

---

**Charakterisierung eines Mausmodells der humanen idiopathischen  
pulmonalen Fibrose: Rolle des alveolären endoplasmatischen Retikulum  
Stresses (ER-Stress)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Smeda, Mohamed, Smaida  
aus Tripolis

Gießen 2025

---

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Zentrum für interstitielle und seltene Lungenerkrankungen

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Günther  
Gutachter: Prof. Dr. Robert Voswinckel

Tag der Disputation: 09.03.2026

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Klinische Grundlagen und pathomechanistische Konzepte der idiopathischen pulmonalen Fibrose .....	1
1.2. Endoplasmatisches Retikulum (ER)- Stress und IPF .....	2
1.3. Der Telomer-Komplex und die IPF .....	5
1.4. Die Rolle respiratorischer Infektionen bei der IPF .....	5
1.5. Aktuelle therapeutische Ansätze bei der IPF .....	8
2. Fragestellung der Arbeit.....	9
3. Material und Methoden .....	10
3.1 Material .....	10
3.1.1 Labortechnische Geräte.....	10
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	11
3.1.3 Verwendete Kits .....	12
3.1.4 Antikörper .....	12
3.1.5 Oligonukleotid-Primer .....	15
3.1.6 Tierversuche .....	17
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Histologie .....	21
3.2.1.1 Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC) .....	21
3.2.1.1.1 Durchführung der Immunhistochemie .....	22
3.2.1.2 Immunfluoreszenzanalyse .....	23
3.2.1.3 Die morphometrische Analyse .....	24
3.2.1.4 Die morphologische Quantifizierung .....	25
3.2.2 Proteinbestimmung.....	26
3.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengeweben .....	26

---

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	27
3.2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Methodik.....	29
3.2.2.5 Analyse der Proteinexpression .....	30
3.2.3 Genexpressionsanalyse.....	31
3.2.3.1 RNA-Extraktion aus den murinen Lungengeweben .....	31
3.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
3.2.3.3 Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription.....	32
3.2.3.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Real Time</i> PCR (qRT-PCR).....	32
3.2.3.5 Messung der Viruslast durch quantitative <i>Real-Time</i> -PCR .....	34
3.2.3 Die statistische Analyse .....	35
4. Ergebnisse .....	36
4.1 Doppelt-transgene Mäuse mit einer spezifischen Chop-Überexpression in den AECII entwickeln eine signifikante Lungenfibrose nach Herpesvirusinfektion .....	36
4.2 Status der pulmonalen ER-Stressreaktion bei mit Herpesvirus infizierten transgenen Chop-Mäusen .....	41
4.3 Erhöhte Apoptose bei Chop-exprimierenden Mäusen, die mit dem Herpesvirus infiziert sind.....	50
4.4 Charakterisierung der pro- und antifibrotischen Reaktion bei mit Herpesvirus infizierten Chop-exprimierenden Mäusen.....	54
4.5 Die mit Herpesviren infizierten Chop-exprimierenden Mäuse zeigten eine erhöhte M2-Makrophagenpolarisation.....	57
5. Diskussion .....	61
Zusammenfassung .....	72
<i>Summary</i> .....	74
Abzürungsverzeichnis .....	76
Abbildungsverzeichnis .....	79
Tabellenverzeichnis.....	81

---

Literaturverzeichnis.....	82
Publikationsverzeichnis.....	92
Ehrenwörtliche Erklärung .....	93
Danksagung.....	94

---

## 1. Einleitung

### 1.1. Klinische Grundlagen und pathomechanistische Konzepte der idiopathischen pulmonalen Fibrose

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronische Lungenerkrankung, die durch eine fortschreitende Vernarbung der Lunge und das radiologische und histologische Bild einer *usual interstitial pneumonia* (UIP) gekennzeichnet ist. Zu den Merkmalen des histopathologischen UIP-Musters gehören zeitliche und räumlich heterogene Fibrose, Ansammlungen von Fibroblasten und Myofibroblasten (Fibroblastenherde) sowie eine übermäßige Ablagerung von unorganisiertem Kollagen und extrazellulärem Matrix (ECM) mit einer daraus resultierenden Verzerrung der normalen Lungenarchitektur, mit oder ohne Bildung von Wabenzysten (Rabeyrin et al., 2015). Die IPF geht mit zunehmendem Husten und Atemnot sowie einer Beeinträchtigung der Lebensqualität einher. IPF betrifft weltweit etwa 3 Millionen Menschen, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter dramatisch zunimmt (Martinez et al., 2017). Internationale Leitlinien empfehlen, die Diagnose von IPF auf multidisziplinärer Ebene zu stellen. Diese erfordert den Ausschluss bekannter Ursachen von interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) und den Nachweis eines UIP-Musters (*honeycomb*). Beim Vorliegen von Wabenzysten und subpleuraler, basal vorherrschender Retikulation mit oder ohne Traktionsbronchiektasie/Bronchiolektase kann die radiologische Diagnose einer „definitiven UIP“ gestellt werden, wodurch die Notwendigkeit einer chirurgischen Biopsie entfällt. Mit einer wahrscheinlichen UIP wird HRCT-Muster beschrieben, bei dem Wabenzysten fehlten, alle anderen verbleibenden Merkmale jedoch vorhanden sind. In diesem Fall schlagen die internationalen Leitlinien vor, eine Bestätigung durch eine bronchoalveoläre Lavage oder eine Biopsie anzustreben (Raghu et al., 2011). Obwohl ein umfassendes Verständnis der IPF-Pathogenese noch immer fehlt, haben die Forschungsanstrengungen der letzten Jahre wichtige Meilensteine erreicht. Genetische und epigenetische Faktoren sind für die Entwicklung der IPF von großer Bedeutung, obwohl der Beitrag der bisher identifizierten Varianten oder ihre Wechselwirkung mit den mutmaßlichen externen Faktoren noch geklärt werden muss. Weiterhin wird vermutet, dass mehrere Umweltfaktoren (z.B. Asbest) und respiratorische Infekte eine

---

wichtige Rolle in der IPF-Pathobiologie spielen. So ist derzeit bekannt, dass respiratorische Infekte oft der Entwicklung einer IPF vorausgehen und deren Verlauf im Rahmen von Exazerbationen beschleunigen können. Die IPF tritt in bis zu 20% aller Fälle familiär gehäuft auf. Bei etwa 40% der familiären Fälle werden bereits relevante Genmutationen (z.B. *SFTPC*, *SFTPB*, *TERT* und *TERC*) beschrieben. Die fibrotische Reaktion bei IPF wird hauptsächlich durch die Schädigung und den Tod von Typ-II-Alveolarepithelzellen (AECII) und die wiederholte Schädigung des regenerierenden Alveolarepithels verursacht, was zu einer Dysfunktion und Dedifferenzierung von AECII, einer fehlerhaften Kommunikation zwischen Epithel und Fibroblasten und der Induktion von ECM-produzierenden Myofibroblasten führt. Hierbei werden im übermäßigen Umfang profibrotische Mediatoren durch AECII und Fibroblasten freigesetzt. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen wie der *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), der Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), der *connective tissue growth factor* (CTGF), der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Endothelin-1 und Faktor X (FX), unter vielen anderen (Bouros et al., 2017; Selman and Pardo, 2020). Die pathologische Fibrogenese, die bei der IPF auftritt, ist ein dynamischer Prozess, der komplexe Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen, Fibroblasten, Immunzellen (Makrophagen, T-Zellen) und Endothelzellen beinhaltet (Wynn, 2011). Darüber hinaus können rekrutierte Alveolarmakrophagen (AM) nach der AECII-Verletzung zur Lungenfibrose beitragen, indem sie apoptotische AECII aufnehmen und anschließend verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren absondern [z. Interleukin (IL)-6, TGF- $\beta$ ] (Kim et al., 2018). Entsprechend ihrem Aktivierungsstatus können Makrophagen in zwei Hauptuntergruppen unterteilt werden: klassische Aktivierung [M1, proinflammatorisch/zytotoxisch, induziert durch T Helfer-Zytokine vom Typ 1 (Th1) Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ] und alternative Aktivierung [M2, entzündungshemmend/Wundreparatur, induziert durch T-Helfer-Zytokine vom Typ 2 (Th2) IL-4 und IL-13] (Mantovani et al., 2004).

## **1.2. Endoplasmatisches Retikulum (ER)- Stress und IPF**

Ein Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist mit der Entwicklung und dem Fortschreiten der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) in Verbindung gebracht worden. ER-Stress wurde erstmals vor mehr als 15 Jahren mit der Pathogenese von IPF

---

in Verbindung gebracht, als krankheitsverursachende Mutationen im Surfactant-Protein C entdeckt wurden, die zu einem fehlgefalteten Genprodukt in den AECII führten. ER-Stress und die ungefaltete Proteinantwort (UPR, *english unfolded protein response*) wurden durch die Regulierung der AEC-Apoptose, des epithelial-mesenchymalen Übergangs, der Myofibroblastendifferenzierung und der M2-Makrophagenpolarisierung mit Lungenfibrose in Verbindung gebracht (Burman et al., 2018b). Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein spezialisiertes Organell, das für die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase oder „Proteostase“ verantwortlich ist. Das ER wird in erster Linie für die Proteinfaltung und die Qualitätskontrolle von Proteinen benötigt, bevor sie ihren intrazellulären oder extrazellulären Bestimmungsort erreichen. Jeder Zustand, der die Proteinverarbeitung stört, kann zur Ansammlung fehlgefalteter Proteine im ER führen – ein Zustand, der als ER-Stress bezeichnet wird. Als Reaktion auf ER-Stress löst die Zelle eine Signalkaskade aus, die als „*Unfolded Protein Response*“ (UPR) bezeichnet wird. Die UPR zielt zunächst darauf ab, die Proteostase wiederherzustellen, kann jedoch bei längerem oder starkem ER-Stress zum Zelltod führen (Tanjore et al., 2012). Mögliche Zusammenhänge zwischen ER-Stress und Lungenfibrose wurden erstmals vor mehr als 15 Jahren identifiziert, als es festgestellt wurde, dass familiäre IPF durch Mutationen im Surfactant-Protein C (*SFTPC*) verursacht werden kann, das von Typ-II-AECs produziert wird (Thomas et al., 2002). Wenn mutierte *SFTPC*-Produkte in Lungenepithelzelllinien exprimiert wurden, führte dies zu einer Akkumulation von fehlgefaltetem Protein im ER und zur Induktion von ER-Stress (Zhong et al., 2010). Die UPR-Signalisierung wird über drei Effektorwege vermittelt, die die Aktivierung der *PKR-like ER-Kinase* (PERK), des *Activating transcription factor 6* (ATF6) und des *Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$*  (IRE1 $\alpha$ ) umfassen. Die Aktivierung des UPR-Signals führt zur Deregulierung der Synthese neuer Proteine und zur erhöhten Produktion von ER-Chaperonen, um die Proteinfaltung zu verbessern, sowie zur Induktion von Komponenten des ER-assoziierten Abbausystems (ERAD) (Kropski and Blackwell, 2018). Das Immunglobulin *heavy chain* Chaperonprotein Bip (auch bekannt als *Glucose-related peptide 78*, GRP78) ist ein Mitglied der Hitzeschockproteinfamilie, das für die UPR-Regulierung von zentraler Bedeutung ist. Unter normalen Bedingungen im ER ist Bip konstitutiv an den drei ER-Sensoren (PERK, ATF6 und IRE1 $\alpha$ ) gebunden und unterdrückt deren Signalübertragung (Wynn, 2007). PERK unterliegt bei der Dissoziation von Bip einer Dimerisierung und Autophosphorylierung, was wiederum zur Phosphorylierung des eukaryontischen



---

Translationsinitiationsfaktors  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) an Ser51 führt, was zu einer globalen Verringerung der mRNA-Translation führt (Bertolotti et al., 2000). Die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung kann jedoch auch die Translation ausgewählter mRNAs erhöhen, einschließlich des *Activating transcription factor 4* (ATF4) (Gardner and Walter, 2011). ATF4 erhöht dann die Expression von ATF3, was wiederum die Expression von Genen fördert, die mit antioxidativen Reaktionen, Aminosäuresynthese und Autophagie zusammenhängen (Zhao et al., 2016). Nach seiner Freisetzung aus Bip wird ATF6 zum Golgi-Apparat transportiert, wo es einen Spaltungsvorgang durchläuft, der die zytosolische Domäne freisetzt. Diese aktivierte Form von ATF6 dringt in den Zellkern ein und verstärkt die Transkription von Zielgenen, einschließlich der ER-Chaperone Bip, GRP94, Calreticulin und Komponenten des ER-assoziierten Abbausystems (ERAD) (Ye et al., 2000). Aktiviertes IRE1 $\alpha$  besitzt eine Endoribonukleaseaktivität, die zur selektiven Entfernung von 26 Basenpaaren aus der mRNA führt, die den Transkriptionsfaktor X-Box-Protein-1 (XBP1) kodiert, wodurch eine transkriptionell aktive Form (XBP1s) entsteht. XBP1s wandert dann in den Zellkern, wo es die Transkription von Komponenten des ERAD-Systems fördert, einschließlich des ER-Abbau-verstärkenden  $\alpha$ -Mannosidase-ähnlichen Proteins (EDEEM) (Hollien et al., 2009). Diese drei Arme der UPR-Signalübertragung arbeiten zusammen, um die zelluläre Homöostase bei ER-Stress aufrechtzuerhalten. Unter schwerem oder längerem ER-Stress kann dieser Prozess jedoch maladaptiv werden und zelluläre Funktionsstörungen und die Apoptose begünstigen. ER-Stress kann proapoptotische Signale über jeden der drei Arme der UPR-Kaskade auslösen. Die ATF4-Induktion stromabwärts von PERK kann das homologe C/EBP-Protein (CHOP) aktivieren, einen gut untersuchten Auslöser der Apoptose (Hetz and Saxena, 2017). IRE1 $\alpha$ - und ATF6-Signalwege können in manchen Situationen auch zur CHOP-Induktion beitragen (Kim et al., 2008). Bei der Induktion und Kerntranslokation reguliert CHOP die Transkription von proapoptotischen Faktoren wie BH-3 only (BIM) und *Death Receptor 5* (DR5) (Yoshida, 2007) hoch und reguliert antiapoptotische Gene wie B-Zell-Leukämie/ Lymphom-2-Protein (BCL2) runter (McCullough et al., 2001). Die Induktion und nukleare Überexpression von CHOP in AECII ist ein herausragendes Merkmal in IPF-Lungen und wird zusammen mit anderen ER-Stressmarkern wie ATF4, ATF6 und XBP1 sowie der Caspase-3-Aktivierung nachgewiesen (Korfei et al., 2008).

---

### 1.3. Der Telomer-Komplex und die IPF

Telomere-Dysfunktion und Telomeren-assoziierte Genmutationen spielen auch eine Rolle in der Pathogenese von Lungenfibrose. Telomere sind repetitive Nukleotidsequenzen, die die Enden der Chromosomen bedecken. Telomere spielen eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung der Chromosomenenden, um eine fortschreitende Verkürzung während der Zellreplikation zu verhindern. Die Aufrechterhaltung der Telomere beruht auf einer komplexen Interaktion zwischen dem Shelterin-Komplex (Endschutz), dem Telomerase-Komplex (Verlängerung), dem CST-Komplex (Abdeckung) und verschiedenen Transportelementen (Wu et al., 2017). Seltene und äußerst seltene Varianten in den Genen im Telomer-Erhaltungsweg, einschließlich derjenigen, die die Telomerase-Enzymaktivität (*TERT*, *TERC*), die Telomerase-RNA-Biogenese (*NAF1*), die Reifung (*PARN*) und den Transport (*DKC1*, *TCAB1*) sowie die DNA-Helikase-Aktivität (*RTEL1*) und die Shelterin-Funktion (*TINF2*) beeinflussen, führen zu einer vorzeitigen Verkürzung der Telomerlänge in somatischen Zellen (MacNeil et al., 2016). Häufige Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), insbesondere bei *TERT* und *TERC*, wurden ebenfalls mit verkürzten Telomeren in Verbindung gebracht (Codd et al., 2013). Unabhängig davon, ob es sich bei der Telomer-assoziierte Mutation um eine häufige SNP oder um eine seltene oder extrem seltene Variante handelt, tritt die Zelle beim Unterschreiten einer kritischen Telomerenlänge in die Apoptose ein. Zellen in Systemen mit höheren lebenslangen Replikationsanforderungen – Lunge, Knochenmark, Magen-Darm-Trakt und Leber – können diese Schwelle früher erreichen, was zu einer Organfunktionsstörung führt. Telomere-assoziierte Mutationen und kurze Telomere sind an der Pathogenese einer Reihe von ILDs beteiligt. Armanios und Kollegen fanden bei 8% der Probanden mit familiärer IPF *TERT*- und *TERC*-Mutationen (Armanios et al., 2007). In größeren Kohorten mit sporadischer IPF haben etwa 25 % der Patienten Telomerlängen unter dem 10. Perzentil und etwa 10 % haben Telomere-assoziierte Mutationen, am häufigsten bei *TERT* (Petrovski et al., 2017).

### 1.4. Die Rolle respiratorischer Infektionen bei der IPF

In den letzten Jahren wurde dem Zusammenhang zwischen viralen respiratorischen Infektionen und Lungenfibrosen immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt, insbesondere

---

nach dem Ausbruch von SARS-CoV-2 im Jahr 2020. Viren können über die folgenden Wege Lungenfibrose auslösen. 1) Eine Virusinfektion führt zu einer direkten Schädigung des respiratorischen Epithels. Bei den meisten Virusinfektionen verursacht das Virus eine sofortige und direkte Schädigung der Lunge. Zu diesem Zeitpunkt ist die Wundheilungsreaktion aktiviert, das Virus verursacht jedoch anhaltende Lungenschäden, eine abnormale Wundheilung und eine Störung der stammzell-vermittelten Regeneration, was zur Entwicklung einer Lungenfibrose führt. 2) Eine Virusinfektion verursacht eine immunvermittelte Schädigung. Nach einer Verletzung befindet sich die Lunge in einem Zustand entzündlicher Infiltration. Die Virusinfektion aktiviert das Immunsystem. Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Th2-Zellen aggregieren an der Verletzungsstelle und setzen eine große Anzahl proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine/Faktoren frei wie TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), und Interleukine (IL)-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 und IL-17. Die Kombination des Virus und dieser Faktoren führt zu anhaltenden und erheblichen Lungenschäden und begünstigt die Entwicklung einer Lungenfibrose (Huang and Tang, 2021). Herpesvirus-Infektionen haben als ätiologischer oder verschlimmernder Faktor von IPF eine große Aufmerksamkeit erhalten, da Herpesviren eine akute Infektion verursachen und eine lebenslange Latenzzeit im Wirt bewirken können, mit der Möglichkeit einer Reaktivierung in die lytische Replikationsphase. Herpesviren wurden häufiger in Lungenproben von IPF-Patienten identifiziert (Tang et al., 2003). Yonemaru et al. fanden einen Anstieg der CMV-Immunglobulin (Ig) G- und Komplementfixierungstiter bei negativem CMV-IgM bei idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) oder interstitieller Pneumonie, was darauf hindeutet, dass eine CMV-Infektion mit der Entwicklung einer Lungenfibrose verbunden sein kann (Yonemaru et al., 1997). Li et al. fanden heraus, dass CMV-infizierte Mäuse keine Lungenfibrose entwickelten. Allerdings führte die zusätzliche CMV-Infektion zur Verschlimmerung der Lungenfibrose bei den mit Bleomycin behandelten Mäusen, nicht jedoch bei den Kontrollmäusen. Sie stellten auch einen Anstieg von Vimentin und Phospho-Smad2 auf Proteinebene fest (Li et al., 2016). Neben CMV werden auch andere Herpesviren mit Lungenfibrose in Verbindung gebracht, beispielsweise EBV und MHV68. Ankermann et al. berichteten, dass ein 12 Monate altes immunkompetentes Mädchen nach einer EBV-Infektion eine unspezifische interstitielle Lungenerkrankung und Lungenfibrose aufwies (Ankermann et al., 2003). In EBV-infizierten Epithelzellen beobachteten Malizia et al. eine erhöhte TGF- $\beta$ -Expression

---

und eine Ganciclovir-Therapie reduzierte dessen Expression (Malizia et al., 2008). Mora et al. zeigten, dass eine MHV-68-Infektion bei IFN- $\gamma$ -KO Mäusen zu Epithelschäden, Entzündungsreaktionen und Kollagenansammlungen führt und sich allmählich zu einer fortschreitenden interstitiellen Fibrose entwickelt. Zu den Zytokinprofilen und histopathologischen Merkmalen der Mäuse nach der Infektion gehörten eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$  und IL-13, ein Ungleichgewicht von Th1- und Th2-Zytokinen, Myofibroblastenherde, Hyperplasie von Alveolarepithelzellen vom Typ II und Gefäßveränderungen. Darüber hinaus fiel das erhöhte Expressionsniveau von TGF- $\beta$  mit dem Fortschreiten der Lungenfibrose zusammen (Mora et al., 2005). In einer Studie wurde die DNA von vier Herpesviren (CMV, EBV, HHV-7 und HHV-8) in der Lunge von 32 aus 33, nicht ausgewählten, Patienten mit familiärer oder sporadischer IPF entdeckt: eine Häufigkeit, die viel höher ist als die in den Lungen der Kontrollpersonen mit anderen Krankheiten (Tang et al., 2003). Das murine Gammaherpesvirus-68 (MHV68) ist ein gutes Modell für eine Infektion mit dem humanen pulmonalen Herpesvirus, da MHV68 eng mit den humanen Gammaherpesviren EBV, HHV-8 und KSHV verwandt ist. Eine intranasale Infektion von Mäusen mit MHV-68 führt zu einer lytischen Infektion von AECs, gefolgt von einer Infektion verschiedener Zelltypen, die an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind, darunter Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. Nach der Beseitigung einer akuten lytischen MHV68-Infektion wird beobachtet, dass eine latente Virusinfektion in AECs, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten infizierter Lungen verbleibt, zusätzlich zur Etablierung einer Milzlatenz im B-Zell-Kompartiment. (Nash et al., 2001). Es wurde zuvor gezeigt, dass die lytische Replikation und Reaktivierung von MHV68 für die Entwicklung einer Lungenfibrose bei infizierten Mäusen erforderlich ist, denen der Interferon-Gamma-Rezeptor (IFN- $\gamma$ ) fehlt (Mora et al., 2007). Bei diesen Mäusen spielte die Anhäufung alternativ aktivierter M2-Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese (Gangadharan et al., 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ältere – aber nicht junge C57Bl/6-Mäuse – eine Lungenfibrose als Reaktion auf eine MHV68-Infektion entwickelten. In dieser Studie waren AECII alter infizierter Mäuse schwerem ER-Stress und Apoptose ausgesetzt und es wurde eine erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  in Makrophagen alter infizierter Tiere beobachtet (Torres-González et al., 2012).

