) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tatsächlich ließ sich nun insbesondere an Versuchstag 28 eine, in Relation zu den Messwerten der PBS-Tiere, signifikante Minderung von Compliance ($p < 0.01$) und Inspiratory Capacity ($p < 0.001$) der CARM1^{+/-}-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen erkennen. Diese Beobachtung ist vor allem in Hinblick auf die Ergebnisse aus Histologie und stereologischer Untersuchung nachvollziehbar. Offenbar weisen die CARM1^{+/-}-Mäuse einen prolongierten Krankheitsverlauf nach Bleomycin-Instillation auf.

Kapitel 5

Diskussion

Bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) handelt es sich um eine schwere Erkrankung, mit oftmals dramatischem Verlauf. Weder die Ätiologie noch die Pathogenese der IPF konnten bis zum heutigen Tag befriedigend geklärt werden.

Das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen, wird vielfach zur Erforschung der Pathomechanismen der IPF herangezogen und weist einige Ähnlichkeiten mit den Charakteristika der Erkrankung beim Menschen auf, sodass es aktuell als das relevanteste Krankheitsmodell gilt (vergleiche Reviews von Moore [85] und Moeller [84]). Eine Schwäche des Modelles in der aktuellen Anwendungspraxis besteht jedoch darin, dass eine Verlaufsbeobachtung der Krankheitsentwicklung unter funktionell, physiologischen Gesichtspunkten kaum möglich ist.

Hat die Lungenfunktionsmessung beim Menschen schon lange einen erheblichen Stellenwert, um den Krankheitsverlauf der IPF zu quantifizieren und Aussagen über die Überlebensprognose zu treffen (siehe 1.4), so wird sie im Bleomycin-Modell erst seit einigen Jahren angewendet. Die Anwendung beschränkte sich dabei allerdings bisher auf einmalige Messungen, die zwar ein gewisses Maß an Informationszugewinn bedeuten, jedoch stets nur Momentaufnahmen liefern können. Der wertvollste Aspekt der Lungenfunktionsmessung, die Beobachtung der Dynamik relevanter Parameter im Zeitverlauf, bleibt dabei unberücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wird, unseres Wissens nach erstmals, die repetitive Lungenfunktionsmessung durch Intubation, als praktikables Werkzeug zum Krankheitsmonitoring der Lungenfibrose bei Mäusen, im Rahmen des Bleomycin-Modelles vorgestellt.

Um die Daten der repetitiven Lungenfunktionsmessungen mit dem histologischen Verlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose korrelieren zu können, wurden parallel zwei Versuchsgruppen beobachtet. Alle Mäuse erhielten zu Beginn des Versuches 5U/Kg/KG Bleomycin, bzw. eine äquivalente Dosis Kochsalzlösung (PBS=Phosphate buffered Saline) intratracheal instilliert. Bei den Mäusen der single-Lufu-Gruppe wurde an den einzelnen Versuchstagen (Tag sieben, 14, 21, 28 und 56 nach Instillation) nun einmalig die Lungenfunktion mittels FlexiVent[™] gemessen, eine BAL durchgeführt und die Lunge anschließend zur histologischen Aufbereitung und RNA-Extraktion entnommen. Die Mäuse der repetitive-Lufu-Gruppe hingegen, wurden an jedem der Versuchstage einer Lungenfunktionsmessung unterzogen und erst am letzten Versuchstag, zum Zweck der BAL-Gewinnung und Lungenentnahme, getötet.

Es zeigte sich, dass eine ausgeprägte Korrelation zwischen den Ergebnissen der einmaligen Lungenfunktionsmessungen und dem histologisch sichtbaren Ausmaß der Lungenfibrose besteht. Mit zunehmender Fibrosierung des Lungenparenchyms ließ sich auch eine zunehmende Verschlechterung der Lungenfunktion, gegenüber den gesunden Kontrolltieren feststellen. Diese äußerte sich in einer Abnahme der Lungendehnbarkeit (Compliance=C), einer Zunahme des Strömungswiderstandes der kleinen Atemwege (Resistance=R) und einer Reduzierung der Inspiratorischen Kapazität (Inspiratory Capacity=IC). Zusammengefasst spiegeln diese Ergebnisse die Charakteristika einer restriktiven Ventilationsstörung wider, obgleich zu deren Diagnose beim Menschen häufiger die Vitalkapazität (VC) und die FEV₁ herangezogen werden [103].

Einzig der Strömungswiderstand der zentralen Atemwege (Newtonian Resistance=R_n) wies einen schwankenden Verlauf ohne eindeutig erkennbaren Trend auf. Dieser Umstand lässt sich insofern erklären, als dass die zentralen Atemwege von fibrotischen Veränderungen praktisch nicht betroffen sind. Eine Erhöhung des Strömungswiderstandes in diesem Lungenkompartiment ist, zumindest beim Menschen, eher charakteristisch für obstruktive Ventilationsstörungen wie COPD oder Asthma [121]. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache waren erhebliche Differenzen von R_n zwischen PBS- und Bleomycin-Tieren nicht zu erwarten.

Besonders deutlich trat der Zusammenhang zwischen Fibrose und Lungenfunktion zutage, wenn man die Ergebnisse der stereologischen Untersuchung denen der Lungenfunktionsmessung der einzelnen Mäuse direkt gegenüberstellte. Da alle Mäuse dieses Versuches eine individuelle Identifikationsnummer erhalten hatten, ließen sich im Nachhinein sämtliche Untersuchungsergebnisse der jeweiligen Versuchsmaus zuordnen. Exemplarisch ist

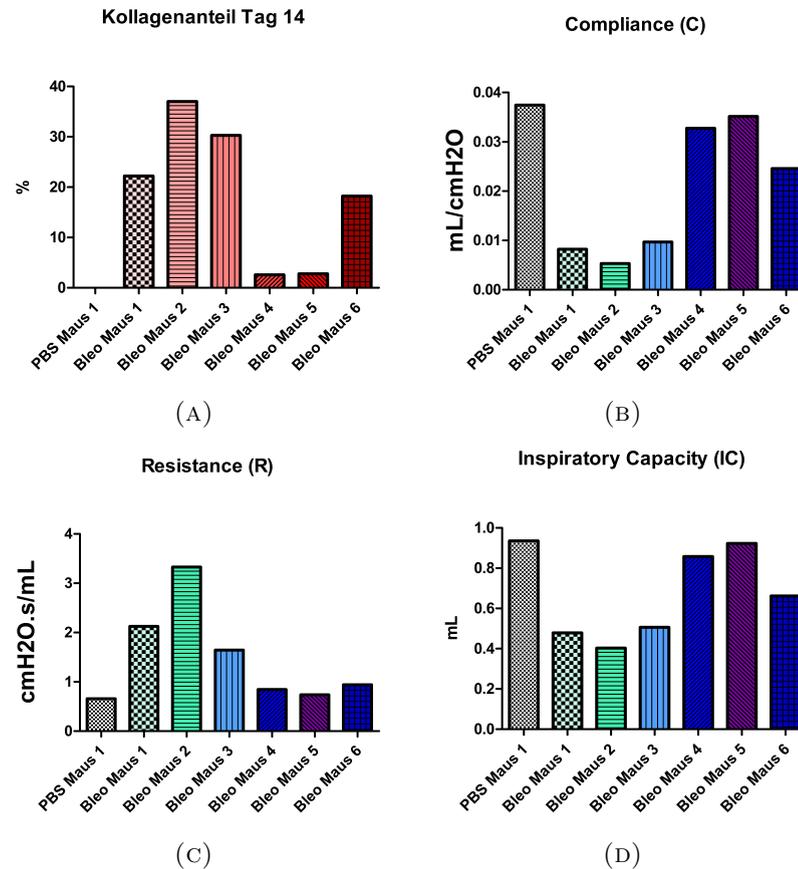


ABBILDUNG 5.1

in Abbildung 5.1 der stereologisch ermittelte Kollagenanteil von sieben Mäusen, die an Versuchstag 14 untersucht wurden, den Ergebnissen der Compliance, Resistance und Inspiratory Capacity derselben Mäuse, desselben Versuchstages gegenübergestellt. An der Abbildung lässt sich erkennen, dass Bleo Maus 2 den höchsten Kollagenanteil aufwies. Mutmaßlich handelte es sich um die Maus mit der am stärksten ausgeprägten Lungenfibrose. Passend dazu waren die Werte der Lungenfunktion bei dieser Maus, im Vergleich zum Kontrolltier (PBS Maus 1), am extremsten verändert. Ganz ähnlich zu einer restriktiven Ventilationsstörung beim Menschen, waren hier die Compliance (C) und die inspiratorische Kapazität (IC) stark erniedrigt, während die Resistance (R) deutlich erhöht war.

Bei den übrigen, abgebildeten Mäusen, zeigte sich eine ähnliche Korrelation zwischen Kollagenanteil und Lungenfunktionsparametern, wobei kein linearer Zusammenhang bestand. Betrachtet man z.B. Bleo Maus 1 und 3, so fällt auf, dass bei Maus 3 ein höherer Kollagenanteil festgestellt wurde als bei Maus 1, die Ergebnisse der Lungenfunktion bei Maus 3 jedoch weniger stark verändert waren.

Eine einfache Erklärung wäre, dass sich die Mäuse in ihrer Größe und körperlichen Konstitution unterschieden, was sich erfahrungsgemäß erheblich auf die Ergebnisse physiologischer Messungen der Lunge auswirken kann [98]. Hier könnte dieser Faktor tatsächlich eine Rolle gespielt haben. Maus 1 wog am Tag der Bleomycin-Instillation 19,8 g, Maus 3 wog 22,0 g. Beide Mäuse verloren infolge der Bleomycin-Instillation und damit verbundenen Krankheitsentwicklung stark an Gewicht, sodass sie an Versuchstag 14 nur noch 14,1 g (Maus 1) bzw. 14,3 g (Maus 3) wogen. Das höhere Ausgangsgewicht von Maus 3 könnte für ein initial kräftigeres Tier sprechen, dessen Lungenfunktion entsprechend höhere Ausgangswerte gehabt hatte.

Unabhängig von solchen naturgemäßen Schwankungen, ist unbestreitbar ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Lungenfibrose und den Ergebnissen der Lungenfunktionsmessung erkennbar. Ähnliche Trends hatten sich bereits in früheren Veröffentlichungen abgezeichnet, bei denen die Lungenfunktionsmessung allerdings mittels Tracheotomie durchgeführt worden waren. So konnten Vanoirbeek et al. in ihrer Arbeit von 2010 zeigen, dass die invasive, im Gegensatz zur non-invasiven Lungenfunktionsmessung, dazu in der Lage ist, relevante funktionell Unterschiede zwischen gesunden Kontrolltieren und solchen mit Asthma oder Fibrose innerhalb entsprechender Krankheitsmodelle zu detektieren [124]. Manali et al. schließlich betrachteten das Bleomycin-Modell im Speziellen und zeigten hier anhand von Lungenfunktionsmessungen mittels FlexiVent™ zu verschiedenen Zeitpunkten, einen signifikanten Zusammenhang zwischen Fibrosegrad und Änderung insbesondere der Elastance (H)[79]. Interessant für weitere zukünftige Ansätze wäre auch die Ergänzung der repetitiven Lungenfunktionsmessungen um sogenannte forced expiration (FE) Messungen, deren populärster und wichtigster Vertreter in der Humanmedizin die FEV₁ ist. So konnten Devos et al. in einer jüngeren Arbeit von 2017 demonstrieren, dass die Ergebnisse von FE Messungen in Maus-Modellen verschiedener Lungenkrankheiten (u.a. Asthma und Lungenfibrose) vergleichbar waren mit der Dynamik der Krankheitsentwicklung beim Menschen [28].

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Verschlechterung der mittels Intubation gemessenen Lungenfunktion, im Sinne der oben beschriebenen Veränderungen (C, R, IC), ein zuverlässiger Indikator für die Schwere der Lungenfibrose im Bleomycin-Modell ist. Es sollte demzufolge möglich sein, durch wiederholte Messungen über einen längeren Zeitraum hinweg, den Krankheitsverlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose an den Lungenfunktionsdaten der einzelnen Tiere abzulesen. Die Ergebnisse der Messungen in der repetitive-Lufu-Gruppe

(siehe 4.1.2.2) bestätigen diese Annahme.