---

## 1.5. Aktuelle therapeutische Ansätze bei der IPF

Die Ziele des IPF-Managements bestehen darin, die Symptome zu lindern, den Gesundheitszustand zu verbessern, die Lungenfunktion zu erhalten, eine ausreichende Sauerstoffversorgung mit zusätzlichem Sauerstoff (bei Bedarf) aufrechtzuerhalten, unerwünschte Ereignisse der Therapie zu minimieren, die Häufigkeit akuter Exazerbationen zu reduzieren und im Idealfall das Überleben zu verbessern (Martinez et al., 2017). Das Fortschreiten der Krankheit wird durch den Einsatz von Lungenfunktionstests, insbesondere der forcierten Vitalkapazität (FVC) und dem 6-Minuten-Gehtest (6MWT), überwacht (Kishaba, 2019). Derzeit gibt es keine Heilung für IPF. Allerdings verlangsamen die beiden zugelassenen antifibrotischen Wirkstoffe Nintedanib und Pirfenidon den Abfall der FVC, verhindern akute Exazerbationen und das Fortschreiten der Krankheit und verlängern das Überleben (Kishaba, 2019). Angesichts des fortschreitenden Charakters der Erkrankung ist eine Lungentransplantation der einzige kurative Ansatz bei Patienten mit fortgeschrittener IPF. Angesichts des unterschiedlichen Krankheitsverlaufs und des Auftretens akuter Exazerbationen wird eine frühzeitige Überweisung zur Lungentransplantation empfohlen (Kistler et al., 2014). Das Management von IPF ist vielfältig und umfasst die Zusammenarbeit verschiedener Mitglieder des Gesundheitsteams, um Patientenaufklärung und -unterstützung, Impfungen sowie die Behandlung von Symptomen, Komorbiditäten und Palliativpflege bereitzustellen (Raghu and Richeldi, 2017). Laut CDC sollten Patienten mit Lungenerkrankungen Impfungen gegen Influenza, SARS-CoV-2, Pneumokokken, Zoster sowie Tetanus-Diphtherie- und Pertussis (Tdap) erhalten. Beratung zur Raucherentwöhnung sollte bei Patienten mit IPF hohe Priorität haben (Glassberg, 2019). Neben der individuellen Beratung können Apotheker Patienten unterstützen, indem sie Ressourcen für genaue Informationen, Patientenselbsthilfegruppen, Lungenrehabilitation und gemeindebasierte Konferenzen empfehlen (Raghu and Richeldi, 2017). Die Aufklärung der Patienten sollte zum Zeitpunkt der Diagnose beginnen und während des gesamten Krankheitsverlaufs fortgesetzt werden.

---

## 2. Fragestellung der Arbeit

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen pathomechanistischen Rolle von AECII-ER-Stress bei der Lungenfibrose wurden in der Forschergruppe Lungenfibrose der Universität Gießen transgene Mäuse mit AECII-spezifischer konditionaler Überexpression von Chop (SP-C rtTA/tetO7 Chop) erzeugt. Trotz robuster nuklearer Chop-Expression (mit 28-tägiger Transgen-Induktion durch Doxycyclin) und Apoptose in AECII entwickelten diese Mäuse keine Lungenfibrose, obwohl eine signifikante Hochregulierung der profibrotischen Marker beobachtet wurde. Wir vermuteten daher, dass die „Chop-Mäuse“, ähnlich wie bei Patienten mit IPF, ein Individuum mit einem anfälligen Alveolarepithel darstellen, das als Reaktion auf einen zweiten Stimulus dazu neigt, eine Lungenfibrose zu entwickeln.

Wir stellten die Hypothese auf, dass die Instillation von MHV68 in die Atemwege bei Mäusen mit AECII-spezifischer Chop-Überexpression zu einer chronischen Herpesvirus-Lungeninfektion mit schwerer AECII-Schädigung und fortschreitender Lungenfibrose führen würde. Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Lungen der doppelt-transgenen SP-C rtTA/tetO7-Chop-Mäuse mit Transgen-Induktion und Herpesvirusinfektion histologisch und biochemisch zu charakterisieren, um die Pathomechanismen, die letztendlich zur Entwicklung einer Fibrose führen, zu identifizieren.

In dieser Arbeit werden ER-Stress Marker (Chop, Xbp1s, Grp78, Grp94, Trb3, Atf3 und Dr5), profibrotische Marker (Mmp2, Pai-1, Smad3, Ap-1/Jun, Vimentin, Ctgf, Tgf- $\beta$ , Stat-3 und Cyclin D1), Apoptose Marker (gespaltene Kaspase 3, gespaltene Kaspase 9 und gespaltene Parp-1), inflammatorische und Makrophagen Marker (Ccl2, Interferon- $\gamma$ , Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-13 CD206 und Arginase-1) und epithelassoziierten Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) auf Proteinebene mit Immunoblots, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz und auf mRNA-Ebene mit qPCR (RT-PCR) untersucht. Zur Quantifizierung des fibrotischen Umbaus in der Histologie wurde eine morphometrische Analyse durch ein bildanalytisches Verfahren (SeMeLuG Modul der Axiovision Software) durchgeführt.

---

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Labortechnische Geräte

- Axio Observer.Z1 fluorescence microscope  
Carl Zeiss Microimaging,  
Germany
- Chemiluminiszenz-Imager Intas Chemostar  
Intas, Göttingen
- Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN 3 Cell  
Bio-Rad, Hercules, USA
- Heizschränke und Heizblöcke:
  - Heraeus Function line  
Thermo Scientific, USA
  - MHL 23 Heiz-ThermoMixer  
DITABIS AG, Pforzheim
- Homogenisator Precellys 24  
Bertin Technologies, Frankreich
- Mikroplatten-Reader Infinite 200 PRO  
Tecan, Männedorf, Schweiz
- Mikroskop Axiovert 25  
Zeiss, Oberkochen
- Mikrowelle HMT84M451 Serie 4900 W  
Bosch, Gerlingen
- Mirax Desk  
Zeiss, Oberkochen
- Mx3000P qPCR System  
Agilent Technologies, USA
- NanoDrop 2000c  
Peqlab, Erlangen
- NanoZoomer 2.0RS  
Hamamatsu, Japan
- Netzteile:
  - Consort EV231  
Roth, Karlsruhe
  - Consort EV2310  
Roth, Karlsruhe
- PCR-Cycler:
  - T100 Thermal Cycler  
Bio-Rad, Hercules, USA
  - MJ Mini Bio-Rad,  
Hercules, USA
- Pipetten:
  - Research 200  
Eppendorf, Hamburg
  - Research plus 1000, 100, 10  
Eppendorf, Hamburg
- Pipetus  
Hirschmann

- 
- SevenCompact pH meter S220 Mettler-Toledo, Columbus USA
  - Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad, Hercules, USA
  - Vortexer, Schüttler und Rührer:
    - Vortex-Genie 2 Scientific Industries, Inc., USA
    - Schüttler Duomax 1030 Heidolph, Schwabach
    - Cat RM5 Neolab, Heidelberg
    - IKA RH basic 2 Janke und Kunkel, Staufen
    - MR 2002 Heidolph, Schwabach
  - Waage PB 801 Mettler-Toledo, Columbus, USA
  - Zentrifugen:
    - ROTINA 420R Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
    - MIKRO 200R Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
    - Galaxy Mini Star Silverline Centrifuge VWR International, USA
    - Heraeus Pico 21 Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- 2-Mercaptoethanol  $\geq 99.0\%$  Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Albumin Fraktion V Roth, Karlsruhe
- Citronensäure Monohydrat  $>99,5\%$  Roth, Karlsruhe
- DAPI Sigma-Aldrich D9542
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Merck KGaA, Darmstadt
- Fluorescence Mounting Medium Dako S3023
- Glycergel Mounting Medium Dako, Hamburg
- Glycin PUFFERAN  $\geq 99\%$  Roth, Karlsruhe
- Haemalaun, sauer nach Mayer Waldeck GmbH & Co. KG
- Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x) Thermo scientific, USA
- Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat Merck Millipore, USA
- Immobilon-P PVDF Transfer Membranes Merck Millipore, USA
- Kaliumchlorid Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat Merck KGaA, Darmstadt
- LE Agarose Biozym Scientific



- 
- Milchpulver Roth, Karlsruhe
  - Natriumchlorid >99,5 % Roth, Karlsruhe
  - Natriumcitrat tribasisch Dihydrat Sigma-Aldrich, Taufkirchen
  - PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific, USA
  - RNase Inhibitor Applied Biosystems, USA
  - Rotiphorese Gel 30 Roth, Karlsruhe
  - SDS Pellets  $\geq 99\%$  Roth, Karlsruhe
  - SmartLadder Eurogentec, Köln
  - TEMED Roth, Karlsruhe
  - TRIS PUFFERAN  $\geq 99,9\%$  Roth, Karlsruhe
  - Tween 20 Roth, Karlsruhe

### 3.1.3 Verwendete Kits

- NucleoSpin RNA Plus Macherey-Nagel, Düren
- Omniscript RT Kit QIAGEN N.V, Niederlande
- PowerUp SYBR Green Master Mix for RT-PCR Applied Biosystems, USA
- ZytoChem AP-Fast Red Kit Broad Spectrum Zytomed Systems, Berlin
- ZytoChem HRP-DAB Kit Broad Spectrum Zytomed Systems, Berlin
- ZytoChem Plus (AP) Broad Spectrum (Permanent Red) Zytomed Systems, Berlin

### 3.1.4 Antikörper

Für die Durchführung von der Immunhistochemie und Western-Blot wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

Primärantikörper	Hersteller und Nummer	Verdünnung
Primärantikörper gegen IL-6	xxxxx	1:200
Rabbit monoclonal anti-Chop	CST 5554	1:75
Rabbit monoclonal anti-Mmp2	Abcam 92536	1:200
Rabbit monoclonal anti-Ttf1	Abcam 76013	1:200

Rabbit monoclonal anti-Vimentin	Abcam 92547	1:300
Rabbit polyclonal anti-Arginase	Abcam 91279	1:200
Rabbit polyclonal anti-Grp78	Abcam 21685	1:1000
Rabbit polyclonal anti-Mannose Receptor	Abcam 64693	1:1000
Rabbit polyclonal anti-proSP-C	Merck Millipore AB3786	1:800
Rabbit polyclonal anti-Xbp-1	Santa Cruz sc-7160	1:50
Rat monoclonal anti-F4/80	BIO-RAD MCA497GA	1:50
Rat monoclonal anti-Tgf- $\beta$	BD Biosciences 555052	1:75
Rat monoclonal IgG anti-Grp94	Santa Cruz sc-32249	1:100

**Tabelle 3.1: eingesetzte Primärantikörper für die Immunhistochemie und ihre Verdünnungen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller und Nummer</b>	<b>Verdünnung</b>
Goat polyclonal anti-Ctgf	Santa Cruz sc-14939	1:300
Goat polyclonal anti-Human uPA/Urokinase	R&D Systems AF1310	1:1000
Goat polyclonal IgG anti-Hgf	R&D Systems AF2207	1:300
Goat polyclonal IgG anti-Mmp7	R&D System AF907	1:750
Rabbit monoclonal anti- Phospho-smad3	CST 9520S	1:250
Rabbit monoclonal anti-Chop	CST 5554	1:300
Rabbit monoclonal anti-Cleaved Caspase-3	CST 9664S	1:300
Rabbit monoclonal anti-Cleaved Parp1	Abcam 32064	1:500
Rabbit monoclonal anti-Mmp2	Abcam 92536	1:1000
Rabbit monoclonal anti-Xbp-1s	CST 12782S	1:300
Rabbit monoclonal IgG anti- Phospho-Stat3	CST 9145	1:300
Rabbit monoclonal IgG anti-Stat3	CST 12640	1:500

Rabbit polyclonal anti-Arginase	Abcam 91279	1:1000
Rabbit polyclonal anti-Caspase-9	CST 9504S	1:300
Rabbit polyclonal anti-c-Jun	Abcam 31419	1:300
Rabbit polyclonal anti-Grp78	Abcam 21685	1:500,000
Rabbit polyclonal anti-Mature-SP-C	Seven Hills Bio. WRAB-76694	1:1000
Rabbit polyclonal anti-Pai-1	Santa Cruz sc-8979	1:200
Rabbit polyclonal anti-proSP-C	Merck Millipore AB3786	1:2000
Rabbit polyclonal anti-Surfactant Protein A	Abcam 115791	1:500
Rabbit polyclonal anti- $\beta$ Actin	Abcam 8227	1:1500
Rat monoclonal IgG anti-Grp94	Santa Cruz sc-32249	1:500

**Tabelle 3.2: eingesetzte Primärantikörper für die Immunoblotanalyse und ihre Verdünnungen.**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor <sup>TM</sup> 555 Tyramide SuperBoost <sup>TM</sup> Kit, goat anti-rabbit IgG	Thermo Fischer scientific
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Conjugate)	CST 4412
Polyclonal rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako P0160
Polyclonal rabbit Anti-Rat IgG H&L/HRP	Abcam 6734
Polyclonal swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako P0217

**Tabelle 3.3: eingesetzte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse und Immunoblotanalyse.**

### 3.1.5 Oligonukleotid-Primer

Primer und Sonden für die virale gB-DNA-Analyse, die in Taqman qPCR verwendet werden, werden in der (Tabelle 3.4) dargestellt.

Gene (MHV68)	Forward primer	Reverse primer
<i>gB</i>	5'-GGCCCAAATTCAATTTGCCT-3'	5'-CCCTGGACAACCTCCTCAAGC-3'
probe	5'-6FAM-ACAAGCTGACCACCAGCGTCAACAAC-TAMRA-3'	
Gene (mouse)	Forward primer	Reverse primer
<i>Rpl8</i>	5'-CATCCCTTTGGAGGTGGTA-3'	5'-CATCTCTTCGGATGGTGGTA-3'
probe	5'-6FAM-ACCACCAGCACATTGGCAAACC-TAMRA-3'	

Tabelle 3.4: Primer und Sonden für die virale gB-DNA-Analyse, die in Taqman qPCR verwendet werden.

Die Primer für die RT- qPCR wurden mit Hilfe der GeneFisher-Software (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>) abgeleitet und von der Firma *metabion international AG* hergestellt (Tabelle 3.5).

Gene (mouse)	Forward primer	Reverse primer
<i>Actb</i>	5'-CTACAGCTTCACCACCACAG-3'	5'-CTCGTTGCCAATAGTGATGAC-3'
<i>Arg1</i>	5'-GGAACCCAGAGAGAGCATGA-3'	5'-TTTTTCCAGCAGACCAGCTT-3'
<i>Atf3</i>	5'-ACAACAGACCCCTGGAGATG-3'	5'-CCTTCAGCTCAGCATTACACA-3'

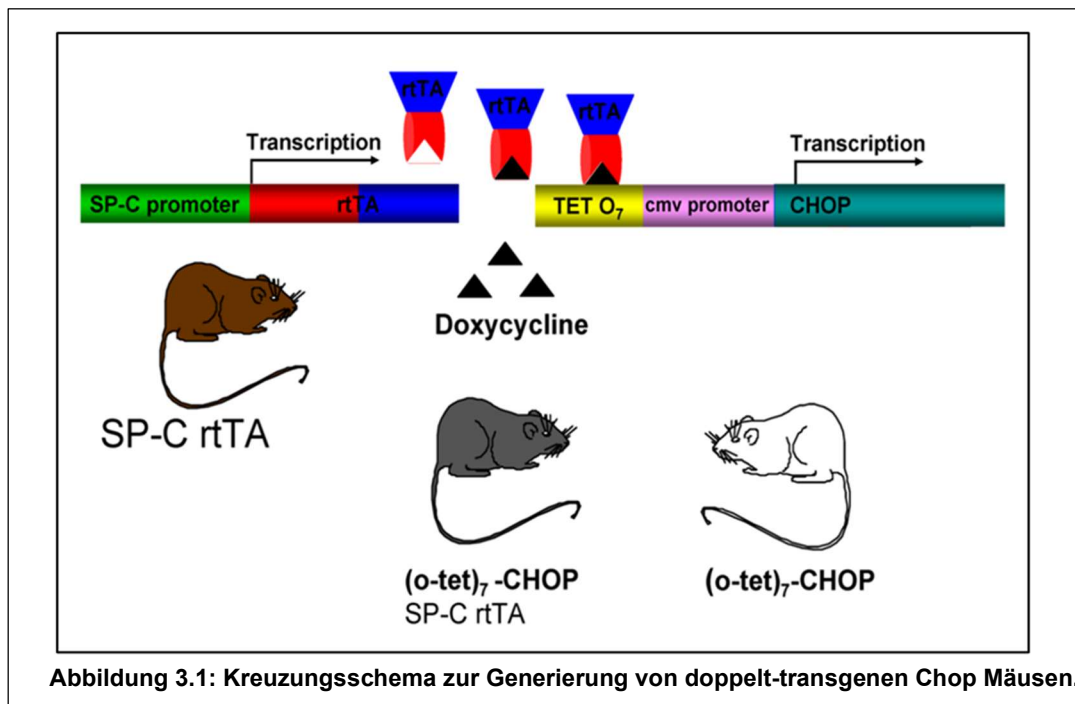
<i>Ccl2</i>	5'-CTGGATCGGAACCAAATGAG-3'	5'-CGGGTCAACTTCACATTCAA-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-ATGTTTCGTGGCCTCTAAGATG-3'	5'-GCGGATGGTCTGCTTGTTTC-3'
<i>Chop</i>	5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAG-3'	5'-GTCAGGCGGTTCGATTTCC-3'
<i>Ctgf</i>	5'-CTGGTCCAGACCACAGAGTG-3'	5'-TGA ACTCCACTGGCAGAGTG-3'
<i>Dr5</i>	5'-CTAGGCCTCTGGATAGGACTC-3'	5'-GGAGTCAAAGGGCACTATGTC-3'
<i>Gadd34</i>	5'-CCAGGACAAGATGATCTTAGAG-3'	5'-CAGCAGAAGCTTGGTAAGTC-3'
<i>Grp78</i>	5'-AGCCATCCCGTGGCATAA-3'	5'-GGACAGCGGCACCATAGG-3'
<i>Grp94</i>	5'-GGATGGTCTGGCAACATGGA-3'	5'-CCGAAGCGTTGCTGTTTCAA-3'
<i>Ifng</i>	5'-GGCCATCAGCAACAACATAAGCGT-3'	5'-TGGGTTGTTGACCTCAA ACTTGGC-3'
<i>Il1b</i>	5'-AAGGAGAACCAAGCAACGACAAA-3'	5'-TGGGGA ACTCTGCAGACTCAAAC-3'
<i>Il6</i>	5'-GTCGGAGGCTTAATTACACATG-3'	5'-GTAGCTATGGTACTCCAGAAGAC-3'
<i>Il13</i>	5'-TGAGGAGCTGAGCAACATCACACA-3'	5'-TGCGGTTACAGAGGCCATGCAATA-3'
<i>Mmp2</i>	5'-ATCCACGGTTTCAGGGTCC-3'	5'-ATCGAGACCATGCGGAAGC-3'
<i>Nlrp3</i>	5'-TGGATCTTTGCTGCGATCAAC-3'	5'-GAGGTCCACACTCTCACCTAG-3'
<i>Pai1</i>	5'-AGGTCAGGATCGAGGTAACGAG-3'	5'-GGATCGGTCTATAACCATCTCCGT-3'
<i>Sftpa</i>	5'-CGGAGAGCGTGGAGAAAGG-3'	5'-GAGTCTGGCCTTCAATCACAC-3'

<i>Sftpb</i>	5'-GGAAGATGCTTTCCAGGAAGC-3'	5'-TGCTCAGAGAAGTCCTGAGTG-3'
<i>Sftpc</i>	5'-TACTGAGATGGTCCTTGAGATG-3'	5'-GGAAGAATCGGACTCGGAAC-3'
<i>Sftpd</i>	5'-AAGCGGGCTTCCAGACAGTG-3'	5'-TGAACCTGCCCTCTGTGCCC-3'
<i>Tnfa</i>	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>Trb3</i>	5'-AAGCTGGTGCTGGAGAACC-3'	5'-GAGCAGGACTGGCTCAGAG-3'
<i>Xbp1 (spliced)</i>	5'-AGCTTTTACGGGAGAAACTCA-3'	5'-GCCTGCACCTGCTGCG-3'

**Tabelle 3.5: Primer für die quantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR.**

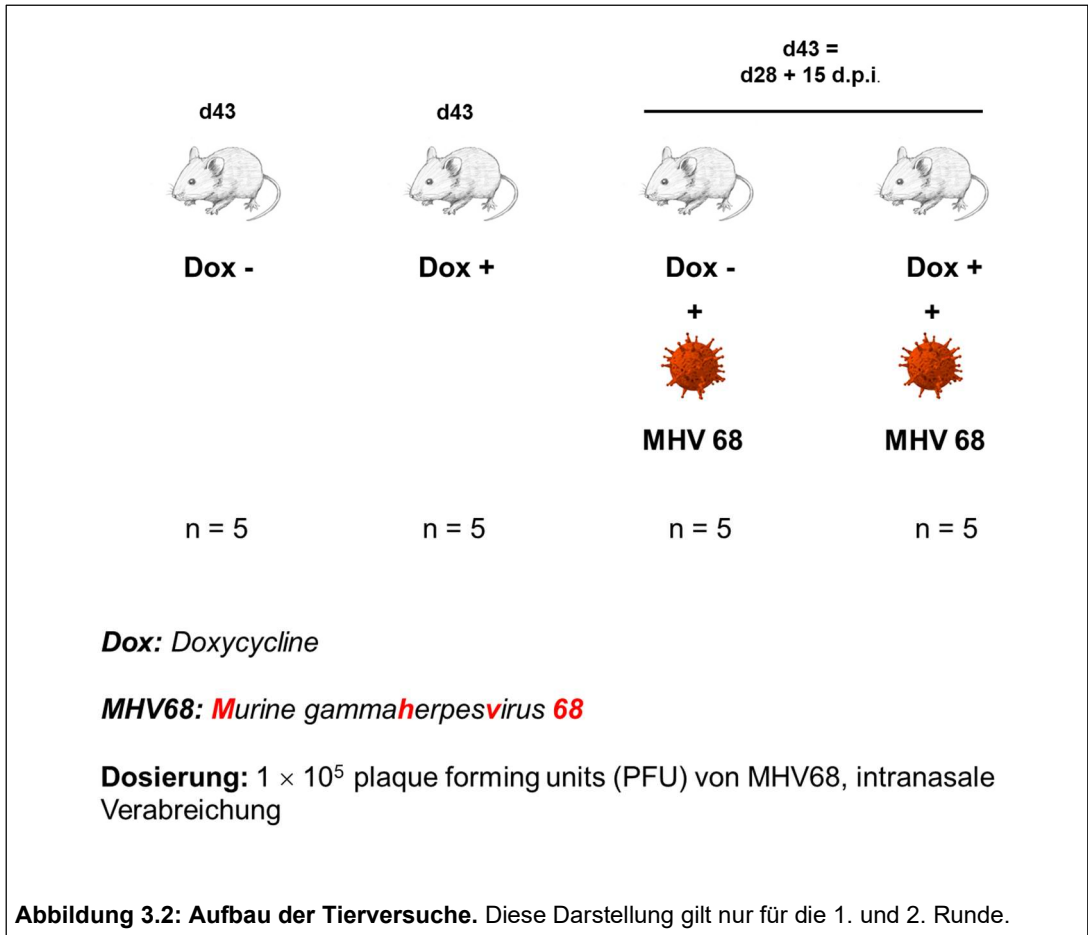
### 3.1.6 Tierversuche

Für die Durchführung der Experimente wurden doppelt transgene Mäuse mit AECII-spezifischer, induzierbarer Expression von Chop verwendet. Die Transgen-Induktion erfolgte durch Verwendung des Tetracyclin-On/Off-Systems [SP-C rtTA/(tetO)7-Chop] verwendet haben. (Abb 3.1). In dieser Arbeit wurde die Chop-Überexpression in den AECII durch Doxycyclin induziert. Die Tierversuche wurden gemäß der Helsinki-Konvention für die Verwendung und Pflege von Tieren in der klinischen Forschungsgruppe Lungenfibrose (UGMLC, University of Giessen and Marburg Lung Center, Leiter: Prof. Dr. Andreas Günther) durchgeführt und von der Kommission für Tierversuche der Justus-Liebig-Universität und den lokalen Behörden für Tierversuche genehmigt (Regierungspräsidium Gießen, Hessen, Deutschland, Gz.: V 54-19 c 20 15 h 01 GI 20/10 Nr. 19/2015 und V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/10 Nr. G 76/2019).



Transgene Mäuse wurden 28 Tage lang mit Standardfutter (Dox-) oder Doxycyclin-Futter (Dox+) gefüttert und am 28. Tag intranasal mit  $5 \times 10^4$  plaque forming units (PFU) MHV68 in 30  $\mu$ L steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) infiziert, unter Anästhesie mit Medetomidine-Midazolam-Fentanyl. Nicht infizierte transgene Dox- und Dox+ Mäuse dienten als Kontrollen. Mäuselungen wurden 15 Tage nach der Infektion mit MHV68 (d.p.i.) zur Analyse der Viruslast sowie für allgemeine mRNA-, Protein- und immunhistochemische (IHC) Analysen entnommen. Wichtig ist, dass transgene (Dox+) Mäuse während der gesamten Dauer des Experiments mit Doxycyclin gefüttert wurden, um die Transgeninduktion aufrechtzuerhalten. Jedes Tierexperiment dauerte 43 Tage, insgesamt wurden 3 Runden durchgeführt. In der 1. und 2. Runde gab es 5 Mäuse pro Gruppe (Dox-; Dox+; Dox-/MHV68; Dox+/MHV68). In der 3. Runde gab es 6 Mäuse pro Gruppe bis auf die Gruppe (Dox-) mit 5 Mäusen (Abb. 3.2 und Tabelle 3.6).

Diese Tierversuche wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Heiko Adler im Helmholtz-Zentrum München gemäß der Helsinki-Konvention zur Verwendung und Pflege von Tieren durchgeführt und vom örtlichen Tierschutzausschuss genehmigt (Regierung von Oberbayern, Gz.: 55.2-1-54-2532-154-2013).



Maus-Gruppe	Maus-Nummer	1. Runde			2. Runde			3. Runde			
		H	P	G	H	P	G	H	P	G	
<b>Dox+/MVH68</b>	1	✓	X	X	✓	X	X	<b>Dox+/MVH68</b>	✓	X	X
	2	✓	X	X	✓	X	X		✓	X	X
	3	✓	X	X	X	✓	✓		X	✓	✓
	4	✓	X	X	X	✓	✓		X	✓	✓
	5	✓	X	X	X	✓	✓		X	✓	✓
<b>Dox+</b>	6	✓	X	X	✓	X	X	<b>Dox+</b>	X	✓	✓
	7	✓	X	X	✓	X	X		✓	X	X
	8	✓	X	X	X	✓	✓		✓	X	X
	9	✓	X	X	X	✓	✓		✓	X	X
<b>Dox-/MHV68</b>	10	✓	X	X	X	✓	✓	<b>Dox-/MHV68</b>	X	✓	✓
	11	✓	X	X	✓	X	X		X	✓	✓
	12	✓	X	X	✓	X	X		X	✓	✓
	13	✓	X	X	X	✓	✓		✓	X	X
	14	✓	X	X	X	✓	✓		✓	X	X
<b>Dox-</b>	15	✓	X	X	X	✓	✓	<b>Dox-/MHV68</b>	✓	X	X
	16	✓	X	X	✓	X	X		X	✓	✓
	17	✓	X	X	✓	X	X		X	✓	✓
	18	✓	X	X	X	✓	✓		X	✓	✓



	19	✓	X	X	X	✓	✓	<b>Dox-</b>	✓	X	X
	20	✓	X	X	X	✓	✓		✓	X	X
	21								✓	X	X
	22								X	✓	✓
	23								X	✓	✓
<b>n-Zahl</b>		20	0	0	8	12		11	12		

**Tabelle 3.6: Detaillierte Darstellung des Aufbaus der tierexperimentellen Untersuchungen.** In der 1. und 2. Runde befanden 5 Mäuse je Mausgruppe (Dox-; Dox+; Dox-/MHV68; Dox+/MHV68), wobei in der 3. Runde hatte jede Gruppe 6 Mäuse bis auf die Gruppe Dox- mit 5 Mäusen. **H**= Histologie, **P**= Proteinexpressionsanalyse, **G**= Genexpressionsanalyse.

---

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Histologie

#### 3.2.1.1 Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC)

Ziel der immunhistochemischen Färbung ist die Visualisierung von Gewebe- bzw. Zellantigenen in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten. Dabei wird eine sog. Antigendemaskierung durchgeführt, um das Gewebe dem Primärantikörper zugänglich zu machen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Technik, bei der ein biotinylierter Sekundärantikörper mehrere Moleküle eines Konjugates aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase (AP) bzw. Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP) bindet. Die Visualisierung erfolgt über eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente (Chromogen), die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden die Zytochem Kits von Zytomed Systems GmbH verwendet, die Farbgebung ist abhängig vom verwendeten Chromogen. Folgendes sind die verwendeten Chromogene:

- Das Chromogen DAB (nur im Kit HRP008DAB enthalten) bildet ein dunkelbraunes Reaktionsprodukt.
- Das Chromogen Fast Red (nur im Kit AP008RED enthalten) bildet am Ort des Zielantigens ein rotes Reaktionsprodukt.
- Das Chromogen Permanent Red (nur im Kit AP008RED enthalten) bildet am Ort des Zielantigens ein pink-rotes Reaktionsprodukt.

Die verwendeten Gewebeproben stammten aus Explantationen von ganzen Lungen oder Lungenlappen, die in München entnommen worden waren. In München wurden die Gewebeproben sofort nach Entnahme in 4% Phosphat-gepuffertem p-Formaldehyd (PFA, pH 7.0) verbracht. Nach einer Fixationsdauer von 12-16 Stunden wurden die Proben in 1xPBS überführt und nach Gießen geschickt.

Nach dem Transport nach Gießen an das UGMLC wurden die fixierten Lungenproben in Einbettkassetten überführt, mit PBS gewaschen und über Nacht entwässert, um danach

---

in Paraffin eingebettet zu werden. Nach Aushärtung wurden von den in Paraffin eingebetteten Lungengewebe mit einem vollautomatischen Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica) 3 µm dicke Schnitte in Serie angefertigt und nach kurzer Inkubation im 40°C warmen Paraffinstreckbad auf Objektträger aufgezogen und auf einer 40°C erwärmten Heizplatte getrocknet. Die Oberfläche dieser Objektträger war positiv geladen, damit eine bessere Haftung des Schnittes, während der zahlreichen Anbindungs- und Spülvorgänge gewährleistet werden konnte.

### **3.2.1.1.1 Durchführung der Immunhistochemie**

Zur Entparaffinierung wurden die murinen Lungengewebe schnitte zunächst für 90 min. bei 60°C im Heizschrank inkubiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte in einem 10-minütigem Xylolbad, sowie Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe, beginnend mit 100% Ethanol, über 96%, 80%, 70% und 50%, wobei die Schnitte für jeweils 3 Minuten in der Alkohollösung verweilten, um daraufhin bis zur weiteren Verwendung in Aqua dest. zu ruhen.

Um den Primärantikörpern das Gewebe zugänglich zu machen (sog. Antigendemaskierung), wurden die Schnitte in 10 mM Zitratpuffer in der Mikrowelle bei 800 Watt zum Kochen gebracht, um danach noch weitere 5 min zu kochen. Anschließend erfolgte eine 25-minütige Abkühlphase bei Raumtemperatur. Dieser Koch- und Abkühlvorgang wurde danach noch 2-mal wiederholt.

- Zitratpuffer:
  - 18 ml Lösung A (100 mM Zitronensäure-Monohydrat)
  - 82 ml Lösung B (100 mM Natrium-Zitrat-Dihydrat)
  - Auf 1 l mit H<sub>2</sub>O dest. Auffüllen

Anschließend wurden die Schnitte in 1× PBS für 2 min gewaschen und danach mit der Blockierlösung aus dem ZytoChem-Plus AP Kit (Zytomed Systems) für 5 min beschichtet, um unspezifische Bindungsstellen für den Primärantikörper zu maskieren. Im Fall des DAB/HRP-Kits musste zuvor noch ein 10 minutiges Abblocken mit 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> („Peroxidblock“) erfolgen, und anschließend wurde wie beim AP Kit verfahren. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte unter Schütteln in 1x PBS (à 2 min) wurden diese für zwei Stunden mit dem Primärantikörper in 2% (w/v) BSA in 1x PBS bei

---

Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend erneut dreimal (à 2 min) gewaschen.

- 10× PBS:
  - 160,2g NaCl
  - 4g KCl
  - 28,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
  - 5,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)
  - mit 2M NaOH auf pH7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 2l auffüllen

Nach der Inkubation des Primarantikörpers wurden die Schnitte in 0,1% (w/v) BSA in 1x PBS 3-mal für jeweils 2 Minuten gewaschen, um anschließend für 20 min in einer feuchten Kammer mit dem biotinylierten Sekundarantikörper des Kits inkubiert zu werden. Danach erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen mit 0,1% (w/v) BSA in 1× PBS (à 2 min) und im Anschluss die Inkubation für 20 min. mit einem Streptavidin-AP-Komplex oder mit einem Streptavidin-HRP-Komplex. Die Präparate wurden wiederum dreimal (2 min) in 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Farbreaktion. Nach Erreichen der gewünschten Färbintensität wurde in beiden Fällen (AP, HRP) die Reaktion mit H<sub>2</sub>O dest. abgestoppt. Die Schnitte wurden dann in Haemalaun (sauer nach Mayer; von Waldeck GmbH & Co. KG, Münster) für 90 sec. gegengefärbt und anschließend für 5-10 min mit mehreren Leitungswasser-Bädern gebläut.

Danach konnten die Schnitte mit auf ~90°C erwärmten Glycergel (Dako) eingedeckelt werden. Nachdem das Medium getrocknet war, wurden die Schnitte mit dem NanoZoomer 2.0RS Scanner von Hamamatsu eingescannt. Im Anschluss wurden die gescannten Lungenschnitte mit Hilfe der „NDP.viewer2-Software“ ausgewertet und Fotos mit 20× und 40× Vergrößerung hergestellt.

### **3.2.1.2 Immunfluoreszenzanalyse**

Für Immunfluoreszenzanalysen (IF) wurde auch eine hitzevermittelte Antigengewinnung (sog. Antigendemaskierung) durchgeführt. Aufgrund des Multiplexings mit primären Antikörpern derselben Spezies in IF wurde das Alexa Fluor<sup>TM</sup> 555 Tyramide SuperBoost<sup>TM</sup> Kit, goat-Anti-rabbit-IgG zum Nachweis von gespalteener Kaspase-3

---

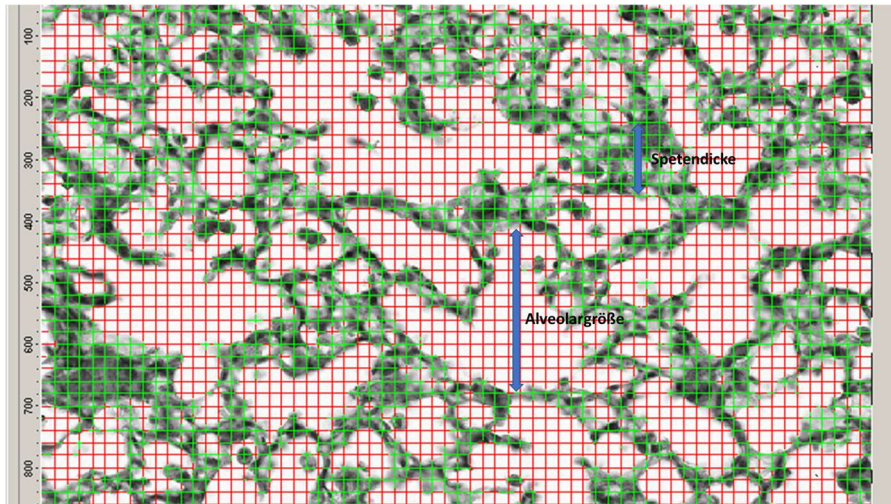
(R&D Systems, AF835, verdünnt 1:75) in Co-Lokalisierung mit proSP-C (verdünnt 1:800) oder Vimentin (verdünnt 1:300) verwendet und gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die primären rabbit-IgG-Antikörper für proSP-C oder Vimentin wurden mit sekundärem Anti-rabbit-IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, Alexa Fluor® 488-Konjugat (verdünnt 1:500) nachgewiesen. Die Objektträger wurden dann dreimal in PBS (5 Min.) gewaschen und dann 2 Min. mit Sudan Black (Sigma-Aldrich; 3 % (w/v) in 70 % Ethanol) inkubiert. Nach gründlichem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) inkubiert und in Fluoreszenz-Montagemedium montiert. Als Negativkontrolle wurde der erste Antikörper weggelassen und die Lungengewebe-Objektträger wurden nur mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Bildgebung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 durchgeführt. IF-Bilder wurden mit der Axio Observer ZEN-Software, Version 1.0 (Carl Zeiss MicroImaging) erfasst und analysiert.

### **3.2.1.3 Die morphometrische Analyse**

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnittpräparate der Lunge wurden mit einem Mirax-Präparatescanner digitalisiert und abgespeichert. Zur Quantifizierung der Fibrose wurde eine morphometrische Analyse an H&E gefärbten Schnitten mit Hilfe des Axiovision Auswertungsprogrammes SeMeLug durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden dazu die zu analysierenden Lungenareale mit Hilfe der Bildbetrachtungssoftware Panoramic-Viewer markiert und als tiff-Dateien exportiert. Auf diese Weise wurde ein Lungenschnitt in ca. 20-30 Lungenbereiche unterteilt, anschließend einzeln vermessen und die Ergebnisse hinterher wieder zusammengeführt.

Das SeMeLug-Auswertemodul legt ein Raster aus horizontalen und vertikalen Messehnen (chords). Als Septendicke wurde die Länge einer Messehne vom Auftreffen auf einen Gewebeabschnitt bis zu dessen Ende definiert und als alveolärer linear intercept (Alveolengröße bzw. „Alveolendurchmesser“) wurde die Strecke des luftgefüllten Raums zwischen zwei Gewebeabschnitten definiert (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3: Erläuterung der bildmorphometrischen Analyse eines histologischen Schnittes.** Ein Gitternetz aus horizontalen und vertikalen Messsehnen wurde auf das Schnittbild gelegt und die Längen der Gewebeabschnitte (grüne Messsehnen) und der alveolären Anteile ohne Gewebe (=alveolar linear intercept bzw. „Alveolendurchmesser“, rote Messsehnen) bestimmt.

Jeder einzelne Septumabschnitt und jeder folgende Alveolarabschnitt wurde für alle exportierten Areale gemessen und in einer Exceltabelle zusammengetragen. Pro Lungenschnitt gingen so zwischen 20.000 und 60.000 Einzelmesswerte in die Analyse ein. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die mittleren Septendicken und die durchschnittlichen Alveolardurchmesser („mean alveolar linear intercept“) errechnet, die statistische Analyse wurde unter Verwendung des ungepaarten t-Tests mit der Computersoftware GraphPad Prism5 durchgeführt. In dieser Arbeit wird nur die Messung der Septumdicke dargestellt.