Mit einem ähnlichen Trend wie in der single-Lufu-Gruppe, war bei den Bleomycin-behandelten Tieren nach repetitiven Messungen eine Verschlechterung der Lungenfunktion bis Versuchstag 21, gefolgt von einer Erholung ab Tag 28 zu erkennen. Die deutlichsten Unterschiede zwischen PBS- und Bleomycin-Tieren ließen sich ab Tag sieben nach Instillation, an der Lungendehnbarkeit (C) und der Inspiratorischen Kapazität (IC) ablesen. Die Veränderungen sprachen wiederum für eine restriktive Ventilationsstörung und wiesen damit die Charakteristika der Lungenfibrose auf. Die Ergebnisse der Lungenfunktion von single- und repetitive-Lufu-Gruppe zeigten insgesamt folglich sehr ähnliche Trends, gleichzeitig fielen jedoch in einigen Aspekten Unterschiede auf. In beiden Gruppen war eine Abnahme von Lungendehnbarkeit (C) und Inspiratorischer Kapazität (IC), bei gleichzeitiger Zunahme des Strömungswiderstandes der kleinen Atemwege (R) zu beobachten. In der single-Lufu-Gruppe waren jedoch zum Einen extremere Ausschläge der Messwerte sichtbar, zum Anderen fanden sich die deutlichsten Unterschied zwischen PBS- und Bleomycin-Mäusen an den Tagen 14 bzw. 21. In der repetitive-Lufu-Gruppe dagegen zeigten sich die größten funktionellen Differenzen an den Tagen sieben und 14. Zudem stellte sich der Verlauf der Messwerte wesentlich homogener mit geringeren Standardabweichungen und weniger extremen Ausschlägen dar. Die Tiere der repetitive-Lufu-Gruppe schienen insgesamt weniger dramatische Funktionseinbußen gehabt und sich rascher von den Folgen der Bleomycin-Instillation erholt zu haben. In diesem Zusammenhang wäre zu diskutieren, ob die wiederholten Lungenfunktionsmessungen als solches einen protektiven Einfluss in Bezug auf die Bleomycin-induzierte Fibrose haben. Der homogenere Kurvenverlauf der Messwerte in der repetitive-Lufu-Gruppe erklärt sich dadurch, dass über den gesamten Versuchszeitraum von 56 Tagen dieselben Tiere beobachtet wurden, während sich die Ergebnisse in der single-Lufu-Gruppe an jedem Versuchstag aus Messungen an verschiedenen Mäusen zusammensetzen.

Erstaunlicherweise ergab die statistische Auswertung in der repetitive-Lufu-Gruppe signifikante Unterschiede zwischen PBS- und Bleomycin-behandelten Mäusen, nicht nur an den Versuchstagen sieben bis 21, sondern zusätzlich auch an Tag 28 und 56. Die Verlaufskurve der Messergebnisse zeigt zwar jeweils ab Tag 28 eine Rückkehr der Messwerte auf Ausgangsniveau bzw. darüber hinaus an, im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen bestand jedoch weiterhin eine signifikante Einschränkung der Lungenfunktion. Betrachtet man allein die Messergebnisse der PBS-behandelten Mäuse, so fällt auf, dass über den Verlauf der 56 Versuchstage hinweg, ein stetiger, wenn auch geringer, Anstieg von C und

IC bzw. ein Abfall von R zu verzeichnen war. Einen ähnlichen Effekt beschrieben auch De Vleeschauwer und Rinaldi in ihrer Arbeit von 2011 [2] und brachten ihn am ehesten mit dem Wachstum der Mäuse in Verbindung. Denkbar wäre auch, dass die mechanischen Eigenschaften der Lungen durch die wiederholten Messungen beeinflusst wurden und die beobachteten Änderungen bei den PBS-Tieren der repetitive-Lufu-Gruppe daher rühren. Diese Hypothese kann jedoch verworfen werden, wenn man im Vergleich die Messkurven der PBS-Mäuse aus der single-Lufu-Gruppe betrachtet. Obwohl sich diese Messkurven aus den Ergebnissen verschiedener Mäuse zusammensetzen, die jeweils nur eine Lungenfunktionsmessung erhielten, sind sie annähernd identisch mit denen der repetitive-Lufu-Gruppe. Am wahrscheinlichsten sind die Veränderungen daher tatsächlich auf das Wachstum der Mäuse zurückzuführen. Dieser Umstand unterstreicht die Notwendigkeit, bei Versuchsaufbauten mit einzelnen Lungenfunktionsmessungen, möglichst gleichaltrige und gleich schwere Mäuse zu untersuchen. Gerade bei jungen Tieren führen wenige Wochen Alters- und Gewichtsunterschied zu deutlich unterschiedlichen, physiologischen Ergebnissen [98]. Obgleich die Versuchsbedingungen bei experimentellen Arbeiten grundsätzlich stets möglichst konstant gehalten werden sollten um Fehlerquellen zu minimieren, bietet der Ansatz mit repetitiven Lungenfunktionsmessungen hier Vorteile, da es später möglich ist, sämtliche Messungen auf den individuellen Ausgangswert der jeweiligen Maus zu beziehen und so Aussagen über wahre Funktionsänderungen zu treffen. Konstitutionsbedingte Messunterschiede lassen sich herausrechnen, indem nicht die absoluten Messwerte betrachtet werden, sondern die Relationen zum Ausgangswert. Die Tatsache, dass in der repetitive-Lufu-Gruppe signifikante Unterschiede der Lungenfunktion (C, IC, R) zwischen den PBS- und Bleomycin-Tieren auch an Versuchstag 28 und darüber hinaus bestanden, irritiert zunächst. Offensichtlich erholte sich die Lungenfunktion der Bleomycin-behandelten Mäuse zwar, in Relation zu den Ausgangswerten, im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren blieb jedoch ein funktionelles Defizit bestehen. Dieses Defizit hatte in der histologischen Untersuchung kein Korrelat. Der stereologisch bestimmte Anteil des Kollagens zeigte an Versuchstag 56 keinen relevanten Unterschied. Der durch Bleomycin verursachte Lungenschaden scheint jedoch einen langwierigen Effekt auf die Lungenfunktion der Mäuse zu haben, der auch fortbesteht, nachdem histologisch bereits keine Unterschiede mehr zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen erkennbar sind. In diesem Zusammenhang wäre interessant, ob die funktionellen Unterschiede zwischen Bleomycin- und PBS-behandelten Mäusen auch über längere Zeiträume hinweg bestehen, oder ob sich nach einiger Zeit eine 'echte' Erholung einstellt. Sollte

sich in zukünftigen Studien herausstellen, dass Bleomycin tatsächlich eine anhaltende Beeinträchtigung der Lungenfunktion im Maus-Modell bewirkt, so müsste man diesen Faktor bei therapeutischen Studien entsprechend berücksichtigen. Bei histologischer Abwesenheit von Fibrose könnte nicht automatisch auf eine Aushelung der Bleomycin-induzierten Lungenschäden geschlossen werden. Vielmehr zeigt sich auch hier die Notwendigkeit der Berücksichtigung verschiedener Messinstrumente, um ein möglichst umfassendes Bild des Krankheitsverlaufes nach Bleomycin-Instillation zu erhalten.

Um die Veränderungen im Verlauf der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nicht nur unter funktionellen und histologischen Aspekten, sondern auch auf molekulargenetischer Ebene quantifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit die Expression verschiedener Gene mittels qPCR untersucht. Im Fokus stand dabei die Enzymklasse der Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs), da sie eine noch relativ neue Entität unter den Enzymen der posttranslationalen Modifikation darstellt, die jedoch in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist. Im Zusammenhang mit Erkrankungen der Lunge, mehren sich die Hinweise darauf, dass PRMTs eine wichtige Rolle in deren Pathogenese spielen könnten [136].

Neben den PRMTs wurde, gewissermaßen als Positivkontrolle, die Expression von Kollagen 1 (Colla) und Plasmin activator inhibitor 1 (PAI-1) gemessen. Erwartungsgemäß war bei den Bleomycin-behandelten Mäusen eine signifikante Heraufregulierung der Colla Expression an den Versuchstagen 14 und 21 zu beobachten, die eng mit dem stereologisch ermittelten Kollagengehalt korrelierte. PAI-1 dagegen, das inzwischen als antifibrotisches Protein gilt [80], zeigte an Versuchstag sieben zunächst eine signifikante Hochregulierung der Expression bei den Bleomycin-behandelten Mäusen, während an Versuchstag 21 ein genau gegenteiliges Bild zu beobachten war. Demzufolge wird in der inflammatorischen Phase der Bleomycin-induzierten Fibrose offenbar PAI-1 ins Lungengewebe rekrutiert, dessen Expression sich jedoch mit fortschreitender Fibrose reduziert. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um S. Shetty [15][80], dessen Mitarbeiter in fibrotischen Lungenfibroblasten, sowohl von Mäusen als auch von Menschen, eine Suppression von PAI-1, bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression von Colla und Urokinase Plasmin Activator (uPA) nachweisen konnten.

Die Gen-Expression der PRMTs in der single-Lufu-Gruppe lieferte derweil ein gemischtes Bild. Als gemeinsames Charakteristikum fiel auf, dass im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen sieben Tage nach Bleomycin-Instillation eine Herunterregulierung der Expression bei fast allen PRMTs stattfand. Einzig PRMT1 und 7 zeigten an diesem Versuchstag keine wesentliche Veränderung. Damit scheint in der inflammatorischen Phase der Bleomycin-induzierten Fibrose eine Suppression der PRMTs 2, 3, PRMT4/CARM1, 5, 6, und 8 vonstatten zu gehen. Nachdem O'Brien et al. eine Hyperproliferation alveolärer Epithelzellen vom Typ II (ATII Zellen) bei CARM1 defizienten Mäusen festgestellt hatten [89], ist die supprimierte Expression von CARM1 in diesem Zusammenhang besonders interessant, da ATII Zellen wiederum eine zentrale Rolle in der Pathogenese der IPF einnehmen [108]. Die Abwesenheit von CARM1 scheint die Frühphase der Entstehung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu begünstigen, während im Stadium der manifesten Fibrose zwar noch eine leichte jedoch statistisch nicht signifikante Minderexpression von CARM1 bei Bleomycin- im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren festzustellen war. Bemerkenswert ist hingegen die signifikante Herunterregulierung der Expression des CARM1-Gens an Tag 56 bei den Bleomycin-behandelten Mäusen, zu einem Zeitpunkt als histologisch bereits keine Fibrose mehr nachzuweisen war. Zu diskutieren wäre hier, ob Bleomycin nachhaltige Veränderungen am Lungengewebe bewirkt. Einerseits auf physiologischer Ebene, wie zuvor bei der Lungenfunktion beobachtet, und andererseits hinsichtlich molekulargenetischer Prozesse wie der Expression von CARM1. CARM1 fungiert als Coaktivator diverser Transkriptionsfaktoren [20] [27] [31] [55] und scheint eine wichtige Rolle sowohl bei der Proliferation und Differenzierung alveolärer Epithelzellen vom Typ II (ATII Zellen) zu spielen [89], als auch bei verschiedenen Signalwegen die bisher mit fibrotischen Lungenerkrankungen und speziell der IPF assoziiert werden konnten (Wnt/ β -catenin, siehe 1.5.2) [86] [23] [91]. Den Ergebnissen von Sarker et al zufolge, ist CARM1 außerdem von zentraler Bedeutung für die Zellalterung, indem es u.a. das anti-Zellalterungs-Gen SIRT1 stabilisiert. In Ihrer Arbeit von 2015 konnte eine signifikante Herunterregulierung der SIRT1 Expression in ATII Zellen CARM1 defizienter Mäuse festgestellt werden. Zusätzlich führte die Abwesenheit von CARM1 sowohl zu einer gestörten Wundheilung von ATII Zellen als auch zu Beeinträchtigungen der Transdifferenzierung von ATII zu ATI Zellen [107]. CARM1 ist daher offensichtlich sowohl für die Entwicklung und Differenzierung alveolärer Epithelzellen von Bedeutung, als auch für den Schutz vor Zellalterung. Beides ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der IPF. Die Vermutung, CARM1 selbst könne in die Pathogenese der

IPF involviert sein, liegt daher nahe. In der zweiten Versuchsreihe dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von CARM1 bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Fibroseentwicklung parallel bei C57Bl/6 Wildtyp und bei CARM1^{+/-}-Mäusen beobachtet. Im Fokus stand dabei die Fragestellung, ob Unterschiede in der Ausprägung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zwischen Wildtyp- und CARM1^{+/-}-Tieren bestehen würden und ob auch bei den CARM1^{+/-}-Mäusen eine Auflösung der fibrotischen Veränderungen ab Tag 28 einsetzen würde. Betrachtet wurden selektiv die Tage 21 und 28 nach Bleomycin- bzw. PBS-Instillation. Tatsächlich traten erste Unterschiede zwischen Wildtyp und CARM1^{+/-}-Mäusen bereits im Rahmen der Vorversuche zutage. Während die Dosis von 5 U Bleomycin pro Kg Körpergewicht bei den Wildtyp-Mäusen eine zuverlässige Fibrosebildung bei vernachlässigbar geringer Ausfallrate (durch vorzeitigen Tod der Mäuse) bewirkte, starben bei derselben Bleomycin-Dosierung annähernd 50% der CARM1^{+/-}-Tiere vorzeitig (Daten nicht abgebildet). Die Knockout-Mäuse reagierten offenbar heftiger auf das Bleomycin. Erst nach Anpassung der Dosierung auf 3U/Kg/KG, sank die Ausfallrate auf ein akzeptables Maß ab.