### 3.2.1.4 Die morphologische Quantifizierung

Mit dieser Methode werden die Zellen, die ein bestimmtes Protein in IHC exprimieren morphologisch quantifiziert. Dafür werden pro Maus 10 repräsentative Bilder (40x) mit der Software NDP.view 2 exportiert, n=3 je Gruppe. Die Zellen werden dann mit der Software ImageJ quantifiziert. Die Ergebnisse werden abschließend mit der Software GraphPad Prism 5 statistisch dargestellt.

---

## 3.2.2 Proteinbestimmung

### 3.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengewebe

Das gefrorene Lungengewebe wurde mit 1 ml (Je nach Größe) Lysepuffer versetzt und 2-mal mit dem dem Precellys Homogenisator zu einem Homogenat verarbeitet. Nach der Homogenisierung wurde das Lysat für 2 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Lysepuffer:                    50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
  
                                      150 mM NaCl  
  
                                      1% (w/v) Triton X-100  
  
                                      0.5% (w/v) Deoxycholsäure-Natriumsalz  
  
                                      5 mM EDTA  
  
                                      Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x), 1:100 verdünnt

### 3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Dafür wurde das kommerziell erhältliche Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Die zugrundeliegende Detektionsmethode beruht auf der Biuret-Methode, bei der Proteine in wässrig alkalischer Lösung mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex bilden, wodurch  $\text{Cu}^{2+}$  mittels des zu bestimmenden Proteins/Peptids zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird und daraufhin einen Komplex mit Bicinchinsäure (BCA) formt, welche hochspezifisch  $\text{Cu}^+$  bindet. Der Komplex aus zwei Molekülen BCA und einem Molekül  $\text{Cu}^+$  bildet ein violettes Reaktionsprodukt, welches ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 562nm zeigt, wobei die Absorption sich nahezu linear zu der Proteinkonzentration verhält. Dieses kann durch Messung zur Quantifizierung der Proteinkonzentration herangezogen werden, wobei die Berechnung der Proteinkonzentration über eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration erfolgt.

---

Da die Homogenaten stark konzentriert sind, werden die vor Bestimmung der Proteinkonzentration 1 : 20 in Wasser verdünnt und anschließend á 50 µl in Triplikaten in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Standardreihe wird mit 2% BSA (bovine serum albumine = Rinderserum-Albumin) mit der Ausgangskonzentration von 2000µg/ml hergestellt, wobei 1500µg/ml, 1000µg/m, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,25µg/ml, 15,625µg/ml und 7,81µg/ml die absteigende Standardkurve bilden. Anschließend wurde zu den Proben jeweils 200 µl BCA-Arbeitslösung bestehend aus 20 ml Reagenz A, welches die Bicinchinsäure enthält und 400µl Reagenz B, bestehend aus einer Kupferionenlösung, hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorptionsmessung mittels einem Mikrotiter-Platten-Reader (Mikroplatten-Reader Infinite 200 PRO) durchgeführt.

### 3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteinextrakte mit 4x reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung 10 min. bei 95°C inkubiert.

4x SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend): 25% (v/v) 0.625 M Tris/HCl, pH 6.8

40 % (v/v) Glycerin

5 % (w/v) SDS

0.002 % (w/v) Bromphenolblau  
(Spatelspitze)

4x SDS-Probenpuffer (reduzierend):

90% (v/v) 4x SDS-Probenpuffer (nicht  
reduzierend)

10% (v/v) β-Mercaptoethanol

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der Methode nach Lämmli<sup>142</sup> in einer vertikalen Gelapparatur. Das zu verwendende Gel setzt sich aus 2 Komponenten zusammen: dem Sammelgel, um die Proteine zu fokussieren, und dem Trenngel, wobei hier die Konzentration des Acrylamids an die Größe des zu



untersuchenden Proteins angepasst wird – hochprozentige Gele für Proteine mit kleinem Molekulargewicht, bzw. niedriger prozentige Gele für Proteine mit größerem Molekulargewicht. Die Zusammensetzung der Gel-Komponenten ist in Tabelle 3.7 gezeigt.

	Trenngel 10 ml					Sammelgel 10 ml
	8 %	9 %	10 %	12 %	15 %	4 %
<b>30 % Acrylamid 0,8 % N,N-Bisacrylamid</b>	2,66 ml	3,0 ml	3,33 ml	4,0 ml	5,0 ml	1,33 ml
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	3,87 ml	3,53 ml	3,20 ml	2,53 ml	1,53 ml	6,57 ml
<b>10 % (w/v) SDS</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Trenngelpuffer</b>	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	-
<b>Sammelgelpuffer</b>	-	-	-	-	-	2,0 ml
<b>10 % (w/v) APS</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

**Tabelle 3.7: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel der SDS-PAGE.**

- Trenngelpuffer:
  - 1,125 M Tris/HCl pH 8,8
  - 30% (w/v) D(+)Saccharose
  
- Sammelgelpuffer:
  - 0,625 M Tris/HCl pH 6,8

Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend in eine Laufkammer (BIORAD Mini Protean TetraCell) eingespannt, mit den Proben und einem Proteingrosenstandard beladen und die Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. Im Sammelgel erfolgt die Konzentrierung der Proteine bei konstanten 12,5mA pro Gel, im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach deren Größe bei konstanten 15mA.

- Elektrodenpuffer:
  - 25 mM Tris
  - 192 mM Glycin
  - 0.1 % (w/v) SDS

---

### 3.2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Methodik

Beim Western Blot – durchgeführt in Anlehnung an Kyhse-Andersen – werden die im Gel aufgetrennten Proteine in einem Semi-Dry-Blot-System auf eine PVDF-Membran transferiert. Dabei bleibt das Proteinmuster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Anschließend ist es möglich das gewünschte Protein mit Hilfe spezifischer Primärantikörper zu identifizieren, welche an der passenden Proteinbande auf der Membran binden. Für die Detektion wurde ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die Visualisierung erfolgte mittels des Immobilon Western Chemiluminescent Kits von Millipore. Die mit Meerrettichperoxidase (HRP-) gekoppelten Sekundärantikörper reagieren mit dem in der ECL-Entwicklerlösung vorhandenen Luminol, wobei dieses oxidiert wird. Wenn das oxidierte Luminol in seinen Grundzustand zurückkehrt, wird Licht emittiert, welches mittels hochsensitiver Kamera (Intas Imager) aufgenommen wird.

Für die Durchführung des Western Blots wurde die PVDF Membran zunächst für 1 Minute mit Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen. Die Gele wurden ebenfalls für mind. 10 Minuten in Transferpuffer wippend equilibriert.

- Transferpuffer:
  - 20 mM TRIS
  - 150 mM Glycin
  - 20% (v/v) Methanol

Anschließend wurden zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Blotpapier auf die Graphitanode der Transferkammer gelegt. Darauf wurden die PVDF-Membran und dann das Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit zwei weiteren in Transferpuffer getränkten Lagen Blotpapieren abgedeckt. Der Transfer erfolgte bei konstanten 70mA pro 54 cm<sup>2</sup> Gel (75mA für 15%ige Gele) in der Blotapparatatur für 2 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5% (w/v) Milchpulver in 1× TBS/T für 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in 5% (w/v) Milchpulver in 1× TBS/T unter Schütteln bei 4°C über Nacht.

- 
- TBS/T:
    - 50 mM Tris/HCl pH 7,5
    - 50 mM NaCl
    - 0,5% (w/v) Tween 20

Nach der Inkubation wurde die Membran drei Mal in 1× TBS/T für 10 Minuten gewaschen und anschließend erneut in 5% (w/v) Milchpulver in 1× TBS/T für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln mit dem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Konzentration 1:1000) inkubiert. Anschließend wurden die Blots wieder 3× für 10 min mit 1× TBS/T gewaschen. Nun war es möglich, Zielproteine auf der Western-Blot Membran mittels ECL-Entwicklerlösung und Intas-Imager zu visualisieren. Nach der Detektion bietet sich die Möglichkeit einer erneuten Inkubation der Membran mit einem anderen Primärantikörper. Hierzu wurde die Membran für 30 Minuten bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1× TBS/T kann die Membran wie oben beschrieben mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

- Stripping-Puffer:
  - 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - 2 % (w/v) SDS

### **3.2.2.5 Analyse der Proteinexpression**

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden quantitative Immunoblots durchgeführt. Es wurden Proteinhomogenate aus den murinen Lungengewebe hergestellt und die Expression der jeweiligen Zielproteine der 4 Gruppen miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

Zur Auswertung der Ergebnisse aus der Proteinexpressionsanalyse mittels Immunoblot wurde zunächst eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten mit der Computer-Software ImageJ durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Intensitäts-Werte in das Verhältnis zur Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) gesetzt. Mit diesen Werten wurde eine statistische Analyse unter Verwendung des ungepaarten t-Tests in der Computersoftware GraphPad Prism 5 verwendet.

---

### **3.2.3 Genexpressionsanalyse**

#### **3.2.3.1 RNA-Extraktion aus den murinen Lungengeweben**

Zur Herstellung von RNA-Extrakten aus den Lungengeweben wurde das NucleoSpin® RNA Plus Kit von Macherey-Nagel verwendet. Zuerst wurden die Lungengewebe lysiert, indem die mit 800-1100 µl Lysatpuffer LBP (im Kit vorhanden) versetzt und mehrmals mit dem Precellys Homogenisator zu einem Homogenat verarbeitet. Nach der Homogenisierung wurde das Lysat kurz auf Eis inkubiert.

Nach Herstellerangaben wird im nächsten Schritt die genomische DNA von dem Lysat entfernt, dazu wurde 350 µl Lysat in die NucleoSpin® gDNA Removal Säule (gelber Ring) pipettiert und anschließend für 30 s bei 11,000 x g zentrifugiert, danach wird die Säule verworfen und mit dem Durchlauf weitergearbeitet. Im nächsten Schritt wurde 100 µl Binding Solution (im Kit vorhanden) in den Durchlauf hinzu pipettiert und durch Vortexieren oder Auf- und Abpipettieren gut gemischt.

Um die RNA vom Lysat zu isolieren, wird das Lysat (~ 450 µL) auf die NucleoSpin® RNA Plus Säule (blauer Ring) aufgetragen und anschließend für 15 s bei 11,000 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt wird die RNA in der Säule gebunden, der Durchlauf wird weggeworfen. Es folgen danach mehrere Waschschritte mit Buffer WB1 und WB2 (im Kit vorhanden). Im letzten Schritt wurde RNA aus der Säule mit RNase freiem Wasser eluiert und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

#### **3.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in einem photometrischen Verfahren in NanoDrop, Peqlab. Dazu wurden 2 µl der isolierten RNA in Duplikaten vermessen.

---

### 3.2.3.3 Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurden 1000 ng isolierte RNA mithilfe einer Reversen Transkription umgeschrieben, dafür wurde der Omniscript RT Kit von QIAGEN verwendet und folgendes Protokoll angewandt:

- 2 µl 10× Puffer RT
- 2 µl dNTP Mix
- 0.5 µl Oligo dT
- 0,5 µl RNase-Inhibitor
- 13 µl RNA (1000 ng) in RNase-freiem Wasser
- 1 µl RNase-freies Wasser
- 1 µl Reverse Transkriptase

Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Ansätze durch Vortexieren gemischt, kurz herunterzentrifugiert und 65 min. bei 37°C inkubiert.

### 3.2.3.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Real Time* PCR (qRT-PCR)

Quantitative Real-time PCR erlaubt eine sensitive, spezifische und reproduzierbare Quantifizierung von den Nucleinsäuren. Seit der Einführung dieser Methode hat die qRT-PCR die Molekularbiologie revolutioniert und wird derzeit sehr häufig in wissenschaftlichen Arbeiten angewendet (Arya et al., 2005). Jede einzelne Kopie einer spezifischen Sequenz kann während der PCR amplifiziert und detektiert werden. Da die PCR die DNA-Template exponentiell amplifiziert, entsteht eine quantitative Beziehung zwischen der Menge an DNA am Anfang und der Menge an PCR-Produkten in jedem bestimmten Zyklus. Die Messung der PCR-Produkte während der Amplifikation erlaubt eine Quantifizierung während der exponentiellen Phase und das hat den Vorteil, dass dadurch die mit der konventionellen PCR assoziierte Variabilität ausgeblendet wird.

Es gibt im Wesentlichen zwei Technologien, die die Quantifizierung einer PCR erlauben, zum einen ist das die SYBR® Green 1 -Technologie, zum anderen finden sogenannte Taqman-Sonden Anwendung, bei den beiden Methoden kann der PCR-Verlauf anhand der fluoreszenzbasierenden Messung dokumentiert werden.

---

Zur Auswertung von RT-PCR Ergebnissen stehen zwei Methoden zur Verfügung und zwar sind diese die absolute und die relative Quantifizierung (Arya et al., 2005). Die absolute Quantifizierung ist aufwändig und wird selten durchgeführt. Die relative Quantifizierung auch bekannt *als the comparative threshold method* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method) wird am meisten verwendet, Hierfür wird eine interne Kontrolle benötigt, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA auszugleichen, als interne Kontrolle verwendet man Haushaltsgene. Die am häufigsten verwendeten Haushaltsgene sind  $\beta$ -actin (*ACTB*), Glceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*) und ribosomale RNA (18s rRNA) (Arya et al., 2005). Die Expression dieser Gene sollte theoretisch in allen Geweben des Organismus konstant sein, auch unter den experimentellen Bedingungen sollte die Expression durch eine Intervention nicht beeinflusst werden, um eine Standardisierung des Experiments zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurden die Ct-Werte der einzelnen Proben unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  – Methode ausgewertet. Bei dieser relativen Quantifizierung werden die Ct-Werte der zu quantifizierenden Transkripte zweier Populationen (z. B. Knockdown und Kontrolle, oder "krank" und "gesund") direkt unter Normalisierung auf ein Housekeeping-Gen miteinander verglichen. Dabei errechnete sich die relative Veränderung des Zielgens in einer Probe wie folgt:

- $\Delta Ct$ : Ct Wert *vom Zielgen* - Ct Wert *vom Haushaltsgen*
- $\Delta\Delta Ct$ :  $\Delta Ct$  Wert -  $\Delta Ct$  Wert *von Referenzprobe*

In dieser Arbeit wurde *Actb* als Haushaltsgen und die Maus-Gruppe (Dox-) als Referenzprobe in der Auswertung der RT-PCR Ergebnisse mittels der Computersoftware GraphPad Prism 5 verwendet.

In dieser Arbeit wurde die SYBR® Green I-Technologie angewendet. Diese Methode basiert im Wesentlichen darauf, dass der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green I während der PCR in die doppelsträngige DNA interkaliert und kann während der PCR dann direkt durch eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes eine Quantifizierung der erhaltenen DNA-Menge über die Detektion der emittierten Lichtquanten erfolgen. Anschließend erfolgt die Ausgabe der Ct-Werte.

---

Der RT-PCR-Ansatz (Volumen 10 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl PowerUp SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems
- 0,5 µl Forward-Primer
- 0,5 µl Reverse-Primer
- 2 µl H<sub>2</sub>O dest.
- 2 µl cDNA-Template (2.5 ng/µl)

Es wurde so vorgegangen, dass zunächst die entsprechenden cDNAs à 2 µl in wells einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert wurden (Tripelbestimmung). Dann wurde ein Master-Mix für alle durchzuführenden Fälle/Reaktionen hergestellt und nach Mischen zu den cDNAs in der 96-well-Platte hinzupipettiert und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und mit dem Mx3000P qPCR System von Agilent Technologies unter Verwendung des folgenden PCR-Programms vermessen: initiale Denaturierung für 2 min bei 95°C, 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (15 sec. bei 95°C), Annealing (20 sec. bei 60°C) und Elongation (1 min. bei 72°C), Schmelzkurve (60°C - 95°C).

### **3.2.3.5 Messung der Viruslast durch quantitative *Real-Time*-PCR**

Die Viruslast in den Lungen infizierter Mäuse wurde durch quantitative Real-Time-PCR bestimmt. DNA wurde aus den Lungen extrahiert und durch UV-Spektrophotometrie quantifiziert. Die Amplifikation von 100 ng DNA pro Reaktion wurde mit TaqMan Universal PCR Master Mix durchgeführt. Unter Verwendung von Primern und Sonden wurde eine 70-bp-Region des MHV-68-Glykoprotein B (*gB*)-Gens amplifiziert und die Virus-DNA-Kopienzahl quantifiziert. Unter Verwendung bekannter Mengen eines Plasmids, das das HindIII-N-Fragment von MHV-68 enthält, das das *gB*-Gen umfasst, wurde eine Standardkurve erstellt. Das murine ribosomale Protein L8 (*rpl8*) wurde parallel amplifiziert und verwendet, um die Eingabe-DNA zwischen den Proben zu normalisieren. Eine Standardkurve für *rpl8* wurde durch serielle 10-fache Verdünnung eines *rpl8* enthaltenden Plasmids erzeugt. Die Daten werden als virale Genomkopienzahlen (*gB*) relativ zur 1000 Kopienzahl von *L8* dargestellt (Guggemoos et al., 2008).

---

### 3.2.3 Die statistische Analyse

Alle Daten wurden mit der GraphPad Prism 5 Software analysiert und werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.  $n$  wird in den Legenden der Abbildungen beschrieben und bezieht sich auf die Anzahl der Tiere pro Gruppe. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \* $P < 0,05$  angegeben.



---

## 4. Ergebnisse

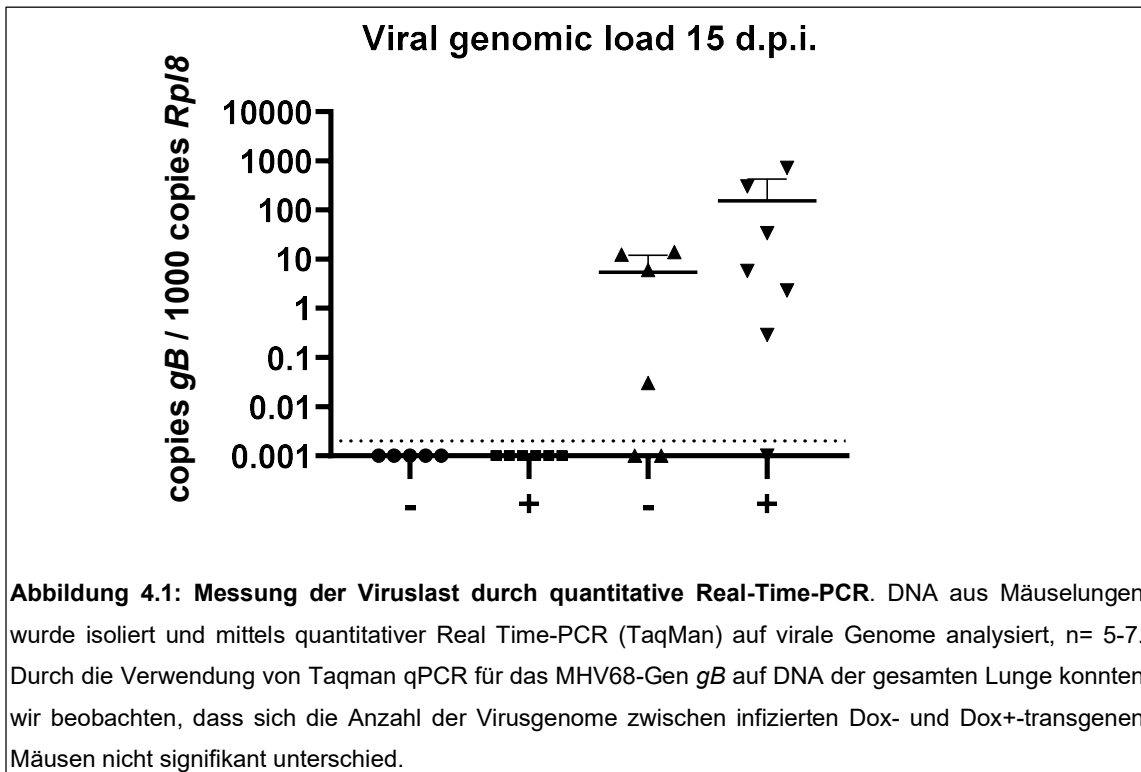
### 4.1 Doppelt-transgene Mäuse mit einer spezifischen Chop-Überexpression in den AECII entwickeln eine signifikante Lungenfibrose nach Herpesvirusinfektion

Unsere Arbeitsgruppe konnte früher zeigen, dass die konditionale Chop-Überexpression in AECII in einem transgenen Maus-Modell *in vivo* (doppelt-transgene SP-C rtTA/tetO7-Chop-Mäuse) zu der Induktion von Kaspase-3-Spaltung und somit zur Apoptose dieser Zellen führte. Zusätzlich wurde eine Induktion und Hochregulation der pro-apoptotischen Chop-Zielgene: *Casp11*, *Il1b*, *Il6*, *Ero1a*, *Dr5* und *Gadd34* auf Transkriptebene durch qPCR beobachtet. Trotz dieser drastischen zellulären Veränderungen ergab die histologische Analyse, die an doppelt-transgenen Mäusen durchgeführt wurde, jedoch keine Entwicklung einer signifikanten Lungenfibrose bei mit Dox<sup>+</sup> gefütterten Mäusen nach 28 und 56 Tagen und die Lungen dieser Mäuse erschienen trotz permanenter Chop-Transgen-Induktion und AECII-Apoptose histologisch normal.

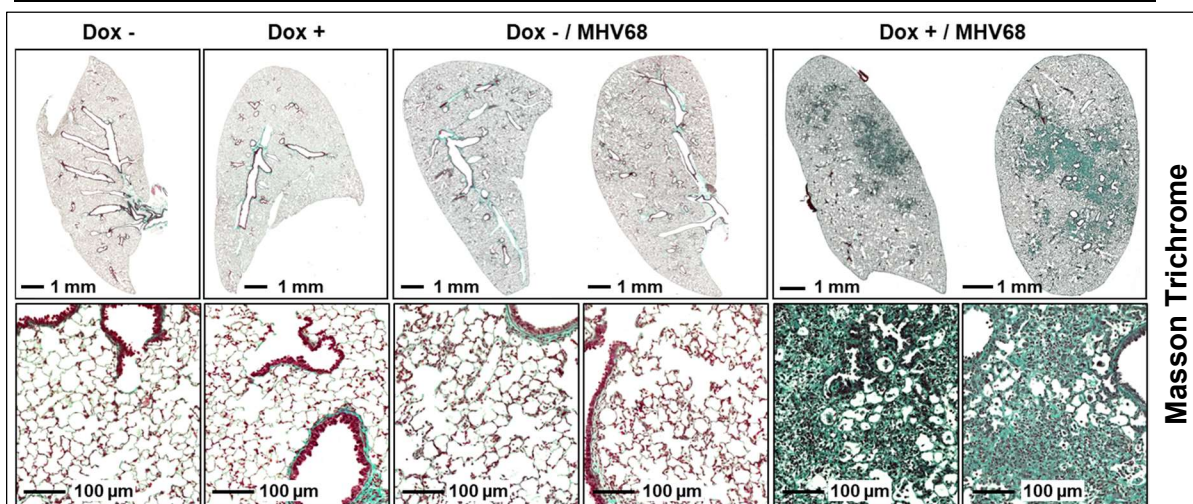
Wir vermuteten daher, dass der Grad der Apoptose in AECII als Reaktion auf die Überexpression von Chop nicht ausreichte, um bei transgenen Mäusen eine vollständige Lungenfibrose auszulösen und dass ein zweiter Stimulus infolge anfälliger AECIIs eine signifikante Lungenfibrose bei transgenen Chop-Mäusen auslösen könnte. Wir stellten die Hypothese auf, dass die transgene Chop-Maus ein IPF-relevantes Mausmodell darstellt, das eine Lungenfibrose durch einen sekundären Stimulus entwickelt. Daher wandten wir uns der Infektion mit dem murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV68) zu.

Nach 28-tägiger Transgen-Induktion durch Doxycyclin wurden  $5 \times 10^4$  *plaque forming units* (PFU) von MHV68 intranasal verabreicht. Das Experiment wurde am Tag 15 d.p.i durch Tötung von Mäusen und Gewinnung von Lungengewebe beendet. Durch die Verwendung von Taqman qPCR für das MHV68-Gen *gB* auf DNA der gesamten Lunge konnten wir beobachten, dass sich die Anzahl der Virusgenome zwischen infizierten Dox- und Dox<sup>+</sup> transgenen Mäusen nicht signifikant unterschied (Abb. 4.1). Letzteres zeigte jedoch eine klare Tendenz zur Hochregulierung der viralen *gB*-DNA in der Lunge. Dies deutet darauf hin, dass diese infizierten Mäuse unter Dox-Exposition mit erhöhter Chop-

Transgen-Expression in der Kontrolle chronischer MHV68-Infektionen beeinträchtigt sind.

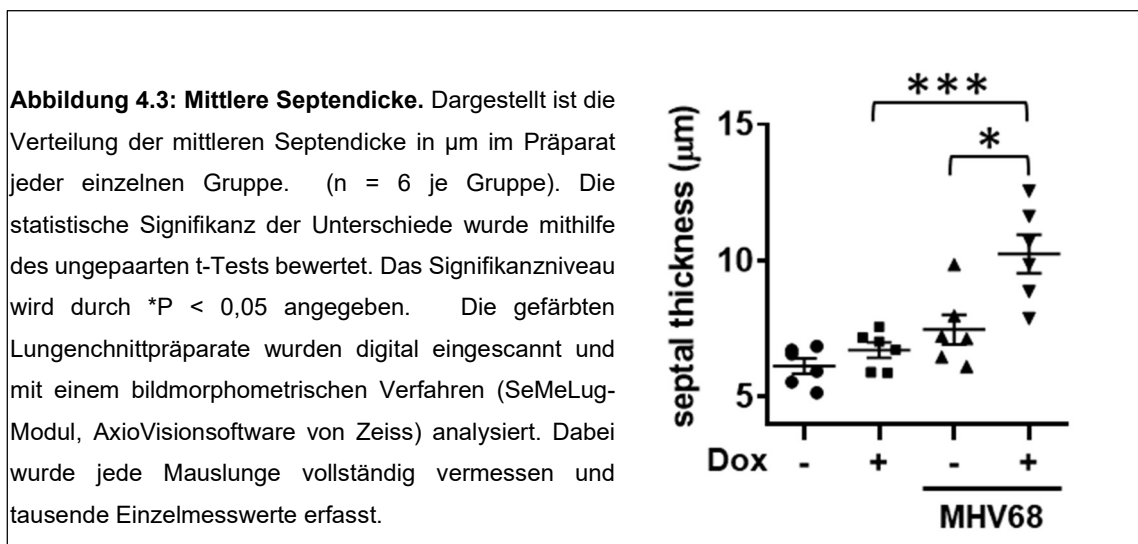


Anschließend wurden die Lungen mittels Masson-Trichrom-Färbung untersucht. Im Vergleich zu MHV68-infizierten Dox-transgenen Mäusen entwickelten infizierte Dox+ Chop-Mäuse eine deutliche Lungenfibrose, wobei sich Bereiche mit normaler oder mäßiger Kollagenablagerung mit Bereichen mit dichten Kollagennarben und starker fibrotischer Umgestaltung abwechselten (Abb. 4.2). Insgesamt kam es bei MHV68-infizierten Dox- transgenen Mäusen zu einem mäßigen Lungenumbau, der in einigen Lungenregionen auf eine akute Pneumonitis hindeutete, bei diesen Mäusen wurde jedoch keine Fibrose beobachtet. Nicht infizierte transgene Dox- und Dox+ Mäuse zeigten keine Lungenpathologie.



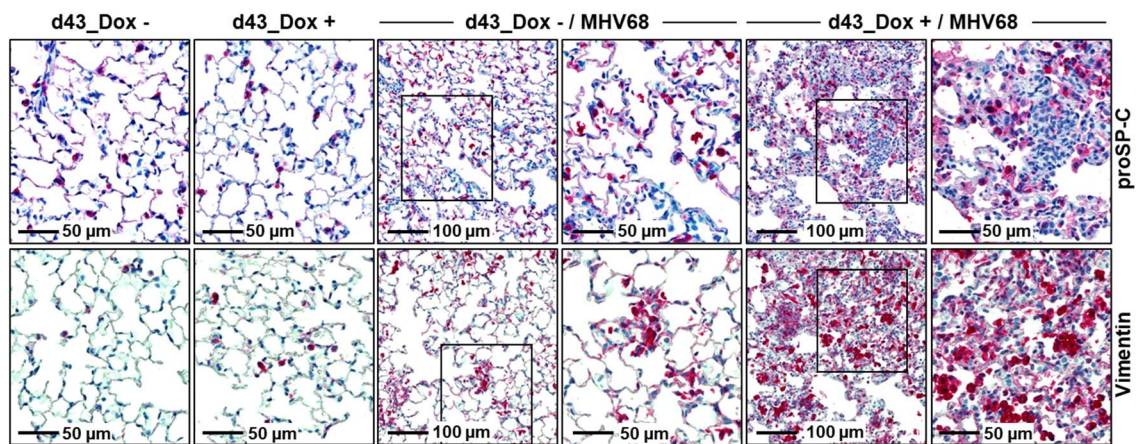
**Abbildung 4.2: Masson-Goldner-Trichromfärbung in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten.** In den infizierten Dox+ Chop Mäusen zeigt sich eine fibrotische Umwandlung in einigen Lungenbereichen. Insgesamt kam es bei MHV68-infizierten Dox- transgenen Mäusen zu einem mäßigen Lungenumbau, der in einigen Lungenregionen auf eine akute Pneumonitis hindeutete, bei diesen Mäusen wurde jedoch keine Fibrose beobachtet. Nicht infizierte transgene Dox- und Dox+ Mäuse zeigten keine Lungenpathologie.

Außerdem zeigte die quantitative morphometrische Analyse einen signifikanten Anstieg der Septumdicke bei MHV68-infizierten transgenen Chop-Mäusen unter Dox+ Bedingungen im Vergleich zu den infizierten Dox- Mäusen und den nicht infizierten Dox- und Dox+ Kontrollmäusen (Abb. 4.3).

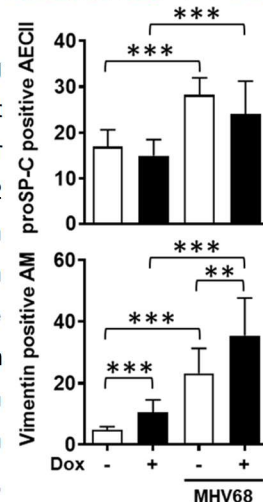


Als nächstes wurde die Größe der AECII-Population durch eine quantitative IHC für proSP-C in allen vier Mausgruppen bewertet. Im Einklang mit einer Lungenschädigung als Reaktion auf eine Herpesvirus-Infektion bei 15 d.p.i. zeigten beide MHV68-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen eine signifikant

erhöhte Größe der AECII-Population, die bei den MHV68-infizierten Dox- transgenen Mäusen am höchsten war. Die geringere Menge an proSP-C exprimierendem AECII in der Lunge infizierter transgener Dox+ Chop-Mäuse war vermutlich auf eine dichte Fibrose und eine starke Kollagenablagerung in einigen Lungenbereichen zurückzuführen (Abb 4.4). Darüber hinaus zeigten beide MHV68-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen eine signifikante Kumulation von Vimentin-exprimierenden Alveolarmakrophagen (AM) in der Lunge bei 15 d.p.i., die in den fibrotischen Lungen infizierter transgener Dox+ Chop-Mäuse viel höher war. Darüber hinaus zeigten nicht infizierte Chop-Mäuse unter 43-tägigen Dox+ Bedingungen einen Anstieg der Vimentin-positiven AM im Vergleich zu nicht infizierten Dox-transgenen Mäusen.

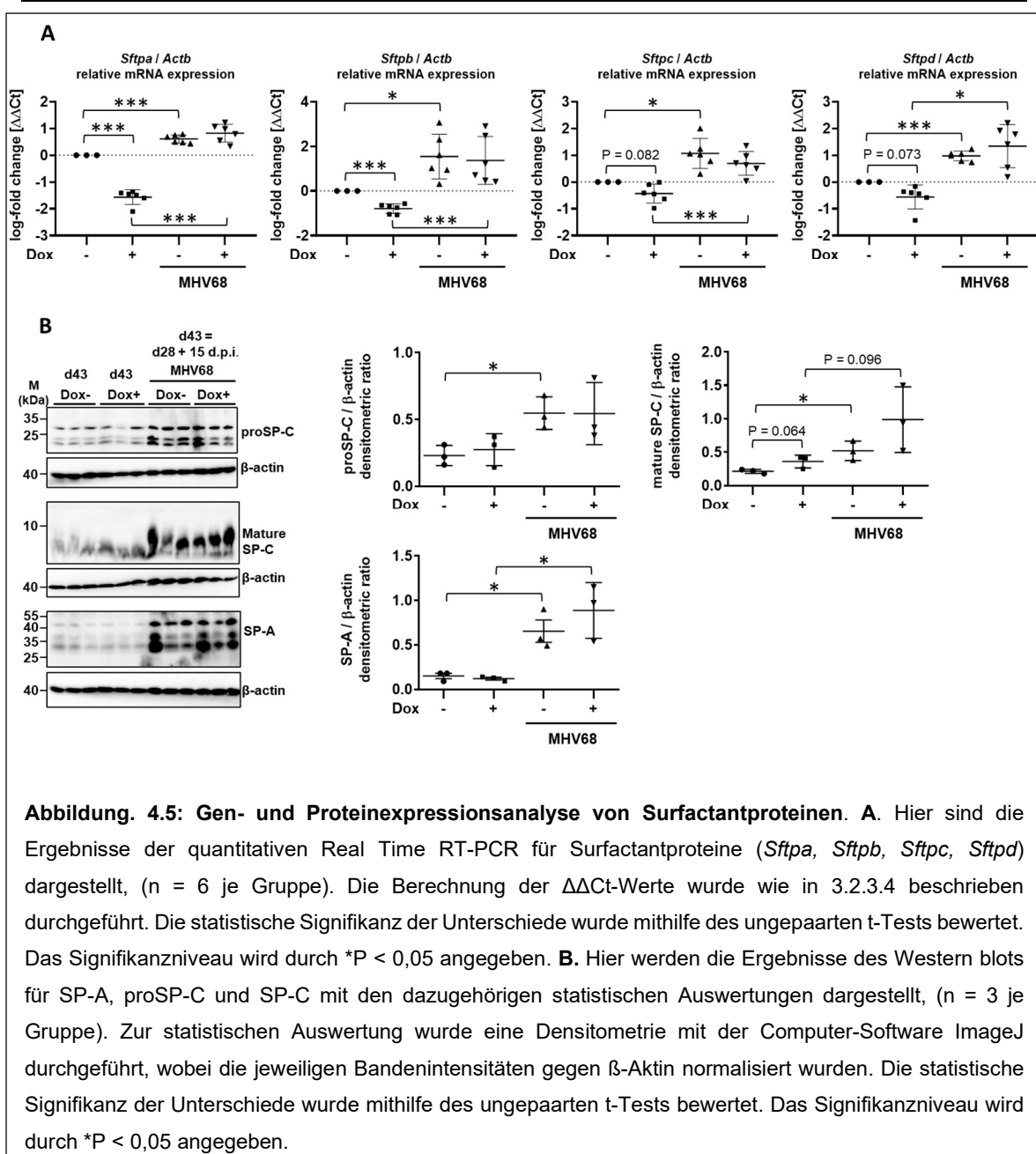


**Abbildung 4.4: Immunhistochemie mit morphologischer Quantifizierung von proSP-C und Vimentin.** Dargestellt wird die Immunhistochemie mit morphologischer Quantifizierung von proSP-C-positiven Zellen (Marker für AECII) und Vimentin-positiven Zellen (Marker für mesenchymale Zellen und M2 AM). (n = 3 je Gruppe). Im Einklang mit einer Lungenschädigung als Reaktion auf eine Herpesvirus-Infektion bei 15 d.p.i. zeigten beide MHV68-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen eine signifikant erhöhte AECII-Proliferation, die bei den MHV68-infizierten Dox-transgenen Mäusen am höchsten war. Darüber hinaus zeigten beide MHV68-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen eine signifikante Kumulation von Vimentin-exprimierenden Alveolarmakrophagen (AM) in der Lunge bei 15 d.p.i., die in den fibrotischen Lungen infizierter transgener Dox+ Chop-Mäuse viel höher war. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Computer-Software ImageJ. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben.



---

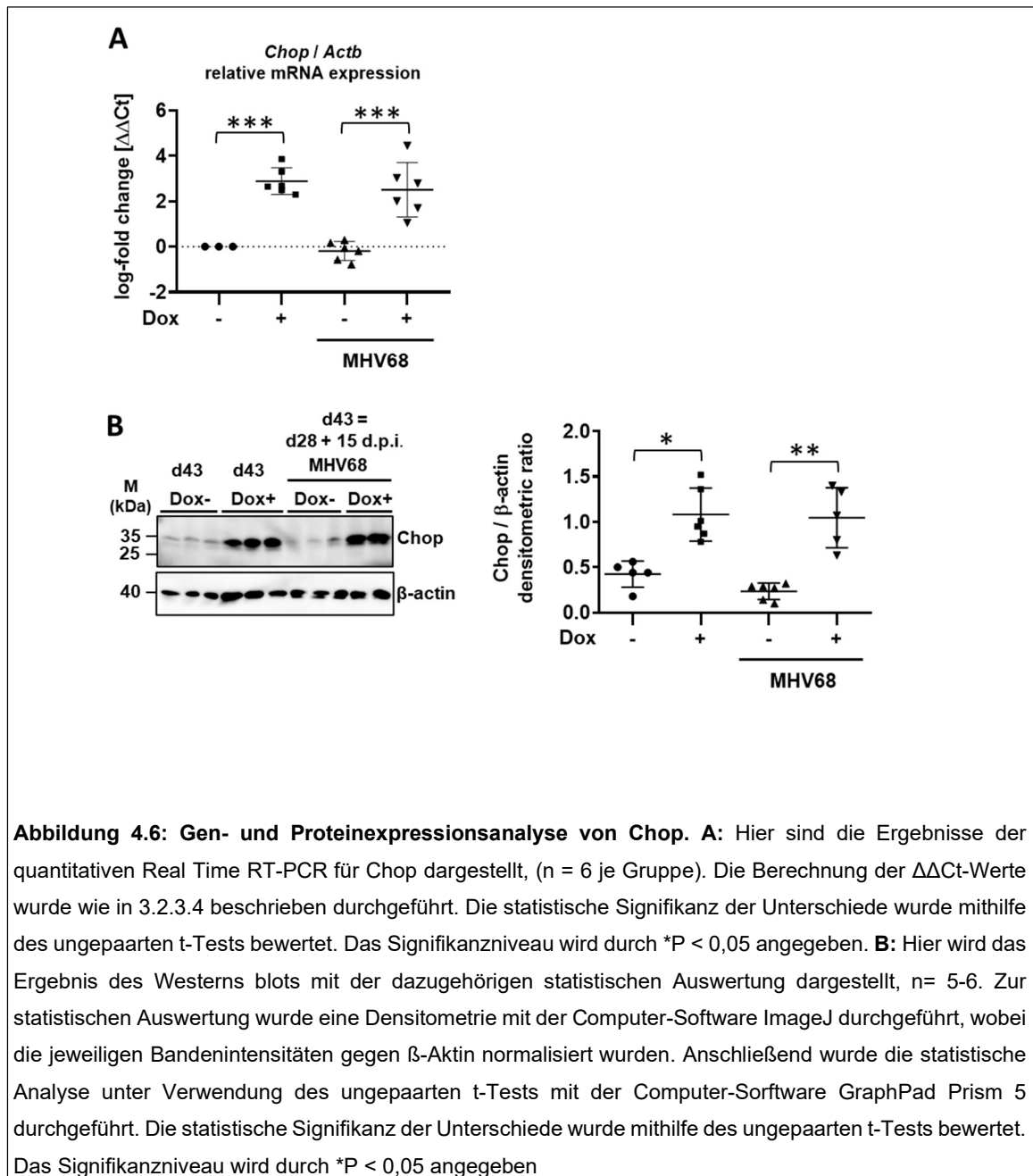
Surfactant wird von den AECII produziert, verringert die Oberflächenspannung der Alveolen und erleichtert dadurch die Atemarbeit (Goerke, 1998). Den größten Anteil des Surfactants machen mit über 90% Lipide, die verbleibenden 10% des Surfactants sind Proteine. Zum dem Proteinanteil zählen die folgenden speziellen Surfactantproteine: SP-A, SP-B, SP-C, SP-D (Garmany et al., 2006). SP-A und SP-D haben eine immunologische Funktion, SP-B und SP-C sind wichtig für die postnatale Lungenfunktion und das Überleben (Weaver and Conkright, 2001; Kishore et al., 2006). Da diese Moleküle vom Alveolarepithel freigesetzt werden, werden sie auch von den pathologischen Vorgängen im Rahmen der Lungenfibrose beeinflusst. In Abb. 4.5 A wird die Genexpressionsanalyse von Surfactantproteinen dargestellt. SP-A und SP-D waren als Folge der Virusinfektion signifikant erhöht in den Gruppen Dox-/MHV68 und Dox+/MHV68. Dox+ zeigte eine unklare reduzierte Expression von SP-A im Vergleich mit Dox-. SP-B und SP-C waren ebenso mehr exprimiert in den Virusgruppen, SP-B war auch signifikant reduziert in Dox+. Mittels Immunoblots wurden die Surfactant Proteine A und C untersucht (Abb. 4.5 B). proSP-C, die Vorstufe von SP-C, war in den Virusinfizierten Gruppen gleich hochreguliert gegenüber Dox- und Dox+. Das mature SP-C, die reife Form, war in Dox+/MHV68 am stärksten, aber nicht signifikant exprimiert. Dieses Verhalten von SP-C weist auf eine aberrante Epithelialisierung in den Alveolen hin, diese tritt sowohl durch die Apoptose von AECII durch Chop als auch durch die Herpesvirusinfektion auf. SP-A als *host defence* Marker war in den Virusgruppen signifikant stärker exprimiert als in Dox+ und Dox-. Die Expression war stärker in Dox+/MHV68 als in Dox-/MHV68. Anders als in der Genexpression war SP-A in Dox+ gleich reguliert wie in Dox-.