In der eigentlichen Versuchsreihe entwickelten sowohl CARM1^{+/-}- als auch Wildtyp-Mäuse an Versuchstag 21 nach Bleomycin-Instillation eine deutliche Lungenfibrose. Signifikante Unterschiede, des histologisch ermittelten Kollagengehaltes zwischen Wildtyp und CARM1^{+/-}, waren in der statistischen Auswertung an diesem Tag nicht zu detektieren. Ein signifikanter Unterschied konnte hingegen an Versuchstag 28 festgestellt werden. Während bei den Wildtyp-Tieren histologisch eine Rückbildung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu beobachten war, vergesellschaftet mit einem Absinken des Kollagenanteils, wiesen einige der CARM1^{+/-}-Tiere noch immer ausgedehnte Fibroseareale und einen hohen Kollagenanteil auf. Der Prozess der Genesung des Lungengewebes war bei den CARM1^{+/-}-Tieren offenbar verzögert. Ein ähnliches Bild bot sich bei der Auswertung der Lungenfunktionsmessungen. Während sich an Versuchstag 21 die gemessenen Parameter der Bleomycin-behandelten Wildtyp- und CARM1^{+/-}-Mäuse nicht wesentlich voneinander unterschieden, wohl aber von denen der PBS-behandelten Kontrolltiere, zeigten C und IC bei den CARM1^{+/-}-Mäusen an Tag 28 signifikant verringerte Werte im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren. Die Lungenfunktion der Wildtyp-Mäuse hatte sich, wie schon in der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit, vier Wochen nach Bleomycin-Instillation erholt und den Ausgangswerten angenähert. Die Lungenfunktion der CARM1-defizienten Mäuse hingegen, war nach derselben Zeit noch immer signifikant

verschlechtert. Die Ergebnisse aus Histologie und Lungenfunktion zusammengenommen, ist daher die Überlegung zulässig, dass die geringere Expression von CARM1 hier zu einer verzögerten Auflösung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose führte. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Hypothese, dass CARM1 regulatorisch sowohl in die Entstehung als auch in die Auflösung der Bleomycin-induzierten Fibrose eingreift. Ausgehend von dieser Überlegung wäre von großem Interesse, welche Veränderungen sich in den Lungen der CARM1^{+/-}-Mäuse in der frühen, inflammatorischen Phase der Bleomycin-induzierten Fibrose abspielen. Nachdem sieben Tage nach Bleomycin-Instillation in der qRT-PCR bereits bei den Wildtyp-Tieren eine Herunterregulierung der Gen-Expression von CARM1 zu beobachten war (siehe 4.2), wäre bei den CARM1^{+/-}-Mäusen mit ohnehin niedrigerem CARM1 Level eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion denkbar, gefolgt von einer prolongierten, fibrotischen Phase. In diesem Zusammenhang wäre auch das Zusammenspiel mit dem NF- κ B- und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg hochinteressant. NF- κ B gilt als einer der Transkriptionsfaktoren, die durch CARM1 coaktiviert werden [27] [46] [55] und ist überdies wichtig für die Regulierung von Genen die in Entzündungen und das Zellüberleben involviert sind [39]. Eine dysregulierte Entzündungsreaktion in Abwesenheit von CARM1 im Rahmen des Modelles der Bleomycin-induzierten Fibrose ist daher durchaus vorstellbar. Li et al. wiesen 2014 außerdem eine Regulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch NF- κ B über den Transforming growth Faktor beta (TGF β) in Lungenfibrosblasten nach [74]. Wnt/ β -Catenin und TGF- β gelten schon länger als profibrotische Faktoren, die gehäuft in fibroblastischen Foci von IPF Patienten vorkommen [61] [23] [86]. CARM1 wirkt also zum Einen indirekt über NF- κ B und TGF- β auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und kann zum Anderen, den Ergebnissen von Ou et al. zufolge, zumindest in Zellen kolorektaler Tumore, auch direkt coaktivierend auf die β -Catenin Aktivität wirken [91]. CARM1 kommt insofern als upstream-Regulator fibrotischer Prozesse in frage, wofür auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen.

Die Forschungsergebnisse jüngerer Zeit lassen darüber hinaus annehmen, dass CARM1 über die CARM1-SIRT1-Achse der Zellalterung entgegenwirkt und insbesondere der Zellalterung von ATII Zellen, während die Abwesenheit von CARM1 zu einer gestörten Wundheilung von ATII Zellen führt, indem die vom Wnt/ β -Catenin abhängige Transdifferenzierung von ATII zu ATI Zellen beeinträchtigt wird [106]. Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass sich das Lungengewebe von CARM1^{+/-}-Mäusen langsamer von der Bleomycin-induzierten Fibrose erholt, lässt sich mit diesen Ergebnissen gut vereinbaren, da alveoläre Epithelzellen von zentraler Bedeutung für die Fibrosebildung sind,

sowohl bei der IPF als auch der Bleomycin-induzierten Fibrose [108]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass CARM1 tatsächlich ein upstream-Regulator der pulmonalen Fibrosebildung ist.

Für künftige Studien wäre zunächst von Interesse, ob die Auflösung der Bleomycin-induzierten Fibrose durch CARM1 Mangel lediglich verzögert oder die Abheilung grundsätzlich gestört wird. Denkbar sind Versuchsansätze mit Beobachtung der pulmonalen Fibroseentwicklung von Mäusen mit selektivem Knockout des CARM1-Gens in alveolären Epithelzellen, um gezielt die Wirkung von CARM1 im Lungengewebe zu untersuchen und das Problem zu umgehen, dass Mäuse mit einem kompletten CARM1-Knockout kurz nach der Geburt versterben [62]. Im Zuge dessen könnten auch die Interaktionen von CARM1 mit NF- κ B und Wnt/ β -Catenin näher untersucht werden. CARM1 stellt damit ein hochinteressantes Ziel therapeutischer Überlegungen hinsichtlich der pulmonalen Fibrosebildung dar.[28]

Kapitel 6

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die repetitive Lungenfunktionsmessung mittels Intubation, im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen, ein geeignetes Werkzeug zum Krankheitsmonitoring ist. Diese Ergebnisse sind besonders in Hinblick auf zukünftige Therapiestudien mit antifibrotischen Medikamenten von großem Interesse.

Die repetitive Lungenfunktionsmessung erlaubt eine Beobachtung des Krankheitsverlaufes in Echtzeit und an immer denselben Mäusen, statt nur an einem Querschnitt unterschiedlicher Mäuse. Alle Messergebnisse können so stets auf den individuellen Ausgangswert bezogen werden. Dadurch ist eine Differenzierung möglich, ob sich bestimmte Funktionsparameter tatsächlich verbessert/verschlechtert haben oder Änderungen auf naturgemäße Schwankungen wie Größe und Konstitution der Mäuse zurückzuführen sind.

Überdies könnte sich die Lungenfunktionsmessung als wichtiges Selektionskriterium für Ein- oder Ausschluss einer Maus in therapeutische Studien erweisen. Die Entwicklung der Fibrose im Bleomycin-Modell ist zwar relativ zuverlässig, es kommt jedoch vor, dass einige Tiere keine oder kaum fibrotische Veränderungen zeigen, was z.B. mit Fehlern bei der Bleomycin-Instillation zusammenhängen kann. Da in dieser Arbeit eine enge Korrelation zwischen Lungenfunktion und Krankheitsverlauf schon ab Tag sieben nach Bleomycin-Instillation dokumentiert werden konnte, wäre es möglich, in therapeutische Studien nur Mäuse einzuschließen, deren Lungenfunktion nach Bleomycin-Instillation auf ein ausreichendes Maß der Krankheitsentwicklung schließen lässt.

Um das Krankheitsmonitoring im Bleomycin-Modell zusätzlich zu verbessern, wäre außerdem denkbar auch noninvasive, bildgebende Verfahren wie die Computertomographie oder die Dunkelfeld-Radiographie mit den repetitiven Lungenfunktionsmessungen zu kombinieren. Dadurch könnte die diagnostische Genauigkeit soweit gesteigert werden, dass histologische Untersuchungen zur zusätzlichen Quantifizierung der Krankheits schwere obsolet wären. In künftigen Tierversuchsstudien wäre so die Beobachtung des Krankheitsverlaufes auch über längere Zeiträume hinweg möglich, ohne an jedem Untersuchungszeitpunkt eine proportional größere Menge an Versuchstieren zu benötigen. Erst kürzlich konnte durch Hellbach et al. ein hoher diagnostischer Nutzen der Dunkelfeld-Radiographie für die Anwendung bei Mäusen im Elastase-Emphysem Modell nachgewiesen werden [47]. Die Kombination dieser Methode mit repetitiven Lungenfunktionsmessungen ist sowohl für das Elastase- als auch das Bleomycin-Modell ein vielversprechender Ansatz.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte außerdem eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression von PRMTs der Klassen I und II in der frühen, inflammatorischen Phase der Bleomycin-induzierten Fibrose gezeigt werden. Davon ausgenommen waren lediglich PRMT1 und 7. Diese Entdeckung bietet zahlreiche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Von Interesse wäre z.B., ob die Suppression der PRMTs lediglich ein Phänomen im Rahmen der frühen, entzündlichen Prozesse der Bleomycin-induzierten Fibrose ist, oder auch eine Bedeutung für die spätere fibrotische Krankheitsphase hat, und wenn ja welche.

Die Untersuchung der Bleomycin-induzierten Fibrose bei C57Bl/6 Mäusen mit einer heterozygoten CARM1-Defizienz (CARM1^{+/-}) zeigte einen prolongierten Verlauf der Fibrose bei diesen Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Mindestens die Suppression von CARM1 scheint demnach erheblichen Einfluss auf die pulmonale Fibrose-Entwicklung zu haben. Diese Erkenntnis lässt sich gut mit bisherigen Forschungsergebnissen vereinbaren, die eine regulatorische Beteiligung von CARM1 über NF- κ B und TGF- β am Wnt/ β -Catenin-Signalweg nachweisen konnten, der wiederum von hoher Relevanz für die Fibrosebildung ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von O'Brien et al. (siehe 1.5.2.2) ergibt sich außerdem eine besondere Assoziation zwischen CARM1 und AT II Zellen. Letztere sind, nach aktuellem Wissensstand, wiederum maßgeblich in die IPF-Pathogenese involviert. Hochinteressant wäre die Beobachtung der Effekte von Bleomycin auf Mäuse mit einer gezielten Ausschaltung von CARM1 in AT II Zellen. Ein

solcher Forschungsansatz könnte beleuchten wie ausgeprägt der Einfluss von CARM1 auf adulte AT II Zellen und die Entwicklung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose ist. Ein genaueres Verständnis der Interaktion von CARM1 innerhalb von AT II Zellen mit Signalwegen wie Wnt/ β -Catenin, kann wertvolle Ansätze für Therapiestudien hinsichtlich der pulmonalen Fibrose liefern.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine schwere Erkrankung des Lungeninterstitiums, die in vielen Fällen innerhalb weniger Jahre zum Tod führt. Zur Erforschung der, bisher weitestgehend unbekannt, Pathomechanismen der Erkrankung wird seit Jahren das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen herangezogen. Der Verlauf und die Schwere der Erkrankung werden dabei am häufigsten mittels histologischer Aufarbeitung der Lungen und verschiedener Verfahren zur Quantifizierung der Fibrose untersucht. Seit einiger Zeit werden zunehmend auch Messungen der Lungenfunktion an der tracheotomierten Maus vorgenommen. All diese Methoden haben den entscheidenden Nachteil, dass die Mäuse für die Untersuchungen notwendigerweise getötet werden müssen, und Beobachtungen über längere Zeiträume hinweg aus diesem Grund mit einer enorm hohen Zahl an Versuchstieren verbunden sind. Zudem kann der Verlauf der Erkrankung stets nur im Kollektiv beurteilt werden, ohne dass die Betrachtung einzelner Tiere möglich wäre.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, die repetitive Lungenfunktionsmessung, durch Intubation der Mäuse innerhalb des Bleomycin-Modelles, als valides Instrument zum Krankheitsmonitoring zu etablieren. Diesbezüglich musste festgestellt werden, ob die Dynamik der gemessenen Lungenfunktionsparameter nachvollziehbar mit der histologischen Krankheitsdynamik korreliert werden konnte und inwiefern die Lungenfunktionsmessung demzufolge Aussagen über den tatsächlichen Krankheitsverlauf zulässt.