## 4.2 Status der pulmonalen ER-Stressreaktion bei mit Herpesvirus infizierten transgenen Chop-Mäusen

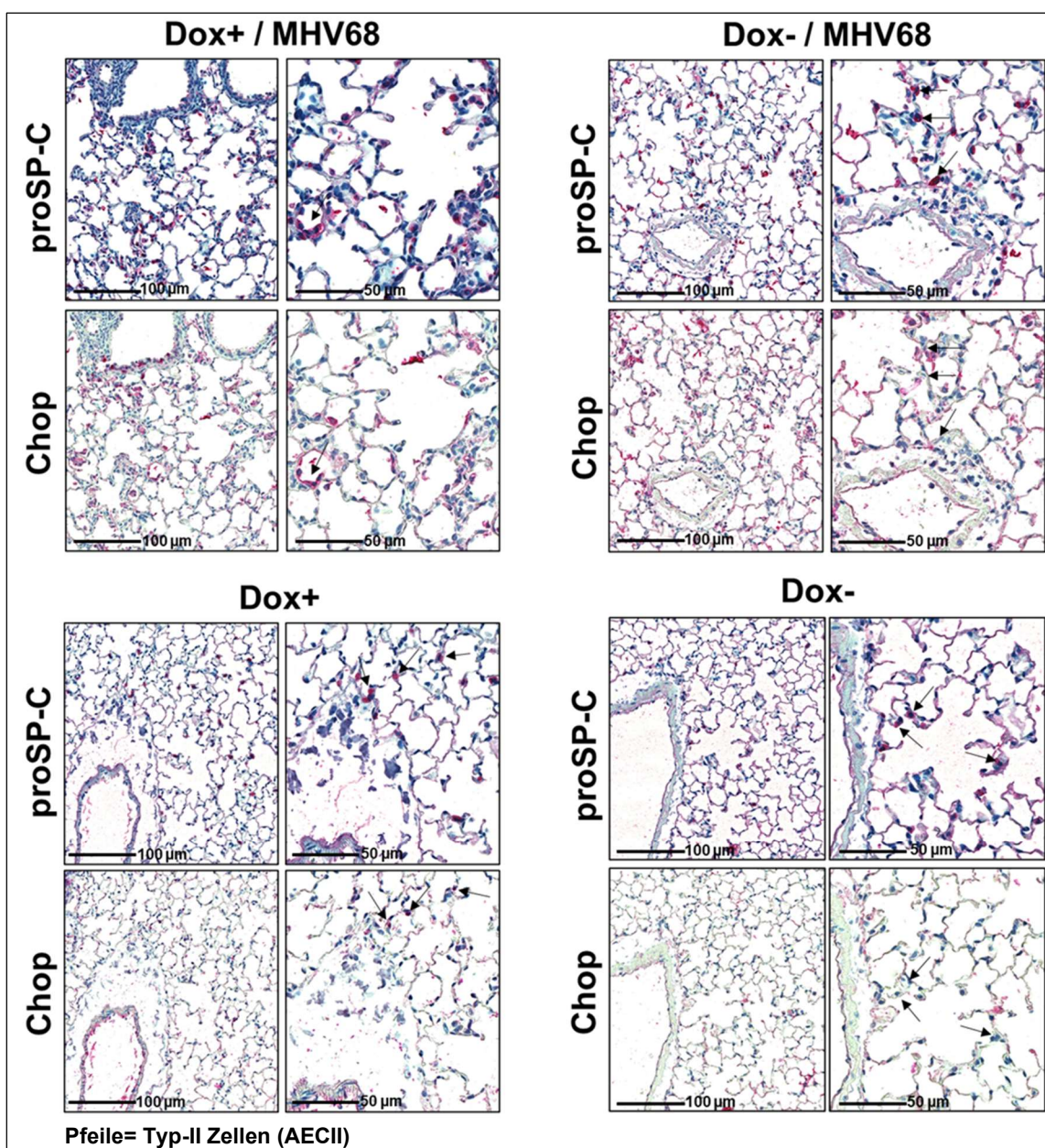
Aufgrund des hier verwendeten transgenen Mausmodells von Chop haben wir zunächst den Status der Chop-Expression in MHV68-infizierten im Vergleich zu nicht infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen beurteilt (Abbi. 4.6). Wie in Abbildung 4.6 A gezeigt, wurde eine ausgeprägte *Chop* mRNA Expression nur bei nicht infizierten sowie MHV68-infizierten transgenen Chop-Mäusen unter 43-tägiger Dox+ Behandlung im Vergleich zu nicht infizierten sowie MHV68-infizierten Dox- transgenen Mäusen ohne Transgen

Induktion festgestellt. Die Analyse der Proteinexpression ergab ein ähnliches Phänomen (Abb. 4.6 B).



Übereinstimmend zeigte die IHC an seriellen Lungenschnitten eine nukleäre Chop-Färbung in proSP-C positiven AECII in den Lungen von nicht MHV68-infizierten sowie infizierten Dox+ gefütterten transgenen Mäusen, nicht jedoch bei Dox- Mäusen und wiederum nicht mal unter Bedingungen einer Herpesvirus-Infektion (Abb. 4.7).

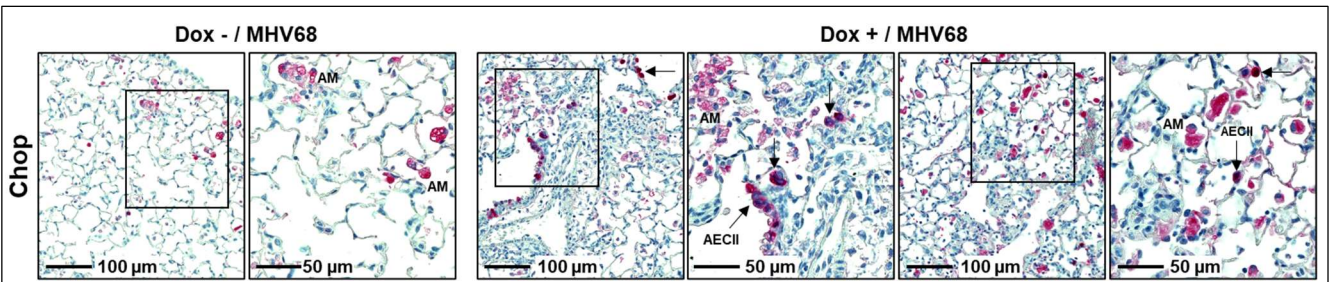




**Abbildung 4.7: Immunhistochemie von proSP-C und Chop in murinen Lungengeweben.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für proSP-C (Marker für AECII) und den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor Chop in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Dabei wurde die Chop-Expression in AECII in den infizierten und nichtinfizierten Dox+ Mäusen festgestellt.

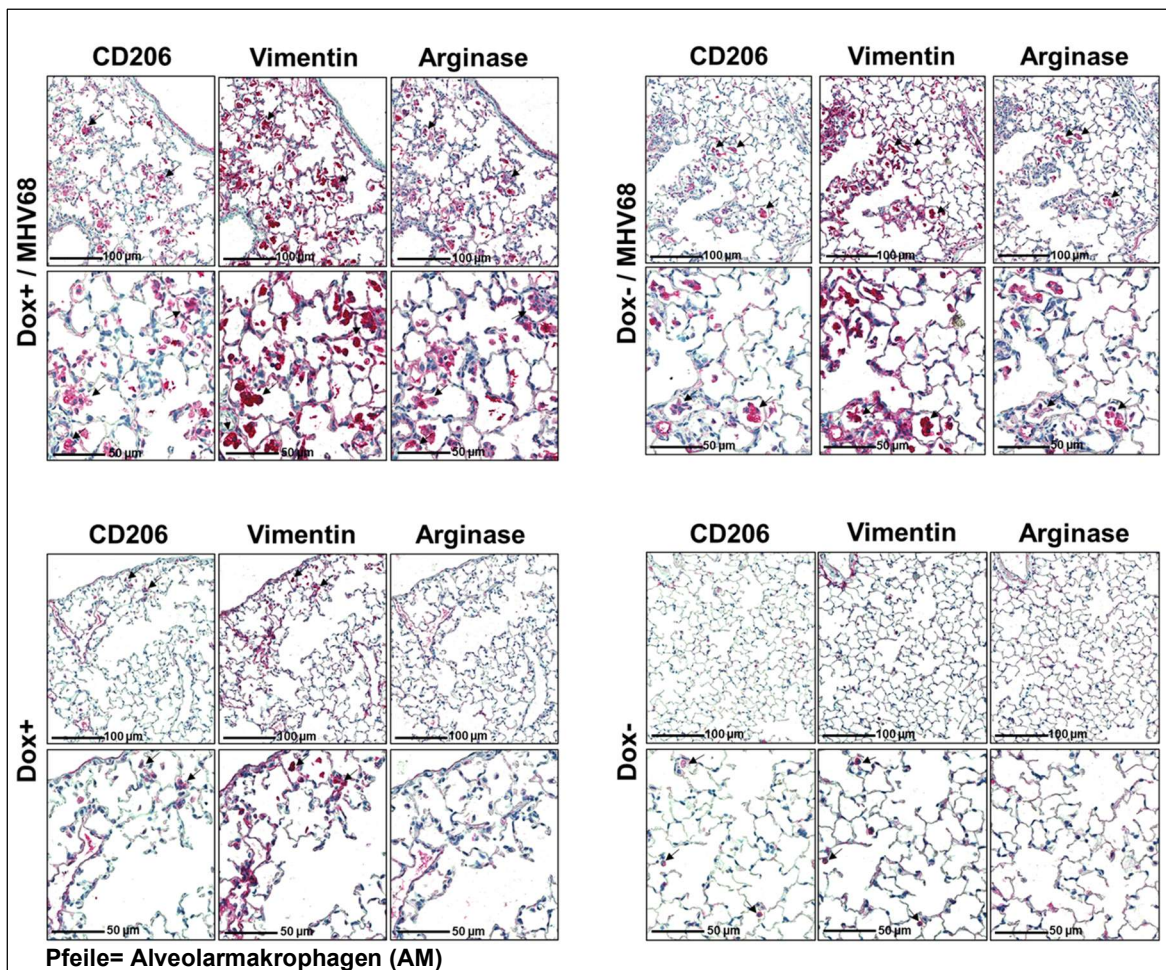
Allerdings wurde in AM in einigen Lungenbereichen eine zytoplasmatische Chop-Expression mit Makrophagenkumulation sowohl bei MHV68 infizierten Dox- als auch bei Dox+ Mäusen festgestellt, die in den AM in den fibrotischen Lungenregionen der infizierten transgenen Dox+ Chop Mäuse intensiver war (Abb. 4.8). Aus der Literatur weiß man schon, dass AM, vor allem M2 AM, eine besondere Rolle in der Entstehung von Lungenfibrose spielen (Hou et al., 2018).





**Abbildung 4.8: Immunhistochemie von Chop in den virusinfizierten Gruppen.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für den pro-apoptischen Transkriptionsfaktor Chop in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Dabei wurde in AM in einigen Lungenbereichen eine zytoplasmatische Chop-Expression mit Makrophagenkumulation sowohl bei MHV68 infizierten Dox- als auch bei Dox+ Mäusen festgestellt, die in den AM in den fibrotischen Lungenregionen der infizierten transgenen Dox+ Chop Mäuse intensiver war.

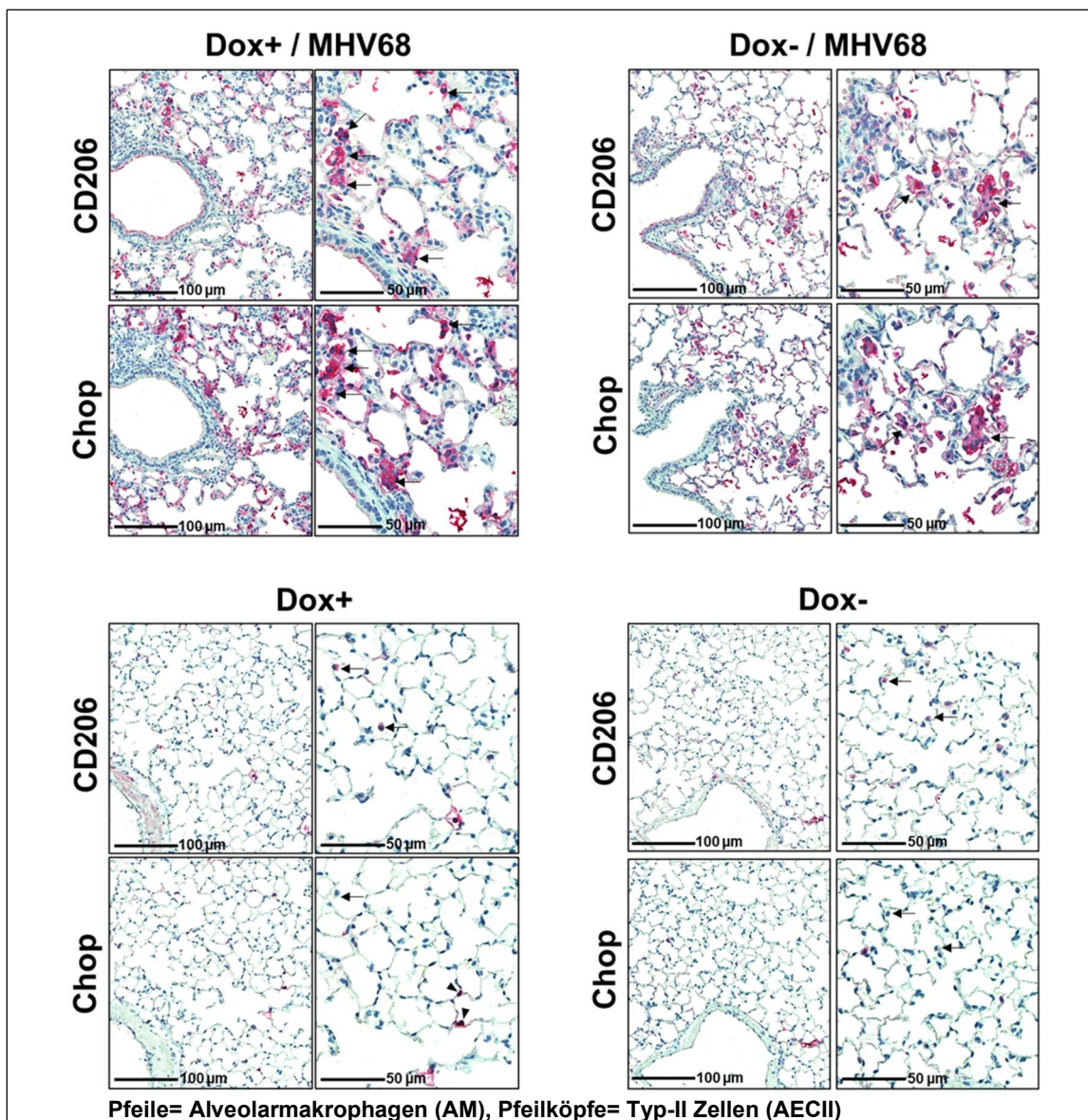
In Abb. 4.9 wurde die Färbung für Vimentin mit den spezifischen M2 Makrophagenmarkern CD206 (Macrophage mannose receptor 1) und Arginase untersucht. Dabei wurde Vimentin in Dox+/MHV68 und Dox-/MHV68 in Zellen detektiert, die CD206+ und Arginase+ sind, was beweist, dass diese Zellen die profibrotischen M2 Makrophagen sind. In Dox+ und Dox- Mäusen konnten wir Vimentin ebenfalls in CD206+ Zellen nachweisen, Arginase+ Makrophagen wurden in Dox+ und Dox- nicht gesehen.





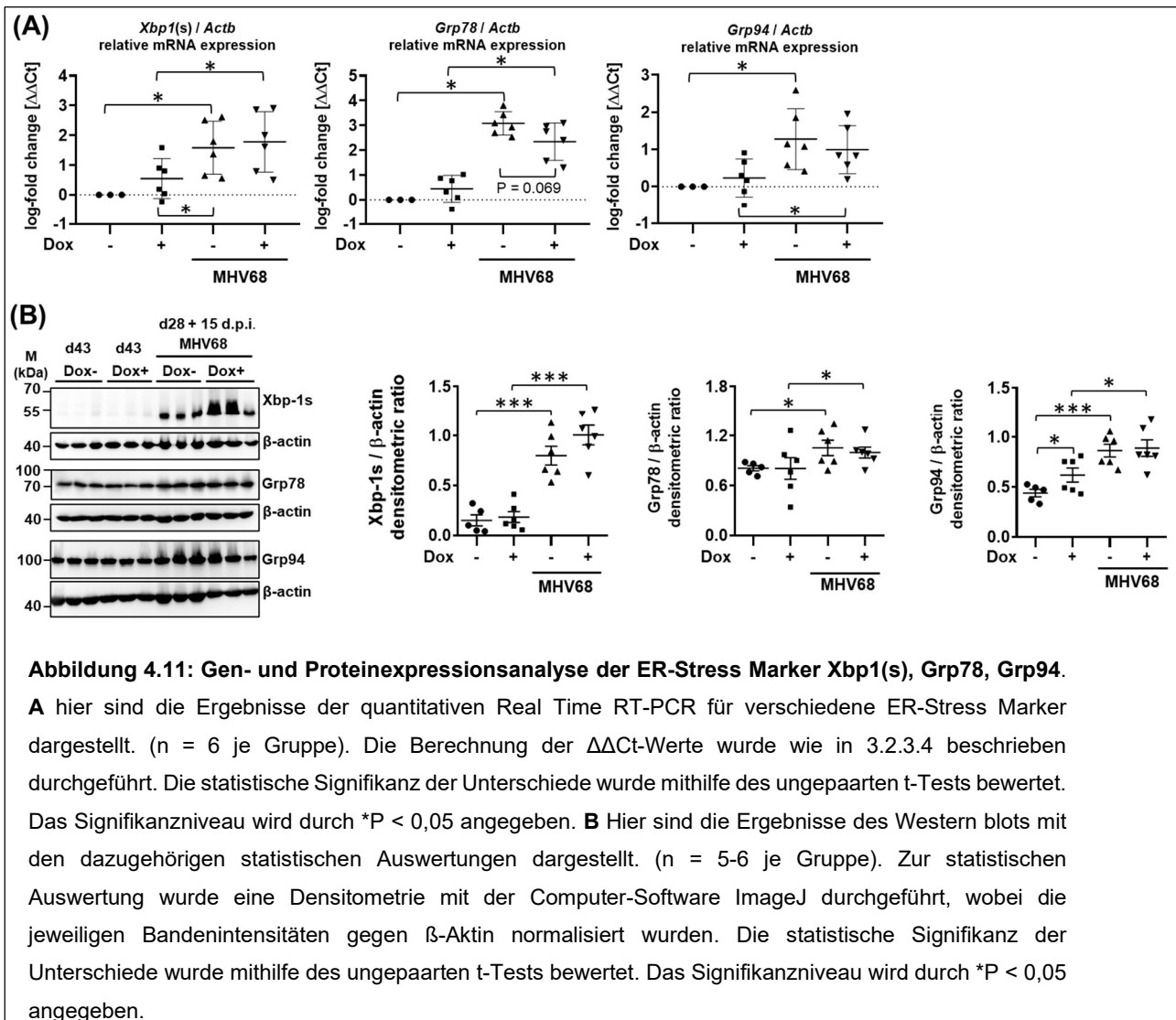
**Abbildung 4.9: Expression und Lokalisation von CD206, Vimentin und Arginase in murinen Lungengeweben.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für CD206, Arginase (Marker für M2 Makrophagen) und den mesenchymalen Zellmarker Vimentin in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten.

In *Co-staining* mit Chop zeigten CD206+ AM eine Chopexpression in den beiden MHV68-infizierten Mäusen, die AM in den nicht infizierten Gruppen zeigten keine Chop Expression. Außerdem wurde in der Gruppe Dox + eine Chopexpression in den wandständigen AECII festgestellt (Abb. 4.10).



**Abbildung 4.10: Immunhistochemie von CD206 und Chop in murinen Lungengeweben.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für CD206 (Marker für AM) und den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor Chop in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten.

Anschließend analysierten wir die pulmonale ER-Stressreaktion in allen vier experimentellen Mausgruppen. Genexpressionsanalyse und quantitativer Immunoblot zeigten einen signifikant erhöhten Spiegel von Xbp-1s, Grp78 und Grp94 in der Lunge sowohl infizierter transgener Dox- als auch Dox+ Chop-Mäuse (bei 15 d.p.i.) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollgruppen (Abb. 4.11).

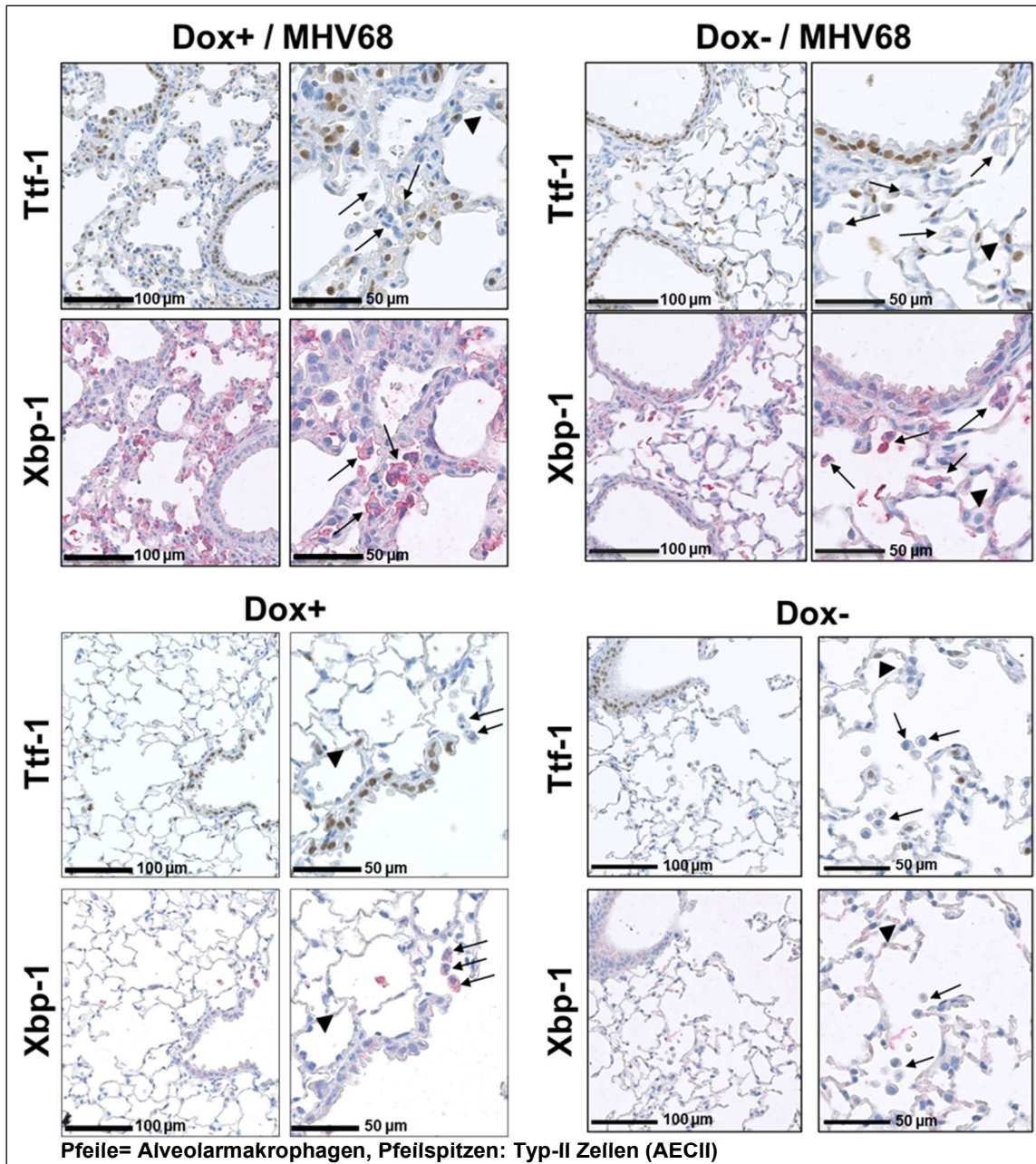


**Abbildung 4.11: Gen- und Proteinexpressionsanalyse der ER-Stress Marker Xbp1(s), Grp78, Grp94.**

**A** hier sind die Ergebnisse der quantitativen Real Time RT-PCR für verschiedene ER-Stress Marker dargestellt. (n = 6 je Gruppe). Die Berechnung der ΔΔCt-Werte wurde wie in 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben. **B** Hier sind die Ergebnisse des Western blots mit den dazugehörigen statistischen Auswertungen dargestellt. (n = 5-6 je Gruppe). Zur statistischen Auswertung wurde eine Densitometrie mit der Computer-Software ImageJ durchgeführt, wobei die jeweiligen Bandenintensitäten gegen β-Aktin normalisiert wurden. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben.

Interessanterweise ergab die IHC, dass Xbp-1 eher weniger in AECII von MHV68-infizierten Mäuselungen angefärbt wurde, was in Parallelschnitten durch Immunfärbung auf *thyroid transcription factor 1* (Ttf-1), ein Marker für AECII und Clara Zellen, angezeigt wurde. Stattdessen wurde Xbp-1 in den AM sowohl in Dox- als auch in Dox+ infizierten transgenen Chop-Mäusen exprimiert, aber auch in den AM in den nicht

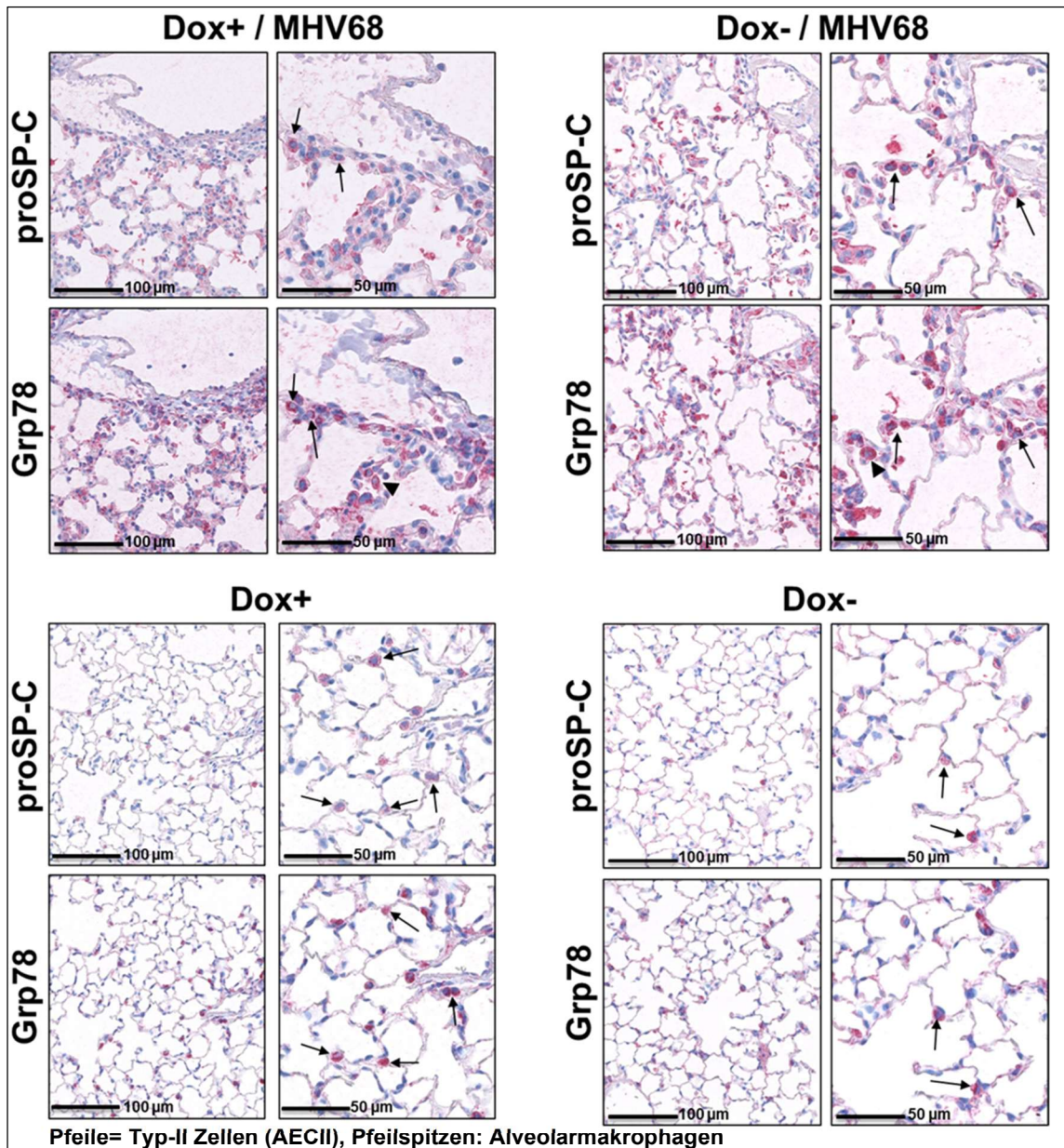
infizierten Dox+ Chop-Mäusen im Vergleich zu naiven Dox- transgenen Mäusen (Abb. 4.12).



**Abbildung 4.12: Immunhistochemie für Ttf-1 und Xbp-1 in murinen Lungengewebe.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für Ttf-1 (Marker für AECII und Clara-Zellen) und den ER-Stress Faktor Xbp-1 in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Dabei wurde die Xbp-1 Expression sowohl in den beiden infizierten Dox+ und Dox- Mäusen als auch in Dox+ Gruppe ohne Virus festgestellt. Die Färbung von Ttf-1 erfolgte mit dem Chromogen DAB (braun), die Färbung von Xbp-1 mit dem Chromogen Fast-Red (rot).

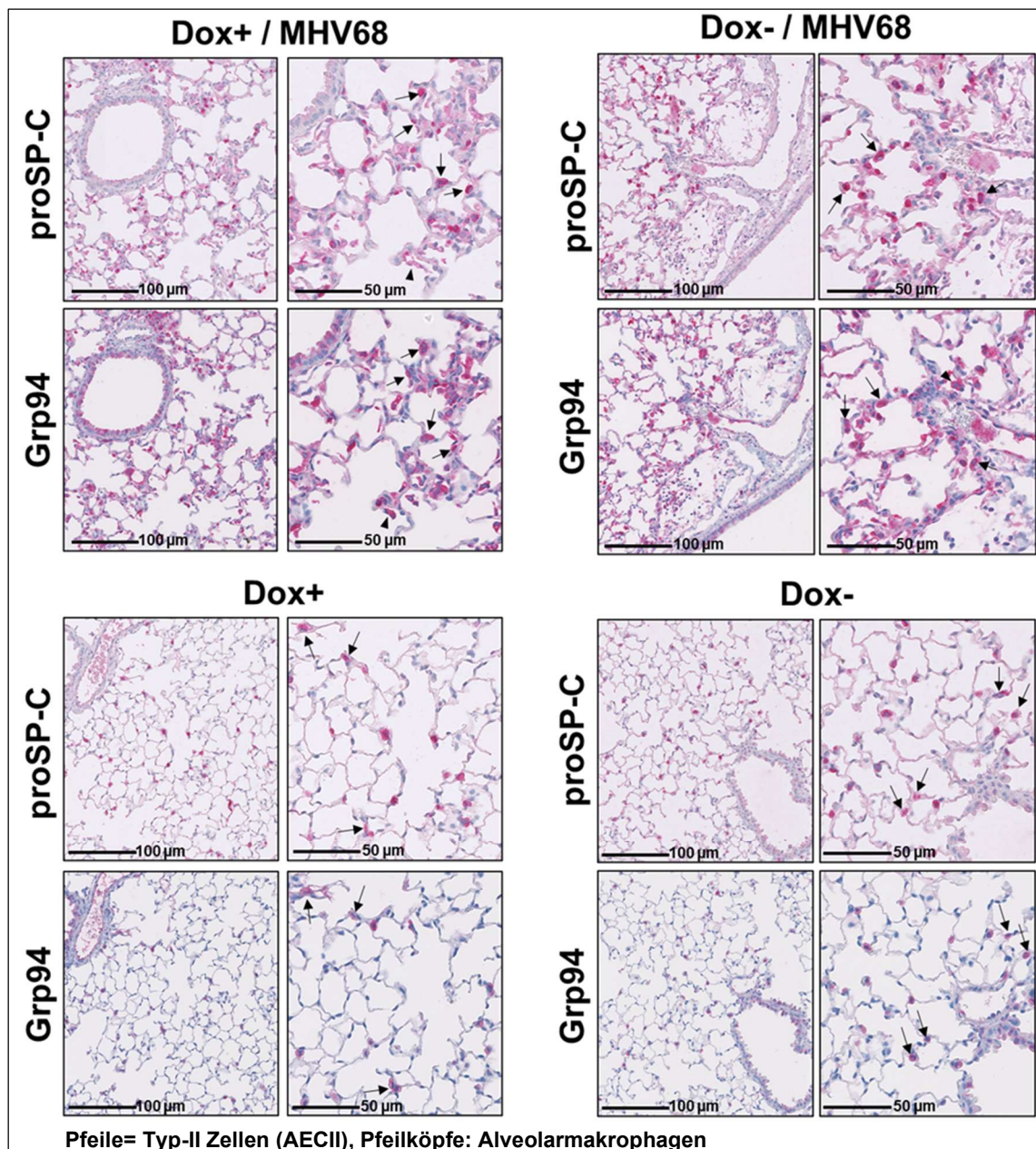
In Bezug auf ER-Chaperone zeigten die Lungen von MHV68-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen eine starke Überexpression von Grp78 und Grp94 in AM sowie AECII im Vergleich zu nicht infizierten transgenen Mäusen (Abb. 4.13 und 4.14).





Pfeile= Typ-II Zellen (AECII), Pfeilspitzen: Alveolarmakrophagen

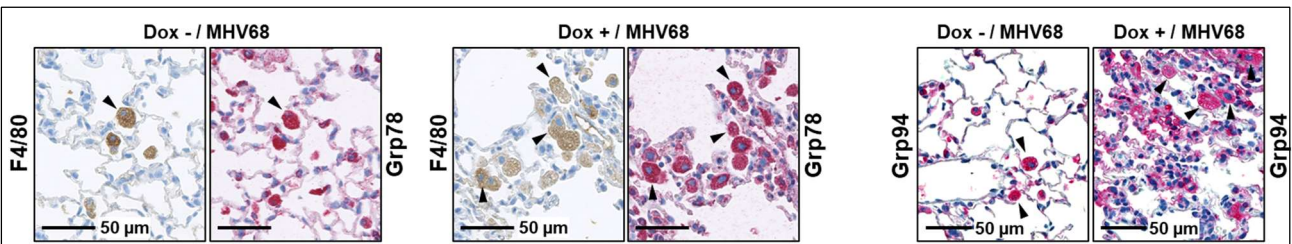
**Abbildung 4.13: Immunhistochemie von proSP-C und Grp78 in murinen Lungengeweben.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für proSP-C (Marker für AECII) und den ER-Stress Faktor Grp78 in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Dabei zeigten die Lungen von MHV68-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen eine starke Überexpression von Grp78 in AM sowie AECII im Vergleich zu nicht infizierten transgenen Mäusen. Die Färbung von proSP-C und Grp78/BiP erfolgte mit dem Chromogen Fast-Red (rot).



**Abbildung 4.14: Immunhistochemie von proSP-C und Grp94 in murinen Lungengeweben.** Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für proSP-C (Marker für AECII) und den ER-Stress Faktor Grp94 in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Wie man sehen kann, zeigten MHV68 infizierte Dox- und Dox+ transgene Mäuse zeigte eine starke Hochregulierung von Grp94 in AM sowie in AECII im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollmäusen, die bei den infizierten Dox+ Mäusen am höchsten war. Die Färbung von proSP-C und Grp94 erfolgte mit dem Chromogen Fast-Red (rot).

Insbesondere schaumige AM der Lungen von MHV68-infizierten Mäusen, die durch Immunfärbung auf F4/80 in seriellen Lungenschnitten identifiziert wurden, deuteten auf eine robuste zytoplasmatische Expression beider ER-Chaperone hin und ihre Anzahl war in den fibrotischen Lungen der infizierten transgenen Dox+ Chop-Mäuse höher (Abb. 4.15).



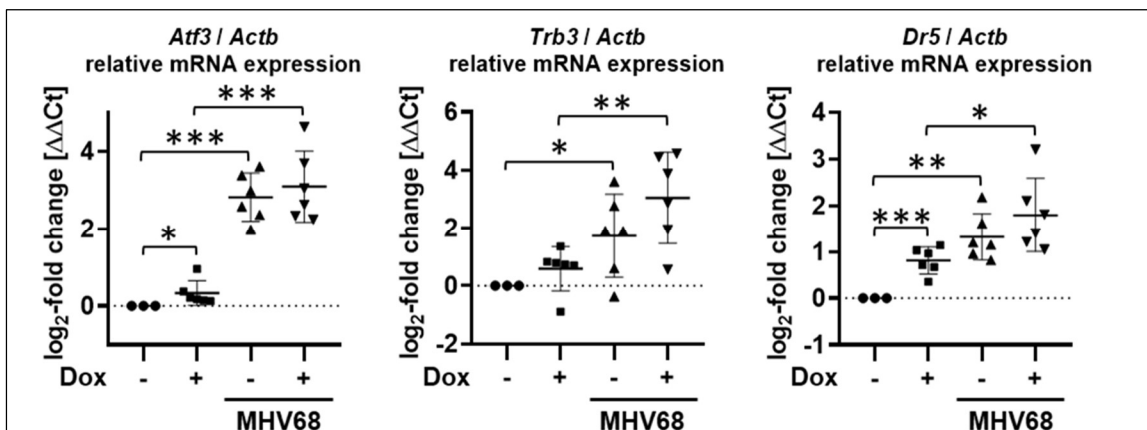


Pfeilköpfe: Alveolarmakrophagen

**Abbildung 4.15: Immunhistochemie von F4/80, Grp78 und Grp94 in den virusinfizierten Gruppen.**

Dargestellt ist das Ergebnis der Immunhistochemie für F4/80 (Marker für Makrophagen) und den ER-Stress Faktoren Grp78 und Grp 94 in seriellen Paraffin-eingebetteten murinen Lungenschnitten. Die Färbung von F4/80 erfolgte mit dem Chromogen DAB (braun), die Färbung von Grp78 und Grp 94 mit dem Chromogen Fast-Red (rot).

Darüber hinaus waren die mRNA-Transkripte für Indikatoren für schweren ER-Stress wie den aktivierenden Transkriptionsfaktor 3 (*Atf3*), *Trb3* und *Dr5* im Lungengewebe beider MHV68-infizierten Mausgruppen bei 15 dpi signifikant erhöht, insbesondere mit einer Tendenz zur Hochregulierung der Chop-Zielgene *Trb3* und *Dr5* in der Lunge infizierter transgener Dox+ Chop-Mäuse (Abb. 4.16).