Zentrales Instrument der Arbeit war das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose bei Mäusen. Es wurden zunächst einmalige und mehrfache Lungenfunktionsmessungen

an zwei Gruppen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse der Lungenfunktion mit denen aus Histologie und Zellzählung verglichen. Die Daten belegen eine enge Korrelation zwischen Änderungen der Lungenfunktion und Krankheitsstadium der Lungenfibrose. Dabei erwiesen sich die Parameter der Lungendehnbarkeit (Compliance=C), des Lungenwiderstandes (Resistance=R) und der inspiratorischen Kapazität (=IC) als zuverlässigste Indikatoren. Sowohl im Kollektiv der einmalig untersuchten Mäuse (single-Lufu-Gruppe), als auch bei den mehrmals der Lungenfunktion unterzogenen Tieren (repetitive-Lufu-Gruppe), zeigte sich eine Erholung der gemessenen Parameter etwa vier Wochen nach Bleomycin-Instillation, was zu den histologischen Beobachtungen passte. Allerdings waren im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren auch nach vier Wochen sowie zwei Monaten, lungenfunktionell weiterhin Defizite auszumachen. Die Lungenfunktion der Mäuse erholte sich zwar in Relation zu den Ausgangswerten, konnte jedoch nicht das Niveau der gesunden Vergleichsgruppe erreichen. Die Ergebnisse implizieren insgesamt einen hohen Nutzen der repetitiven Lungenfunktionsmessung als Instrument zum Krankheitsmonitoring im Modell der Bleomycin-induzierten Fibrose bei Mäusen, da nicht nur der akute Krankheitsverlauf an den Parametern abgelesen werden kann, sondern auch, nach histologischer Ausheilung der fibrotischen Veränderungen, funktionelle Defizite erkannt werden können. In Kombination mit anderen gering-invasiven Untersuchungsverfahren wie z.B. der Computertomographie oder Dunkelfeld-Radiographie, könnte das Bleomycin-Modell weiter verbessert werden, um zukünftig präzisere und langfristige Studien zu ermöglichen, ohne proportional die Anzahl der Versuchstiere erhöhen zu müssen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit molekularen Veränderungen im Verlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose und konzentriert sich dabei auf die Enzymklasse der Protein Arginin Methyltransferasen im Allgemeinen und PRMT4/CARM1 im Speziellen. Nachdem PRMTs zunehmend mit verschiedenen Lungenerkrankungen in Verbindung gebracht werden (bis jetzt vor allem Lungenkrebs), in hohem Maße in Lungengewebe vorkommen und besonders mit alveolären Epithelzellen assoziiert zu sein scheinen, die von zentraler Bedeutung für die Entwicklung der IPF sind, bieten PRMTs einen hochinteressanten Ansatz zur Erforschung möglicher, neuer Pathomechanismen innerhalb der IPF. Speziell PRMT4/CARM1 scheint essentiell für die Differenzierung und Proliferation der alveolären Epithelzellen vom Typ II (AT II Zellen) zu sein. Das zweite

Ziel der Arbeit war es, einen Eindruck der molekularen Regulation der PRMTs im Verlauf der Bleomycin-induzierten Fibrose zu gewinnen und speziell die mögliche Rolle von PRMT4/CARM1 in deren Pathogenese näher zu erforschen.

Die Untersuchung der PRMTs und speziell PRMT4/CARM1 im zweiten Teil der Arbeit, erfolgte einerseits durch qPCR von Proben der ersten Versuchsreihe und andererseits durch den direkten Vergleich von Histologie und Lungenfunktion bei Wildtyp- vs. CARM1-defizienten Mäusen (CARM1^{+/-}), 21 und 28 Tage nach Bleomycin- bzw. PBS-Instillation. Hier zeigte sich zum einen in der qRT-PCR eine Herunterregulierung der Genexpression aller PRMTs, mit Ausnahme von PRMT1 und 7, in der frühen, inflammatorischen Phase der Bleomycin-induzierten Fibrose, zum anderen konnte eine verzögerte Auflösung der Fibrose bei den CARM1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren beobachtet werden. Die Ergebnisse lassen eine regulierende Funktion von CARM1 bei der Entwicklung einer Lungenfibrose vermuten. CARM1 sollte daher unbedingt Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Insbesondere wäre von Interesse, wie sich die Bleomycin-induzierte Fibrose bei CARM1^{+/-}-Mäusen nach mehr als 28 Tagen verhält. Ob ebenfalls eine nahezu vollständige Auflösung der fibrotischen Veränderungen vonstatten geht oder ob gegebenenfalls dauerhafte Schäden bestehen bleiben. CARM1 könnte sich als attraktives Ziel therapeutischer Ansätze im Bleomycin-Modell und möglicherweise darüber hinaus auch für die IPF beim Menschen etablieren.

Kapitel 8

Summary

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease of the interstitial lung tissue, which often leads to death within a few years of time. In order to investigate the mostly unknown pathomechanisms of IPF the mouse model of Bleomycin induced pulmonary fibrosis has been widely used. The course and severity of the disease are mainly assessed by examining histological changes in the lung or using various methods of quantifying the amount of collagen in the lung tissue. In recent times also measurements of the lung function via tracheotomy have been performed on the anesthetised mouse. The disadvantage of all of these methods is the necessary killing of the mice, which leads to tremendous amounts of required laboratory animals in studies with investigations over a longer period of time. In addition to this the course of the disease can only be assessed for a collective of animals but not for the individual mouse.

The aim of the first part of this work was to establish the measurement of lung function via intubation of the mice as a valid instrument for the disease monitoring within the Bleomycin model. In regard to this it was necessary to find out whether the measured lung function parameters could be correlated to the dynamic of changes seen in the histology of the lung and to assess to what extent the lung function measurements would allow assumptions regarding the actual course of disease.

The central element of this study was the model of Bleomycin induced lung fibrosis in mice. First of all single and repetitive lung function measurements were performed on two groups of wildtype mice. The results were compared to those from histology and cell counts. The obtained data show a close correlation between changes in lung function and

the stage of pulmonary fibrosis. Especially lung compliance (C), resistance (R) and inspiratory capacity (IC) proved to be reliable indicators of fibrotic changes. Mice in the single lung function group as well as the repetitive lung function group showed a recovery of the measured parameters more or less four weeks after Bleomycin instillation, which corresponded to the results from histology. In the group of repetitive measurements though the Bleomycin treated mice still showed minor deficits of their lung function in direct comparison to the PBS treated animals after four and eight weeks. Indeed the parameters of lung function had recovered in comparison to the initial values but couldn't reach the level of the healthy control group. All in all the results of the study indicate a high benefit of repetitive lung function measurements as an instrument for disease monitoring in the model of Bleomycin induced pulmonary fibrosis. Not only is it possible to assess the acute disease progression by means of lung function measurements but also to detect functional deficits after healing of obvious histological changes. In combination with other minimal or non-invasive measuring methods like computed tomography or dark field radiography the Bleomycin model could be improved to serve as a future tool for accurate, longterm studies without having to increase the number of laboratory animals.

The second part of the work treats the molecular changes in the course of bleomycin induced fibrosis and will focus on the enzyme class of Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs) in general but especially PRMT4/CARM1. After PRMTs have increasingly been associated with various lung diseases (so far mainly lung cancer), are being expressed in high amounts in the lung tissue and seem to be especially related to alveolar epithelial cells (AEC), which again are of central importance for development of IPF, PRMTs provide very interesting possibilities for research approaches in terms of new pathomechanisms concerning IPF. PRMT4/CARM1 in particular seems to be essential for differentiation and proliferation of AECs type II. The second aim of this study therefore was to get an impression of molecular regulations of PRMTs in the course of Bleomycin induced pulmonary fibrosis and to investigate the possible role of PRMT4/CARM1 within its pathogenesis.

The examination of the PRMTs and PRMT4/CARM1 in particular was on the one hand carried out by performing qPCR on samples of the first experimental series and on the other hand by direct comparison of histology and lung function in wildtype vs. CARM1 deficient mice (CARM1^{+/-}) 21 and 28 days after Bleomycin and PBS-instillation respectively. The obtained data of qRT-PCR showed a downregulation of all PRMTs,

except PRMT1 and 7, in the early inflammation phase of Bleomycin induced pulmonary fibrosis, whilst CARM1^{+/-}-mice presented with a delayed dissolving of fibrotic lesions compared to the wildtype animals. These results lead to the assumption that CARM1 is indeed involved in the development of pulmonary fibrosis. Hence CARM1 should necessarily be investigated in further studies. It would be of special interest how Bleomycin induced fibrosis develops after 28 days in CARM1^{+/-}-mice and if it also shows an almost full recovery of fibrotic lesions or rather leads to permanent damage of the tissue. CARM1 may establish as an attractive target for therapeutical approaches within the Bleomycin model or even for IPF in humans.

Anhang A

Geräte und Material

A.1 Geräte

MiniVent MiniVent Typ 845, Hugo-Sachs Elektronik

Gerät speziell zur Beatmung von Mäusen und vergleichbaren Kleintieren, Tidalvolumina von 30-350 μL und Beatmungsfrequenzen von 60-400 Atemzügen/min
Hugo Sachs Elektronik/MiniVent

Microsprayer[®] Microsprayer[®] Syringe Assembly MSA-250-M für Mäuse, Penn Century[™],

Speziell für Mäuse angefertigte Hochdruckspritze mit Vaporisationsaufsatz zur Applikation von Flüssigkeiten.

PennCentury Inc./Microsprayer

newCAST[™] Visiopharm Software zur quantitativen morphologischen Untersuchung histologischer Schnittpräparate

Visiopharm/newCAST[™]

FlexiVent[™] FlexiVent[™], SCIREQ[®] Scientific Respiratory Equipment Inc.

Gerät und Software zur Lungenfunktionsmessung bei Mäusen

SCIREQ[®]/FlexiVent[™]

HistoStar[™] HistoStar[™], Thermo Fischer Scientific Inc.

Einbettautomat zur Fixierung von Gewebe in Paraffin

ThermoScientific/HistoStar[™]

Cytospin™ Cytospin™, Thermo Fisher Scientific Inc.

Zentrifuge zur Erstellung von Cytospins für die Auswertung von Zellzahlen
ThermoScientific/Cytospin™

Mikro-Dismembrator Mikro-Dismembrator S, Sartorius AG

Gerät für die Mikrovermahlung/Homogenisation kleinerer Gewebemengen
Sartorius/Mikro-Dismembrator

StepOnePlus™-System StepOnePlus™-System und Software, Applied Biosystems®

System für realtime-PCR
AppliedBiosystems®/StepOnePlus®

NanoDrop NanoDrop 1000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.

Gerät für die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren
ThermoScientific/NanoDrop

Entwässerungsautomat Entwässerungsautomat TP 1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH

Gerät zur automatischen Gewebeeinfiltration
Leica Biosystems/TP 1020

A.2 Material

A.2.1 Farben für histologische Färbungen

TABELLE A.1: Farben für HE-Färbung

Mayer's Hämalaun
Fertiglösung Merck 109249
Eosin
Eosin alkoholisch 1%ig: 1 g Eosin auf 100 ml 100%igen Alkohol Gebrauchslösung 1:1 mit 70%igem Alkohol mischen

TABELLE A.2: Farben für Masson-Trichrom-Färbung

Eisenhämatoxylin nach Weigert
Stammlösung A: 5 g Hämatoxylin Krist (Merck 104302) in 500 ml 96%igem Alkohol (1 Monat reifen lassen)
Stammlösung B: 5,8 g Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat (Merck 103943) in 490 ml Aqua dest + 5 ml 25%ige Salzsäure (Merck 100316). Vor Gebrauch Stammlösung A+B zu gleichen Teilen mischen. Gemisch ist bis zu 1 Woche haltbar.
Ponceau-Säurefuchsin
0,2 g Ponceau 2R (Sigma P2395)
0,1 g Säurefuchsin (Merck 105231)
300 ml 1%ige Essigsäure (Merck 10063)
Phosphormolybdänsäure-Orange G
4 g Molybdatophosphorsäure-Hydrat (Merck 100532)
2 g Orange G (Merck 115925) 100 ml Aqua dest
Lichtgrün
0,2 g Lichtgrün SF (Merck 115941)
100 ml Essigsäure 0,2 %ig

TABELLE A.3: Farben für May-Grünwald-Giemsa Färbung

May-Grünwald
Fertiglösung Merck 101424
Giemsa
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau, Fertiglösung Merck 109203
Gebrauchslösung im Verhältnis 1:20 mit H ₂ O mischen

Anhang B

Tabellen

B.1 Tabellarische Messwerte single-Lufu

TABELLE B.1: Compliance single-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
7	0,02966 ± 0,0008759	5	0,02126 ± 0,001105	5	0,0079 (**)
14	0,03457 ± 0,001395	6	0,01611 ± 0,005334	5	0,0303 (*)
21	0,03491 ± 0,0007378	6	0,01388 ± 0,003468	4	0,0095 (**)
28	0,03520 ± 0,002482	6	0,03542 ± 0,002362	6	0,8182 (ns)
56	0,04177 ± 0,0007559	6	0,03514 ± 0,001560	8	0,0047 (**)

TABELLE B.2: Resistance single-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
7	0,7527 ± 0,01549	5	0,9635 ± 0,01818	5	0,0079 (**)
14	0,7002 ± 0,02395	6	1,776 ± 0,4534	5	0,0043 (**)
21	0,6779 ± 0,01437	6	1,595 ± 0,2930	4	0,0095 (**)
28	0,6642 ± 0,03339	6	0,6771 ± 0,04330	6	0,8182 (ns)
56	0,5631 ± 0,006597	6	0,6386 ± 0,01617	8	0,0047 (**)

TABELLE B.3: Inspiratory Capacity single-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
7	0,8864 ± 0,02909	5	0,6947 ± 0,01706	5	0,0079 (**)
14	0,8759 ± 0,01471	6	0,5816 ± 0,08096	5	0,0303 (*)
21	0,8863 ± 0,03018	6	0,6158 ± 0,03605	4	0,0095 (**)
28	0,8990 ± 0,03838	6	0,8829 ± 0,03569	6	1,0000 (ns)
56	1,004 ± 0,02239	6	0,8998 ± 0,01849	8	0,0027 (**)

B.2 Tabellarische Werte repetitive-Lufu

TABELLE B.4: Newtonian Resistance single-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
7	0,1951 ± 0,01524	5	0,1268 ± 0,02546	5	0,0952 (ns)
14	0,3816 ± 0,01082	6	0,5246 ± 0,03956	5	0,0095 (**)
21	0,3682 ± 0,007271	6	0,3869 ± 0,05795	4	0,2571 (ns)
28	0,3801 ± 0,02112	6	0,3650 ± 0,01482	6	0,4848 (ns)
56	0,2896 ± 0,009167	6	0,3288 ± 0,01095	8	0,0426 (*)

TABELLE B.5: Compliance repetitive-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
0	0,03013 ± 0,001292	8	0,02893 ± 0,0006688	15	0,4979 (ns)
7	0,03383 ± 0,001147	8	0,02542 ± 0,0007156	15	0,0002 (***)
14	0,03428 ± 0,001273	8	0,02613 ± 0,001031	15	0,0004 (***)
21	0,03503 ± 0,001161	8	0,02820 ± 0,001219	15	0,0004 (***)
28	0,03756 ± 0,001244	8	0,03171 ± 0,0007607	14	0,0009 (***)
56	0,04109 ± 0,001484	8	0,03496 ± 0,001154	14	0,0006 (***)

TABELLE B.6: Resistance repetitive-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
0	0,7813 ± 0,03706	8	0,7967 ± 0,01847	15	0,6748 (ns)
7	0,7868 ± 0,03498	8	0,9059 ± 0,03815	15	0,0658 (ns)
14	0,7696 ± 0,03170	8	0,9269 ± 0,03807	15	0,0130 (*)
21	0,7387 ± 0,02820	8	0,8649 ± 0,03350	15	0,0130 (*)
28	0,6714 ± 0,02338	8	0,8421 ± 0,04268	14	0,0070 (**)
56	0,5973 ± 0,008745	8	0,7221 ± 0,03583	14	0,0012 (**)

TABELLE B.7: Inspiratory Capacity repetitive-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
0	0,8476 ± 0,03639	8	0,7871 ± 0,01190	15	0,1858 (ns)
7	0,8540 ± 0,01587	8	0,7034 ± 0,01316	15	0,0001 (***)
14	0,8832 ± 0,02074	8	0,7228 ± 0,01636	15	0,0002 (***)
21	0,9033 ± 0,02017	8	0,7681 ± 0,01406	15	0,0001 (***)
28	0,9208 ± 0,02366	8	0,8257 ± 0,01053	14	0,0002 (***)
56	0,9860 ± 0,02761	8	0,8565 ± 0,01230	14	0,0003 (***)

TABELLE B.8: Newtonian Resistance repetitive-Lufu-Gruppe

Tag	Mittelwert + SDE PBS	n=	Mittelwert + SDE Bleo	n=	p-Wert
0	0,3861 ± 0,01223	8	0,4033 ± 0,01081	15	0,4979 (ns)
7	0,4467 ± 0,02755	8	0,3978 ± 0,02476	15	0,2081 (ns)
14	0,4627 ± 0,02525	8	0,4880 ± 0,02316	15	0,6748 (ns)
21	0,4137 ± 0,01654	8	0,4754 ± 0,03232	15	0,1464 (ns)
28	0,3789 ± 0,01311	8	0,4828 ± 0,03101	14	0,0127 (*)
56	0,2876 ± 0,009841	8	0,3413 ± 0,01785	14	0,0127 (*)

Literaturverzeichnis

- [1] G. A. R. P. Michel, D. Stewart, M. Sheppard, Q. Hamid, and B. Corrin. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*, 341 (8860):1550–1554, jun 1993. ISSN 01406736. doi: 10.1016/0140-6736(93)90694-C. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369390694C>.
- [2] I. D. V. Ã, M. R. Ã, V. D. Vooght, J. a. Vanoirbeek, B. M. Vanaudenaerde, E. K. Verbeken, M. Decramer, G. N. Gayan-ramirez, G. M. Verleden, W. Janssens, S. I. De Vleeschauwer, M. Rinaldi, V. De Vooght, J. a. Vanoirbeek, B. M. Vanaudenaerde, E. K. Verbeken, M. Decramer, G. N. Gayan-ramirez, G. M. Verleden, and W. Janssens. Repeated invasive lung function measurements in intubated mice: an approach for longitudinal lung research. *Lab. Anim.*, 45(2): 81–89, apr 2011. ISSN 1758-1117. doi: 10.1258/la.2010.010111. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357700>.
- [3] I. Y. Adamson and D. H. Bowden. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.*, 77(2):185–97, 1974. ISSN 0002-9440. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1910906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [4] W. An, J. Kim, and R. G. Roeder. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*, 117(6):735–748, jun 2004. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186775>.
- [5] S. Avasarala, M. Van Scoyk, M. K. Karuppusamy Rathinam, S. Zerayesus, X. Zhao, W. Zhang, M. R. Pergande, J. a. Borgia, J. DeGregori, J. D. Port, R. a. Winn, and R. K. Bikkavilli. PRMT1 is a Novel Regulator of Epithelial-Mesenchymal-Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Biol. Chem.*, 290(21):

- jbc.M114.636050, 2015. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.636050. URL <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.636050>.
- [6] F. Bachand and P. a. Silver. PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J.*, 23(13):2641–2650, 2004. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/sj.emboj.7600265.
- [7] R. M. Baldwin, N. Haghandish, M. Daneshmand, G. Paris, T. J. Falls, J. C. Bell, S. Islam, and J. Côté. Protein arginine methyltransferase 7 promotes breast cancer cell invasion through the induction of MMP9 expression. *Oncotarget*, 6(5), 2014.
- [8] R. M. Baldwin, A. Morettin, and J. Côté. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark? *World J. Biol. Chem.*, 5(2):115–129, 2014. ISSN 1949-8454. doi: 10.4331/wjbc.v5.i2.115. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4050107%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- [9] N. Barlo, C. Van Moorsel, N. Korthagen, M. Heron, G. Rijkers, H. Ruven, J. Van Den Bosch, and J. Grutters. Genetic variability in the *il1rn* gene and the balance between interleukin (il)-1 receptor agonist and *il-1 β* in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 166(3):346–351, 2011.
- [10] J. H. T. Bates and C. G. Irvin. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J. Appl. Physiol.*, 94(4):1297–1306, apr 2003. ISSN 8750-7587. doi: 10.1152/jappphysiol.00706.2002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626466>.
- [11] J. Batut, C. Dubo e, and L. Vandel. The methyltransferases PRMT4/CARM1 and PRMT5 control differentially myogenesis in zebrafish. *PLoS One*, 6(10), 2011. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0025427.
- [12] K. B. Baumgartner, J. M. Samet, C. A. Stidley, T. V. Colby, and J. A. Waldron. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155(1):242–248, jan 1997. ISSN 1073-449X. doi: 10.1164/ajrccm.155.1.9001319. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9001319>.
- [13] M. T. Bedford and S. Richard. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell*, 18(3):263–272, apr 2005. ISSN 1097-2765. doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866169>.

- [14] J. Behr, A. Günther, W. Ammenwerth, I. Bittmann, R. Bonnet, R. Buhl, O. Eickelberg, R. Ewert, S. Gläser, J. Gottlieb, C. Grohé, M. Kreuter, C. Kroegel, P. Markart, C. Neurohr, M. Pfeifer, A. Prasse, N. Schönfeld, J. Schreiber, H. Sitter, D. Theegarten, A. Theile, A. Wilke, H. Wirtz, C. Witt, H. Worth, P. Zabel, J. Müller-Quernheim, and U. Costabel. [German guideline for diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis]. *Pneumologie*, 67(2): 81–111, feb 2013. ISSN 1438-8790. doi: 10.1055/s-0032-1326009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325398>.
- [15] Y. P. Bhandary, S. K. Shetty, a. S. Marudamuthu, M. R. Gyetko, S. Idell, M. Gharaee-Kermani, R. S. Shetty, B. C. Starcher, and S. Shetty. Regulation of alveolar epithelial cell apoptosis and pulmonary fibrosis by coordinate expression of components of the fibrinolytic system. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.*, 302(5):L463—L473, 2012. ISSN 1040-0605. doi: 10.1152/ajplung.00099.2011.
- [16] D. Bösch and C.-P. Criée. *Lungenfunktionsprüfung*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 3 edition, 2013. ISBN 978-3-642-34941-6. doi: 10.1007/978-3-642-34942-3. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34942-3>.
- [17] T. L. Branscombe, A. Frankel, J. H. Lee, J. R. Cook, Z. H. Yang, S. Pestka, and S. Clarke. PRMT5 (Janus Kinase-binding Protein 1) Catalyzes the Formation of Symmetric Dimethylarginine Residues in Proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(35): 32971–32976, 2001. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M105412200.
- [18] R. H. Brown, D. M. Walters, R. S. Greenberg, and W. Mitzner. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J. Appl. Physiol.*, 87(6):2362–2365, 1999. ISSN 8750-7587.
- [19] C. B. Carrington, E. A. Gaensler, R. E. Coutu, M. X. FitzGerald, and R. G. Gupta. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 298(15):801–809, 1978.
- [20] D. Chen. Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science (80-.)*, 284(5423):2174–2177, jun 1999. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.284.5423.2174. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5423.2174>.

- [21] D. Cheng, J. Côté, S. Shaaban, and M. T. Bedford. The Arginine Methyltransferase CARM1 Regulates the Coupling of Transcription and mRNA Processing. *Mol. Cell*, 25(1):71–83, 2007. ISSN 10972765. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.019.
- [22] H. Cheng, Y. Qin, H. Fan, P. Su, X. Zhang, H. Zhang, and G. Zhou. Overexpression of CARM1 in breast cancer is correlated with poorly characterized clinicopathologic parameters and molecular subtypes. *Diagn. Pathol.*, 8(1):129, 2013. ISSN 1746-1596. doi: 10.1186/1746-1596-8-129. URL <http://www.diagnosticpathology.org/content/8/1/129>.
- [23] M. Chilosi, V. Poletti, A. Zamò, M. Lestani, L. Montagna, P. Piccoli, S. Pedron, M. Bertaso, A. Scarpa, B. Murer, A. Cancellieri, R. Maestro, G. Semenzato, and C. Doglioni. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 162(5):1495–1502, 2003. ISSN 0002-9440. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64282-4.
- [24] H. R. Collard, T. E. King, B. B. Bartelson, J. S. Vourlekis, M. I. Schwarz, and K. K. Brown. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 168(5):538–542, 2003. ISSN 1073449X. doi: 10.1164/rccm.200211-1311OC.
- [25] H. R. Collard, B. B. Moore, K. R. Flaherty, K. K. Brown, R. J. Kaner, T. E. King, J. A. Lasky, J. E. Loyd, I. Noth, M. a. Olman, G. Raghu, J. Roman, J. H. Ryu, D. A. Zisman, G. W. Hunninghake, T. V. Colby, J. J. Egan, D. M. Hansell, T. Johkoh, N. Kaminski, S. K. Dong, Y. Kondoh, D. a. Lynch, J. Müller-Quernheim, J. L. Myers, A. G. Nicholson, M. M. Selman, G. B. Toews, A. U. Wells, F. J. Martinez, J. Müller-Quernheim, J. L. Myers, A. G. Nicholson, M. M. Selman, G. B. Toews, A. U. Wells, and F. J. Martinez. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 176(7):636–643, 2007. ISSN 1073449X. doi: 10.1164/rccm.200703-463PP.
- [26] J. R. Cook, J. H. Lee, Z. H. Yang, C. D. Krause, N. Herth, R. Hoffmann, and S. Pestka. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342(2):472–481, 2006. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.167.

- [27] M. Covic, P. O. Hassa, S. Saccani, C. Buerki, N. I. Meier, C. Lombardi, R. Imhof, M. T. Bedford, G. Natoli, and M. O. Hottiger. Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *EMBO J.*, 24(1):85–96, 2005. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/sj.emboj.7600500.
- [28] F. C. Devos, A. Maaske, A. Robichaud, L. Pollaris, S. Seys, C. A. Lopez, E. Verbeeken, M. Tenbusch, R. Lories, B. Nemery, P. H. M. Hoet, and J. A. J. Vanoirbeek. Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. *Respir. Res.*, 18(1):123, jun 2017. ISSN 1465-993X. doi: 10.1186/s12931-017-0610-1. URL <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0610-1>.
- [29] W. W. Douglas, J. H. Ryu, and D. a. Schroeder. Idiopathic pulmonary fibrosis-Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival. *Am.J.Respir.Crit.Care.Med.*, 161:1172–1178, 2000. ISSN 1073449X.
- [30] R. Elakoum, G. Gauchotte, A. Oussalah, M.-P. Wissler, C. Clément-Duchêne, J.-M. Vignaud, J.-L. Guéant, and F. Namour. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features. *Biochimie*, 97:210–218, 2014. ISSN 1638-6183. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.021. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211191>.
- [31] Q. Feng, P. Yi, J. Wong, and B. W. O’Malley. Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.*, 26(21):7846–7857, 2006. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/MCB.00568-06.
- [32] Y. Feng, a. Hadjikyriacou, and S. G. Clarke. Substrate Specificity of Human Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7): THE IMPORTANCE OF ACIDIC RESIDUES IN THE DOUBLE E LOOP. *J. Biol. Chem.*, 289(47):32604–32616, 2014. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.609271. URL <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.609271>.
- [33] K. Flaherty, E. Thwaite, E. Kazerooni, B. Gross, G. Toews, T. Colby, W. Travis, J. Mumford, S. Murray, A. Flint, et al. Radiological versus histological diagnosis in uip and nsip: survival implications. *Thorax*, 58(2):143–148, 2003.

- [34] R. W. Fleischman, J. R. Baker, G. R. Thompson, U. H. Schaeppi, V. R. Illievski, D. a. Cooney, and R. D. Davis. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax*, 26(6):675–682, 1971. ISSN 0040-6376. doi: 10.1136/thx.26.6.675.
- [35] a. Frankel and S. Clarke. PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family: Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain. *J. Biol. Chem.*, 275(42):32974–32982, 2000. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M006445200.
- [36] A. Frankel, N. Yadav, J. Lee, T. L. Branscombe, S. Clarke, and M. T. Bedford. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 277(5):3537–3543, 2002. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M108786200.
- [37] J. D. Gary and S. Clarke. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 61:65–131, 1998. ISSN 0079-6603.
- [38] M. Gharaee-Kermani, K. Hatano, Y. Nozaki, and S. H. Phan. Gender-based differences in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 166(6):1593–1606, 2005. ISSN 00029440. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62470-4. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62470-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62470-4).
- [39] S. Ghosh, M. J. May, and E. B. Kopp. $\text{Nf-}\kappa\text{b}$ and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16(1):225–260, 1998.
- [40] T. Glaab, W. Mitzner, A. Braun, H. Ernst, R. Korolewitz, J. M. Hohlfeld, N. Krug, and H. G. Hoymann. Repetitive measurements of pulmonary mechanics to inhaled cholinergic challenge in spontaneously breathing mice. *J. Appl. Physiol.*, 97(3):1104–1111, 2004. ISSN 8750-7587. doi: 10.1152/jappphysiol.01182.2003.
- [41] C. J. Gottardi and M. Königshoff. Considerations for Targeting β -Catenin Signaling in Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 187(6):566–568, 2013. ISSN 1073-449X. doi: 10.1164/rccm.201301-0144ED. URL <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201301-0144ED>.
- [42] H. O. Habashy, E. a. Rakha, I. O. Ellis, and D. G. Powe. The oestrogen receptor coactivator CARM1 has an oncogenic effect and is associated with poor prognosis

- in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 140(2):307–316, 2013. ISSN 01676806. doi: 10.1007/s10549-013-2614-y.
- [43] K. Hamada, S. Nagai, S. Tanaka, T. Handa, M. Shigematsu, T. Nagao, M. Mishima, M. Kitaichi, and T. Izumi. Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 131(3):650–656, 2007. ISSN 00123692. doi: 10.1378/chest.06-1466.
- [44] L. Hamman and A. R. Rich. Fulminating Diffuse Interstitial Fibrosis of the Lungs. *Trans. Am. Clin. Clinematological Assoc.*, 51:154–163, 1935. ISSN 0065-7778. doi: 10.1159/000072819. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2242096/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407504%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2242096>.
- [45] S. Harari and a. Caminati. IPF: New insight on pathogenesis and treatment. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 65(5):537–553, 2010. ISSN 01054538. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02305.x.
- [46] P. O. Hassa, M. Covic, M. T. Bedford, and M. O. Hottiger. Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *J. Mol. Biol.*, 377(3):668–678, 2008. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.044. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280497>.
- [47] K. Hellbach, A. Yaroshenko, F. G. Meinel, A. Ö. Yildirim, T. M. Conlon, M. Bech, M. Mueller, A. Velroyen, M. Notohamiprodjo, F. Bamberg, S. Auweter, M. Reiser, O. Eickelberg, and F. Pfeiffer. In Vivo Dark-Field Radiography for Early Diagnosis and Staging of Pulmonary Emphysema. *Invest Radiol*, 2015. ISSN 1536-0210. doi: 10.1097/RLI.0000000000000147.
- [48] U. Hodgson, T. Laitinen, and P. Tukiainen. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, 57(4):338–342, 2002. ISSN 00406376. doi: 10.1136/thorax.57.4.338. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1746288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [49] J. Hutchinson. On the capacity of the lungs, and on the respiratory functions, with a view of establishing a precise and easy method of detecting disease by the spirometer. *Med. Chir. Trans.*, 29:137–252, 1846. ISSN 0959-5287.
- [50] D. Hyllus, C. Stein, K. Schnabel, E. Schiltz, A. Imhof, Y. Dou, J. Hsieh, and U. M. Bauer. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev.*, 21(24):3369–3380, 2007. ISSN 08909369. doi: 10.1101/gad.447007.
- [51] C. F. Invernizzi, B. Xie, S. Richard, and M. a. Wainberg. PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA. *Retrovirology*, 3:93, 2006. ISSN 1742-4690. doi: 10.1186/1742-4690-3-93.
- [52] T. Ito, N. Yadav, J. Lee, T. Furumatsu, S. Yamashita, K. Yoshida, N. Taniguchi, M. Hashimoto, M. Tsuchiya, T. Ozaki, M. Lotz, M. T. Bedford, and H. Asahara. Arginine methyltransferase CARM1/PRMT4 regulates endochondral ossification. *BMC Dev. Biol.*, 9:47, 2009. ISSN 1471-213X. doi: 10.1186/1471-213X-9-47.
- [53] G. Izbicki, M. J. Segel, T. G. Christensen, M. W. Conner, and R. Breuer. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.*, 83(3):111–119, 2002. ISSN 09599673. doi: 10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x.
- [54] D. Janick-Buckner, G. E. Ranges, and M. P. Hacker. Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 100(3):465–473, 1989. ISSN 0041008X. doi: 10.1016/0041-008X(89)90294-9.
- [55] S. Jayne, K. M. Rothgiesser, and M. O. Hottiger. CARM1 but not Its Enzymatic Activity Is Required for Transcriptional Coactivation of NF- κ B-Dependent Gene Expression. *J. Mol. Biol.*, 394(3):485–495, 2009. ISSN 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.032. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.032>.
- [56] Y. Jegal, S. K. Dong, S. S. Tae, C. M. Lim, D. L. Sang, Y. Koh, S. K. Woo, D. K. Won, S. L. Jin, W. D. Travis, M. Kitaichi, and T. V. Colby. Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 171(6):639–644, 2005. ISSN 1073449X. doi: 10.1164/rccm.200403-331OC.

- [57] H. Ü. Kaniskan, M. M. Szewczyk, Z. Yu, M. S. Eram, X. Yang, K. Schmidt, X. Luo, M. Dai, F. He, I. Zang, Y. Lin, S. Kennedy, F. Li, E. Dobrovetsky, A. Dong, D. Smil, S.-J. Min, M. Landon, J. Lin-Jones, X.-P. Huang, B. L. Roth, M. Schapira, P. Atadja, D. Barsyte-Lovejoy, C. H. Arrowsmith, P. J. Brown, K. Zhao, J. Jin, and M. Vedadi. A Potent, Selective and Cell-Active Allosteric Inhibitor of Protein Arginine Methyltransferase 3 (PRMT3). *Angew. Chemie Int. Ed.*, pages n/a—n/a, 2015. ISSN 14337851. doi: 10.1002/anie.201412154. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201412154>.
- [58] V. Karkhanis, L. Wang, S. Tae, Y. J. Hu, A. N. Imbalzano, and S. Sif. Protein arginine methyltransferase 7 regulates cellular response to DNA damage by methylating promoter histones H2A and H4 of the polymerase δ catalytic subunit gene, POLD1. *J. Biol. Chem.*, 287(35):29801–29814, 2012. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M112.378281.
- [59] a. L. Katzenstein and J. L. Myers. Nonspecific interstitial pneumonia and the other idiopathic interstitial pneumonias: classification and diagnostic criteria. *Am. J. Surg. Pathol.*, 24(1):1–3, jan 2000. ISSN 0147-5185. doi: 10.1097/00000478-200001000-00001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632482><http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10632482&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/10705000-B512-4B5B-9F3C-BDBAFD653BDF>.
- [60] A.-l. a. Katzenstein and J. L. Myers. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Relevance of Pathologic Classification Clinical Features of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157:1301–1315, 1998.
- [61] N. Khalil, T. V. Parekh, R. O'Connor, N. Antman, W. Kepron, T. Yehaulaeshet, Y. D. Xu, and L. I. Gold. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 56(12):907–915, 2001. ISSN 0040-6376. doi: 10.1136/thorax.56.12.907.
- [62] D. Kim, J. Lee, D. Cheng, J. Li, C. Carter, E. Richie, and M. T. Bedford. Enzymatic activity is required for the in Vivo functions of CARM1. *J. Biol. Chem.*, 285(2):1147–1152, 2010. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M109.035865.

- [63] H. J. Kim, D. Perlman, and R. Tomic. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.*, 109(6):661–670, 2015. ISSN 09546111. doi: 10.1016/j.rmed.2015.02.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2015.02.002><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611115000268>.
- [64] B. W. Kinder, K. K. Brown, M. I. Schwarz, J. H. Ix, A. Kervitsky, and T. E. King. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 133(1):226–232, jan 2008. ISSN 0012-3692. doi: 10.1378/chest.07-1948. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18071016>.
- [65] T. E. King, A. Pardo, and M. Selman. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 378(9807):1949–1961, 2011. ISSN 1474-547X. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60052-4. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719092>.
- [66] T. E. King, W. Z. Bradford, S. Castro-Bernardini, E. a. Fagan, I. Glaspole, M. K. Glassberg, E. Gorina, P. M. Hopkins, D. Kardatzke, L. Lancaster, D. J. Lederer, S. D. Nathan, C. a. Pereira, S. a. Sahn, R. Sussman, J. J. Swigris, and P. W. Noble. Protocol for: A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.*, 370(22):2083–2092, 2014. ISSN 1533-4406. doi: 10.1056/NEJMoa1402582. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836312>.
- [67] H. Kitamura, S. Ichinose, T. Hosoya, T. Ando, S. Ikushima, M. Oritsu, and T. Takemura. Inhalation of inorganic particles as a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis-Elemental microanalysis of pulmonary lymph nodes obtained at autopsy cases. *Pathol. Res. Pract.*, 203(8):575–585, 2007. ISSN 03440338. doi: 10.1016/j.prp.2007.04.008.
- [68] M. a. Kleinschmidt, G. Streubel, B. Samans, M. Krause, and U.-M. Bauer. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res.*, 36(10):3202–3213, jun 2008. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkn166. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2425501%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- [69] S. S. Koh, H. Li, Y. H. Lee, R. B. WidELITZ, C. M. Chuong, and M. R. Stallcup. Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase

- (CARM) 1 and β -catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J. Biol. Chem.*, 277(29):26031–26035, 2002. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M110865200.
- [70] W. E. Lawson, V. V. Polosukhin, G. T. Stathopoulos, O. Zoia, W. Han, K. B. Lane, B. Li, E. F. Donnelly, G. E. Holburn, K. G. Lewis, R. D. Collins, W. M. Hull, S. W. Glasser, J. a. Whitsett, and T. S. Blackwell. Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am. J. Pathol.*, 167(5):1267–1277, 2005. ISSN 00029440. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61214-X.
- [71] J. Lee and M. T. Bedford. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.*, 3(3):268–273, 2002. ISSN 1469221X. doi: 10.1093/embo-reports/kvf052.
- [72] J. Lee, J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke, and M. T. Bedford. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J. Biol. Chem.*, 280(38):32890–32896, 2005. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M506944200.
- [73] B. Ley, H. R. Collard, and T. E. King. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 183(4):431–440, 2011. ISSN 1535-4970. doi: 10.1164/rccm.201006-0894CI. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935110>.
- [74] J. Li, G. Wang, and X. Sun. Transforming growth factor β regulates β -catenin expression in lung fibroblast through NF- κ B dependent pathway. *Int. J. Mol. Med.*, (19):1219–1224, 2014. ISSN 1107-3756. doi: 10.3892/ijmm.2014.1916. URL <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2014.1916>.
- [75] C. Liang, R. S. Russell, R. Lin, M. T. Bedford, and M. a. Wainberg. Methylation of Tat by PRMT6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Society*, 79(1):124–131, 2005. doi: 10.1128/JVI.79.1.124.
- [76] A. A. Liebow. New concepts and entities in pulmonary disease. In *Lung, Int. Acad. Pathol. Monogr.*, pages 332–365. Williams I& Wilkins, Baltimore, 8 edition, 1967.

- [77] N. Limjunyawong, W. Mitzner, and M. R. Horton. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol. Rep.*, 2(2):e00249, 2014. ISSN 2051-817X. doi: 10.1002/phy2.249. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3966254%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- [78] A. D. Lorenzo, M. T. Bedford, A. Di Lorenzo, and M. T. Bedford. Histone arginine methylation. *FEBS Lett.*, 585(13):2024–2031, jul 2011. ISSN 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.010. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579310009063><http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.010>.
- [79] E. D. Manali, C. Moschos, C. Triantafillidou, A. Kotanidou, I. Psallidas, S. P. Karabela, C. Roussos, S. Papisiris, A. Armaganidis, G. T. Stathopoulos, and N. a. Maniatis. Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm. Med.*, 11(1):33, jan 2011. ISSN 1471-2466. doi: 10.1186/1471-2466-11-33. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128859%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.
- [80] A. S. Marudamuthu, S. S. K. Shetty, Y. P. Bhandary, S. Karandashova, M. Thompson, V. Sathish, G. Florova, T. B. Hogan, C. M. Pabelick, Y. S. Prakash, Y. Tsukasaki, J. Fu, M. Ikebe, S. Idell, and S. S. K. Shetty. Plasminogen activator inhibitor-1 suppresses pro-fibrotic responses in fibroblasts from fibrotic lungs. *J. Biol. Chem.*, 290(15):jbc.M114.601815, 2015. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M114.601815. URL <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.601815>.
- [81] H. Matthys and W. Seeger. *Klinische Pneumologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 4 edition, 2008. ISBN 978-3-540-37682-8. doi: 10.1007/978-3-540-37692-7. URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-37692-7>.
- [82] a. E. McBride and P. a. Silver. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, 106(1):5–8, jul 2001. ISSN 0092-8674. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461695>.

- [83] Y. Miyake, S. Sasaki, T. Yokoyama, K. Chida, A. Azuma, T. Suda, S. Kudoh, N. Sakamoto, K. Okamoto, G. Kobashi, M. Washio, Y. Inaba, and H. Tanaka. Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Ann. Occup. Hyg.*, 49(3):259–265, 2005. ISSN 0003-4878. doi: 10.1093/annhyg/meh090.
- [84] A. Moeller, K. Ask, D. Warburton, J. Gauldie, and M. Kolb. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. I& cell Biol.*, 40(3):362–382, 2008. ISSN 13572725. doi: 10.1016/j.biocel.2007.08.011. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323681&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [85] H. C. Moore BB. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294(2):L152—160, 2008. doi: 10.1152/ajplung.00313.2007. URL <http://ajplung.physiology.org/content/294/2/L152.long>.
- [86] E. E. Morrissey. Wnt signaling and pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 162(5):1393–1397, 2003. ISSN 0002-9440. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64271-X. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000294401064271X>[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64271-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64271-X).
- [87] J. R. Nash, P. J. McLaughlin, D. Butcher, and B. Corrin. Expression of tumour necrosis factor-alpha in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology*, 22(4):343–347, 1993. ISSN 0309-0167.
- [88] Y. Obayashi, I. Yamadori, J. Fujita, T. Yoshinouchi, N. Ueda, and J. Takahara. The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 112(5):1338–1343, 1997. ISSN 1523-0864. doi: 10.1089/ars.2007.1897.
- [89] K. B. O’Brien, M. Alberich-Jordà, N. Yadav, O. Kocher, A. DiRuscio, A. Ebralidze, E. Levantini, N. J. Sng, M. Bhasin, T. Caron, et al. *Carm1* is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development*, 137(13):2147–2156, 2010.
- [90] S. Ohshimo, F. Bonella, A. Cui, M. Beume, N. Kohno, J. Guzman, and U. Costabel. Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 179(11):1043–1047, 2009. ISSN 1073449X. doi: 10.1164/rccm.200808-1313OC.

- [91] C.-Y. Ou, M. J. LaBonte, P. C. Manegold, A. Y.-L. So, I. Ianculescu, D. S. Gerke, K. R. Yamamoto, R. D. Ladner, M. Kahn, J. H. Kim, and M. R. Stallcup. A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of β -catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression. *Mol. Cancer Res.*, 9(5):660–670, 2011. ISSN 1541-7786. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0223.
- [92] W. K. Paik and S. Kim. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29(1):14–20, 1967. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/0006-291X(67)90533-5. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X67905335>.
- [93] W. K. Paik and S. Kim. Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 243(9):2108–2114, 1968. ISSN 0021-9258. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5648426>.
- [94] S. Pal, S. N. Vishwanath, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Sif. Human SWI/SNF-Associated PRMT5 Methylates Histone H3 Arginine 8 and Negatively Regulates Expression of ST7 and NM23 Tumor Suppressor Genes. *Mol. Cell. Biol.*, 24(21):9630–9645, nov 2004. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/MCB.24.21.9630-9645.2004. URL <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.24.21.9630-9645.2004>.
- [95] M. R. Pawlak, C. a. Scherer, J. Chen, M. J. Roshon, and H. E. Ruley. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.*, 20(13):4859–4869, 2000. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/MCB.20.13.4859-4869.2000.
- [96] R. Peng, S. Sridhar, G. Tyagi, J. E. Phillips, R. Garrido, P. Harris, L. Burns, L. Renteria, J. Woods, L. Chen, J. Allard, P. Ravindran, H. Bitter, Z. Liang, C. M. Hogaboam, C. Kitson, D. C. Budd, J. S. Fine, C. M. T. Bauer, and C. S. Stevenson. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease. *PLoS One*, 8(4):e59348, jan 2013. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0059348. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614979%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.

- [97] A. Pesci, E. Ricchiuti, R. Ruggiero, and A. De Micheli. Bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis: What does it tell us? *Respir. Med.*, 104(SUPPL. 1):S70—S73, 2010. ISSN 09546111. doi: 10.1016/j.rmed.2010.03.019. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.019>.
- [98] M. Polotsky, A. S. Elsayed-ahmed, L. Pichard, R. A. Richardson, P. L. Smith, H. Schneider, J. P. Kirkness, V. Polotsky, and A. R. Schwartz. Effect of age and weight on upper airway function in a mouse model. 21224:696–703, 2011. doi: 10.1152/jappphysiol.00123.2011.
- [99] C. Qi, J. Chang, Y. Zhu, A. V. Yeldandi, S. M. Rao, and Y.-J. Zhu. Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, 277(32):28624–28630, 2002. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M201053200.
- [100] S. Quadrelli, L. Molinari, L. Ciallella, J. C. Spina, E. Sobrino, and J. Chertcoff. Radiological versus histopathological diagnosis of usual interstitial pneumonia in the clinical practice: does it have any survival difference? *Respiration*, 79(1):32–37, 2010.
- [101] G. Raghu, T. D. Freudemberger, S. Yang, J. R. Curtis, C. Spada, J. Hayes, J. K. Sillery, C. E. Pope, and C. A. Pellegrini. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.*, 27(1):136–142, 2006. ISSN 09031936. doi: 10.1183/09031936.06.00037005.
- [102] G. Raghu, D. Weycker, J. Edelsberg, W. Z. Bradford, and G. Oster. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 174(7):810–816, 2006. ISSN 1073449X. doi: 10.1164/rccm.200602-163OC.
- [103] G. Raghu, H. R. Collard, J. J. Egan, F. J. Martinez, J. Behr, K. K. Brown, T. V. Colby, J.-F. F. Cordier, K. R. Flaherty, J. A. Lasky, D. A. Lynch, J. H. Ryu, J. J. Swigris, A. U. Wells, J. Ancochea, D. Bouros, C. Carvalho, U. Costabel, M. Ebina, D. M. Hansell, T. Johkoh, D. S. Kim, T. E. King, Y. Kondoh, J. Myers, N. L. Müller, A. G. Nicholson, L. Richeldi, M. M. Selman, R. F. Dudden, B. S. Griss, S. L. Protzko, H. J. Schünemann, N. L. Müller, A. G. Nicholson, L. Richeldi, M. M. Selman, R. F. Dudden, B. S. Griss, S. L. Protzko, and H. J. Schünemann. An

- official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 183(6):788–824, 2011. ISSN 1535-4970. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471066>.
- [104] G. Raghu, S.-Y. Chen, W.-S. Yeh, B. Maroni, Q. Li, Y.-C. Lee, and H. R. Collard. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet. Respir. Med.*, 2(7):566–572, jul 2014. ISSN 2213-2619. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70101-8. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213260014701018>.
- [105] F. Reichenberger, J. Schauer, K. Kellner, U. Sack, P. Stiehl, and J. Winkler. Different expression of endothelin in the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary diseases. *Lung*, 179(3):163–174, 2001.
- [106] R. S. Sarker, G. John-Schuster, A. Bohla, K. Mutze, G. Burgstaller, M. T. Bedford, M. Königshoff, O. Eickelberg, and A. Ö. Yildirim. Coactivator-associated arginine methyltransferase-1 function in alveolar epithelial senescence and elastase-induced emphysema susceptibility. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(6):769–781, 2015.
- [107] R. S. J. Sarker, G. John-Schuster, A. Bohla, K. Mutze, G. Burgstaller, M. T. Bedford, M. Königshoff, O. Eickelberg, and A. Ö. Yildirim. CARM1 Regulates Alveolar Epithelial Senescence and Elastase-induced Emphysema Susceptibility. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, page 150423101115002, 2015. ISSN 1044-1549. doi: 10.1165/rcmb.2014-0216OC. URL <http://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2014-0216OC>.
- [108] M. Selman, T. E. King, A. Pardo, and E. Hypotheses. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.*, 134(2):136–151, jan 2001. ISSN 0003-4819. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11177318>.
- [109] M. Selman, V. J. Thannickal, A. Pardo, D. A. Zisman, F. J. Martinez, and J. P. Lynch. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*, 64(4):405–430, jan 2004. ISSN 0012-6667. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969575>.

- [110] M. Selman, A. Pardo, and N. Kaminski. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med.*, 5(3):373–380, 2008. ISSN 15491277. doi: 10.1371/journal.pmed.0050062.
- [111] I. Shahar, E. Fireman, M. Topilsky, J. Grief, Y. Schwarz, S. Kivity, S. Ben-Efraim, and Z. Spirer. Effect of endothelin-1 on α -smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblasts proliferation in interstitial lung diseases. *International journal of immunopharmacology*, 21(11):759–775, 1999.
- [112] D. Sheppard. Transforming growth factor β : a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(5):413–417, 2006.
- [113] D. Shlensky, J. a. Mirrielees, Z. Zhao, L. Wang, A. Mahajan, M. Yu, N. M. Sherer, L. G. Wilke, and W. Xu. Differential CARM1 Isoform Expression in Subcellular Compartments and among Malignant and Benign Breast Tumors. *PLoS One*, 10(6):e0128143, 2015. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0128143. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128143>.
- [114] Z. Simandi, E. Cziza, A. Horvath, A. Koszeghy, C. Bordas, S. Póliska, I. Juhász, L. Imre, G. Szabó, B. Dezsó, E. Barta, S. Sauer, K. Karolyi, I. Kovacs, G. Hutóczki, L. Bognár, Á. Klekner, P. Szucs, B. L. Bálint, and L. Nagy. PRMT1 and PRMT8 Regulate Retinoic Acid-Dependent Neuronal Differentiation with Implications to Neuropathology. *Stem Cells*, 33(3):726–741, 2015. ISSN 10665099. doi: 10.1002/stem.1894. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1894>.
- [115] I. C. Statement. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161(2 Pt 1):646–664, feb 2000. ISSN 1073-449X. doi: 10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673212>.
- [116] J. P. Stewart, J. J. Egan, a. J. Ross, B. G. Kelly, S. S. Lok, P. S. Hasleton, and a. a. Woodcock. The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 159(4 Pt 1):1336–1341, 1999. ISSN 1073-449X.

- URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10194186.
- [117] Y. SUZUKI, H. MIYAKE, M. SAKAI, Y. INUYAMA, J. MATSUKAWA, and K. FUJII. BLEOMYCIN IN MALIGNANT TUMORS OF HEAD AND NECK. *Keio J. Med.*, 18(3):153–162, 1969. ISSN 1880-1293. doi: 10.2302/kjm.18.153. URL <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/kjm1952/18.153?from=CrossRef>.
- [118] J. Tang, J. D. Gary, S. Clarke, and H. R. Herschman. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 273(27):16935–16945, 1998. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.273.27.16935.
- [119] J. Tang, A. Frankel, R. J. Cook, S. Kim, W. K. Paik, K. R. Williams, S. Clarke, and H. R. Herschman. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 275(11):7723–7730, 2000. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.275.11.7723.
- [120] Y. W. Tang, J. E. Johnson, P. J. Browning, R. A. Cruz-Gervis, A. Davis, B. S. Graham, K. L. Brigham, J. A. Oates, J. E. Loyd, and A. A. Stecenko. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, 41(6):2633–2640, 2003. ISSN 00951137. doi: 10.1128/JCM.41.6.2633.
- [121] M. Topalovic, E. Derom, C. R. Osadnik, T. Troosters, M. Decramer, and W. Janssens. Airways resistance and specific conductance for the diagnosis of obstructive airways diseases. *Respir. Res.*, 16(1):88, 2015. ISSN 1465-9921. doi: 10.1186/s12931-015-0252-0. URL <http://respiratory-research.com/content/16/1/88>.
- [122] N. Troffer-Charlier, V. Cura, P. Hassenboehler, D. Moras, and J. Cavarelli. Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J.*, 26(20):4391–4401, 2007. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/sj.emboj.7601855.
- [123] T. Ueda, K. Ohta, N. Suzuki, M. Yamaguchi, K. Hirai, T. Horiuchi, J. Watanabe, T. Miyamoto, and K. Ito. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of

- serum antibodies to hepatitis C virus. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146(1):266–268, 1992. ISSN 0003-0805. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.11.010.
- [124] J. a. J. Vanoirbeek, M. Rinaldi, V. De Vooght, S. Haenen, S. Bobic, G. Gayan-Ramirez, P. H. M. Hoet, E. Verbeken, M. Decramer, B. Nemery, and W. Janssens. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 42(1):96–104, 2010. ISSN 10441549. doi: 10.1165/rcmb.2008-0487OC.
- [125] L. Wang, P. Charoensuksai, N. J. Watson, X. Wang, Z. Zhao, C. G. Coriano, L. R. Kerr, and W. Xu. CARM1 automethylation is controlled at the level of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 41(14):6870–6880, 2013. ISSN 03051048. doi: 10.1093/nar/gkt415.
- [126] S. M. Wang, D. H. Dowhan, N. A. Eriksson, and G. E. O. Muscat. CARM1/PRMT4 is necessary for the glycogen gene expression programme in skeletal muscle cells. *Biochem. J.*, 444(2):323–331, 2012. ISSN 0264-6021. doi: 10.1042/BJ20112033.
- [127] T. Y. W. Wei, C. C. Juan, J. Y. Hisa, L. J. Su, Y. C. G. Lee, H. Y. Chou, J. M. M. Chen, Y. C. Wu, S. C. Chiu, C. P. Hsu, K. L. Liu, and C. T. R. Yu. Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade. *Cancer Sci.*, 103(9):1640–1650, 2012. ISSN 13479032. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02367.x.
- [128] S. S. Wolf. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(13):2109–2121, jul 2009. ISSN 1420-9071. doi: 10.1007/s00018-009-0010-x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19300908>.
- [129] Q. Wu, A. W. Bruce, A. Jedrusik, P. D. Ellis, R. M. Andrews, C. F. Langford, D. M. Glover, and M. Zernicka-Goetz. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem Cells*, 27(11):2637–2645, 2009. ISSN 10665099. doi: 10.1002/stem.131.

- [130] N. Yadav, J. Lee, J. Kim, J. Shen, M. C.-T. Hu, C. M. Aldaz, and M. T. Bedford. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(11):6464–6468, 2003. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1232272100.
- [131] Y. Yang and M. T. Bedford. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 13(1):37–50, jan 2013. ISSN 1474-1768. doi: 10.1038/nrc3409. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235912>.
- [132] Y. Yang, A. Hadjikyriacou, Z. Xia, S. Gayatri, D. Kim, C. Zurita-Lopez, R. Kelly, A. Guo, W. Li, S. G. Clarke, and M. T. Bedford. PRMT9 is a Type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145. *Nat. Commun.*, 6:6428, 2015. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms7428. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25737013>.
- [133] A. O. Yildirim, P. Bulau, D. Zakrzewicz, K. E. Kitowska, N. Weissmann, F. Griminger, R. E. Morty, and O. Eickelberg. Increased protein arginine methylation in chronic hypoxia: role of protein arginine methyltransferases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 35(4):436–443, 2006. ISSN 1044-1549. doi: 10.1165/rcmb.2006-0097OC. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690984>.
- [134] M. Yonemaru, I. Kasuga, H. Kusumoto, A. Kunisawa, H. Kiyokawa, S. Kuwabara, Y. Ichinose, and K. Toyama. Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.*, 10(9):2040–2045, 1997. ISSN 09031936. doi: 10.1183/09031936.97.10092040.
- [135] G. Yu, E. Kovkarova-Naumovski, P. Jara, A. Parwani, D. Kass, V. Ruiz, C. Lopez-Otín, I. O. Rosas, K. F. Gibson, S. Cabrera, et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 186(8):752–762, 2012.
- [136] D. Zakrzewicz, A. Zakrzewicz, K. T. Preissner, P. Markart, and M. Wygrecka. Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs): promising targets for the treatment of pulmonary disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(10):12383–12400, jan 2012. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms131012383. URL

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3497278%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>.

- [137] B. Zhang, S. Dong, R. Zhu, C. Hu, and J. Hou. Targeting protein arginine methyltransferase 5 inhibits colorectal cancer growth by decreasing arginine methylation of eIF4E and FGFR3. *Oncotarget*, 2015.
- [138] J. Zhong, R.-X. Cao, J.-H. Liu, Y.-B. Liu, J. Wang, L.-P. Liu, Y.-J. Chen, J. Yang, Q.-H. Zhang, Y. Wu, W.-J. Ding, T. Hong, X.-H. Xiao, X.-Y. Zu, and G.-B. Wen. Nuclear loss of protein arginine N-methyltransferase 2 in breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin D1 protein. *Oncogene*, 33(48):5546–5558, 2014. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/onc.2013.500. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2013.500>.
- [139] P. Zobel-Thropp, J. D. Gary, and S. Clarke. ??-N-methylarginine is a novel post-translational modification of arginine residues in yeast proteins. *J. Biol. Chem.*, 273(45):29283–29286, 1998. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.273.45.29283.
- [140] C. I. Zurita-Lopez, T. Sandberg, R. Kelly, and S. G. Clarke. Human Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7) Is a Type III Enzyme Forming omega-NG- Monomethylated Arginine Residues. *J. Biol. Chem.*, 287(11):7859–7870, 2012. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.336271.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Oliver Eickelberg für das Vertrauen, die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Laborräume und Materialien sowie die konstruktive Unterstützung bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ali Önder Yildirim für die unermüdliche Betreuung und Hilfestellung bei Planung, Durchführung und Fertigstellung der Doktorarbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft, Geduld und der große wissenschaftliche Erfahrungsschatz, haben ganz wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Überdies möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Christoph Prechtel und Frau Dr. Oana Amarie für die freundschaftliche und gleichzeitig professionelle Zusammenarbeit bei Durchführung der Experimente, sowie die damit verbundenen Vor- und Nachbereitung bedanken, die alleine nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Dr. Gerrit John-Schuster, Jie Jia, Dr. Katrin Kohse und den vielen guten Geistern des iLBD für das angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima sowie die ständige Hilfsbereitschaft in Dingen des täglichen Laborlebens.

Schließlich bin ich ganz besonders meiner gesamten Familie und insbesondere meinen Eltern Dr. Kristina Sauter und Michael Ehlebracht sehr dankbar für die immerwährende moralische und auch finanzielle Unterstützung bei Studium und Doktorarbeit, ohne die die Fertigstellung der Doktorarbeit nur schwerlich möglich gewesen wäre.