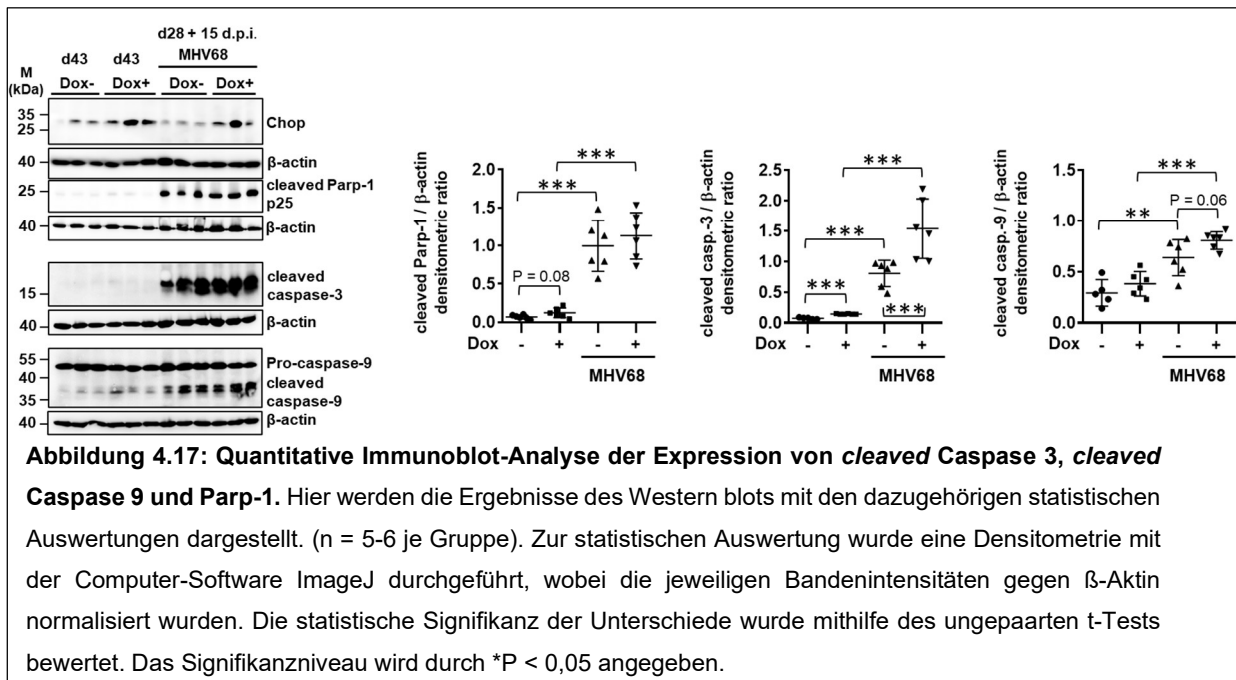


**Abbildung 4.16: Genexpressionsanalyse von schwerem ER-Stress Markern *Atf3*, *Trb3* und *Dr5*.** Hier sind die Ergebnisse der quantitativen *Real Time* RT-PCR für verschiedene ER-Stress Marker dargestellt. (n = 6 je Gruppe). Die Berechnung der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurde wie in 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben.

### 4.3 Erhöhte Apoptose bei Chop-exprimierenden Mäusen, die mit dem Herpesvirus infiziert sind

Als nächstes analysierten wir den Status der apoptotischen Reaktion in der Lunge von nicht infizierten im Vergleich zu MHV68-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen bei 15 dpi. Im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen wurde ein dramatischer Anstieg der

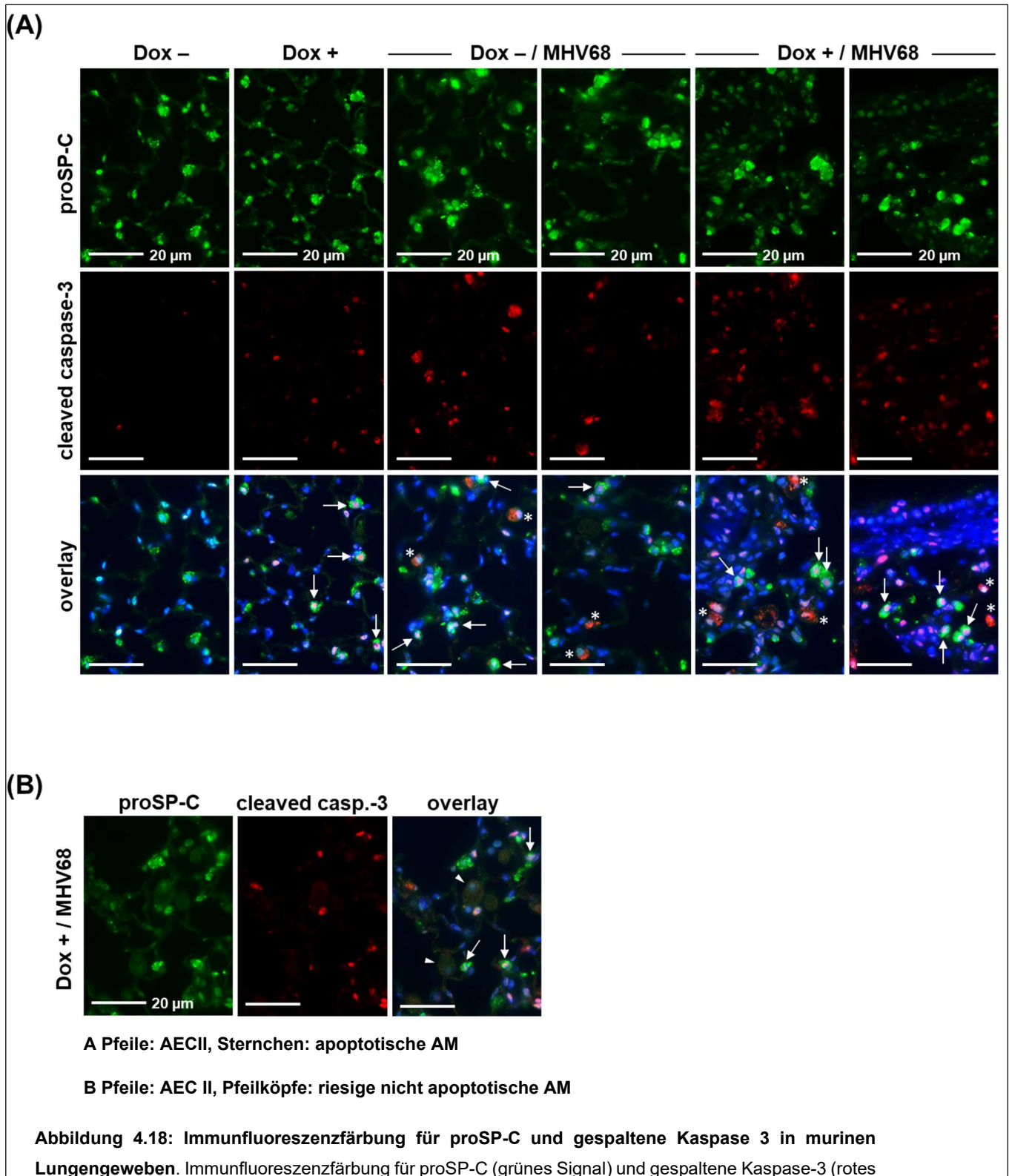
Apoptose durch quantitatives Immunblotting für gespaltenes Parp-1 und aktivierte Kaspasen 3 und -9 im Lungengewebe sowohl von Dox- als auch von Dox+ infizierten Mäusen beobachtet (Abb. 4.17). Allerdings war die Kaspase 3-Aktivierung in der Lunge infizierter transgener Dox+ Mäuse mit erhöhter Chop-Expression im Vergleich zu mit MHV68 infizierten transgenen Dox-Mäusen viel stärker erhöht und auch nicht infizierte Chop-Mäuse unter 43-tägigen Dox+ Bedingungen zeigten im Vergleich zu naiven Dox- Mäusen eine erhöhte pulmonale apoptotische Reaktion.



Hiermit übereinstimmend zeigte die Immunfluoreszenzanalyse für gesplante Kaspase-3 die höchste Anzahl apoptotischer Zellen in der Lunge von MHV68-infizierten Dox+ Chop-Mäusen (Abb. 4.18 A, rote Färbung). Die gleichzeitige Färbung von Lungenschnitten mit anti-proSP-C (Abb. 4.18 A, grüne Färbung) zeigte, dass die Häufigkeit von proSP-C-positiven AECII mit nuklearer Kaspase-3-Aktivierung in den Lungen von MHV68-infizierten Dox+ Chop-Mäusen höher war im Vergleich zu MHV68 infizierten Dox- Mäusen (Abb. 4.18 A, angedeutet durch Pfeile). Außerdem war die AECII-Apoptose auch bei den nicht infizierten Chop-Mäusen unter 43-tägigen Dox+ Bedingungen vorhanden, jedoch nicht bei naiven Dox- transgenen Mäusen (Abb. 4.18 A, linkes Feld, angezeigt durch Pfeile). Darüber hinaus waren in den Lungen von Herpesvirus-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen zahlreiche runde Zellen mit zytoplasmatischem Gehalt an aktiver Kaspase-3 vorhanden, nicht jedoch in nicht infizierten Kontrollmäusen, und zeigten vermutlich AM, die die Apoptose durchliefen

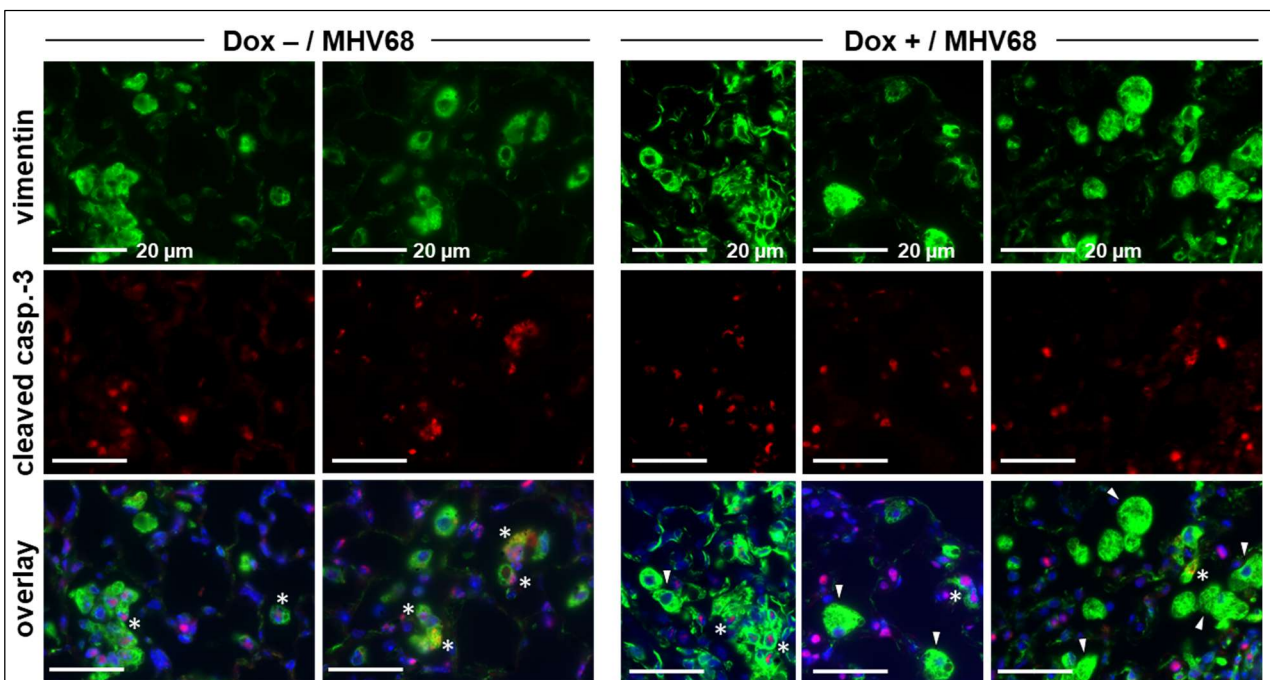


(Abb. 4.18 A, durch Sternchen gekennzeichnet). Interessanterweise schien dieses Phänomen bei sehr großen oder riesigen AM, die im Allgemeinen in der Lunge von Herpesvirus-infizierten Mäusen gefunden wurden, nicht wesentlich vorhanden zu sein (Abb. 4.18 B).



Signal). DAPI (blaues Signal) wurde zur nuklearen Gegenfärbung verwendet. **A** Das Überlagerungsbild zeigte eine nukleare Caspase-3-Aktivierung in proSP-C-exprimierenden Typ-II-Alveolarepithelzellen (angezeigt durch Pfeile). Außerdem zeigten sich vermutlich apoptotisch AM (durch Sternchen gekennzeichnet). **B** Interessanterweise waren in der grünen Hintergrundfluoreszenz sehr große (riesige) proSP-C-negative Zellen sichtbar, die negativ für gespaltene Caspase-3 waren und vermutlich Alveolarmakrophagen (AM) darstellen (angezeigt durch Pfeilköpfe).

Inspiziert von diesen Befunden beurteilten wir als nächstes den Status der AM-Apoptose in den beiden MHV68-infizierten Mausgruppen durch Co-Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten auf gespaltene Caspase-3 zusammen mit Vimentin (Abb. 4.19, Vimentin: grüne Verfärbung, gespaltene Caspase-3: rote Färbung). Vimentin-positive AM mit nuklearer oder zytoplasmatischer Caspase-3-Aktivierung wurden in MHV68-infizierten Lungen sowohl von Dox- als auch von Dox+ Mäusen beobachtet (Abb. 4,19, durch Sternchen angezeigt). Die mit MHV68 infizierten Dox+ Chop-Mäuse, die an Lungenfibrose litten, zeigten allerdings eine Anhäufung von riesigem, nicht-apoptotischen AM in ihrer Lunge (Abb. 4.19, angezeigt durch Pfeilköpfe). Interessanterweise schienen die in den Lungen beider Herpesvirus-infizierten Mäusegruppen beobachteten apoptotischen AM im Allgemeinen kleiner zu sein.



**Pfeilköpfe: riesige nicht apoptotische AM, Sternchen: kleine apoptotische AM**

**Abbildung. 4.19: Immunfluoreszenzfärbung für den Vimentin und apoptotischen Marker gespaltene Caspase 3 in murinen Lungengewebe.** Immunfluoreszenzfärbung für Vimentin (grünes Signal) und gespaltene Caspase-3 (rotes Signal) von Lungengewebeschnitten. DAPI (blaues Signal) wurde zur nuklearen Gegenfärbung verwendet. Das Überlagerungsbild zeigte eine nukleare (rotes Signal) sowie eine zytoplasmatische Expression der gespaltenen Caspase-3 in Vimentin-exprimierenden

---

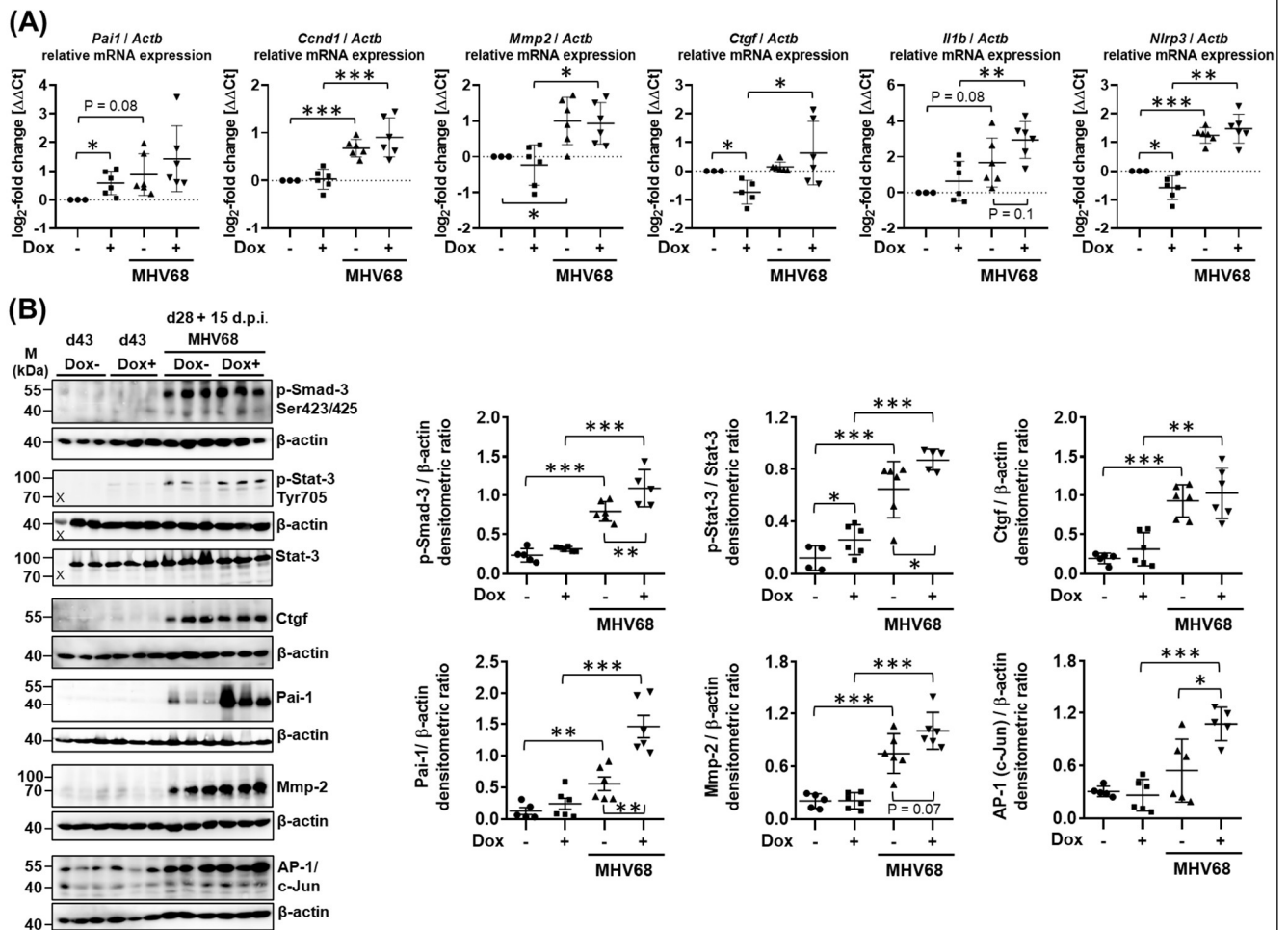
Alveolarmakrophagen (angezeigt durch Sternchen) aber auch nicht-apoptotische große (Riesen-)Makrophagen (angezeigt durch Pfeilköpfe) wurden beobachtet. Nicht-apoptotische Riesenmakrophagen wurden häufig in der Lunge infizierter transgener Dox+ Mäuse beobachtet.

#### 4.4 Charakterisierung der pro- und antifibrotischen Reaktion bei mit Herpesvirus infizierten Chop-exprimierenden Mäusen

Als nächstes analysierten wir die profibrotische Reaktion bei den MHV68-infizierten Chop-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu infizierten Dox-Mäusen ohne Alveolar-Chopexpression. Im Vergleich zu nicht MHV68-infizierten Dox- und Dox+ Kontrollmäusen war die mRNA-Expression der profibrotischen Marker *Pai1*, *Ccnd1*, *Mmp2* und *Ctgf* in MHV68-infizierten Lungen sowohl von Dox- als auch von Dox+-transgenen Mäusen im Allgemeinen erhöht, jedoch mit einer deutlichen Tendenz zur Hochregulierung von *Pai1* und *Ctgf*-Transkripten im MHV68-infizierten, Dox+ (Chop exprimierenden) Mäusen im Vergleich zu den infizierten Dox-Mäusen ohne Transgen-Induktion (Abb. 4.20 A). Ähnliche Beobachtungen wurden für das proinflammatorische Zytokin *Il1b* und das Inflammasom-Schlüsselprotein 'NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3' (*Nlrp3*) gemacht.

Da die Transkriptionsfaktoren „Mothers against decapentaplegic homolog 3“ (Smad-3) und Stat-3 überwiegend an der Myofibroblastenaktivierung und Gewebefibrose beteiligt sind, analysierten wir ihren Aktivierungsstatus im Lungengewebe aller vier experimentellen Mausgruppen durch quantitatives Immunblotting. Die Ergebnisse zeigten offensichtlich, dass die Lungen von Dox+ behandelten, Chop-exprimierenden Mäusen, die mit MHV68 infiziert waren, mit hoher Signifikanz die größte Phosphorylierung und Aktivierung von Smad-3 und Stat-3 zeigten, verglichen mit infizierten Dox- transgenen Mäusen und nicht infizierten Dox- und Dox+ Kontrollen (Abb. 4.20 B). Übereinstimmend waren die Proteinspiegel für Ctgf, Pai-1, Mmp-2 und den profibrotischen Transkriptionsfaktor AP-1/c-Jun bei MHV68-infizierten Dox+ Mäusen im Vergleich zu Dox-Mäusen hochreguliert, mit besonders hoher Signifikanz insbesondere für Pai-1 und AP -1 (Abb. 4.20 B). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen die Smad-3/Stat-3-Aktivierung und die Expression profibrotischer Proteine auch in der Lunge von MHV68-infizierten Dox-transgenen Mäusen, die an Pneumonitis litten, erhöht waren, allerdings in einem viel

geringeren Ausmaß als in der fibrotischen Lunge infizierter Dox+ Chop-exprimierender Mäuse (Abb. 4.20 B).

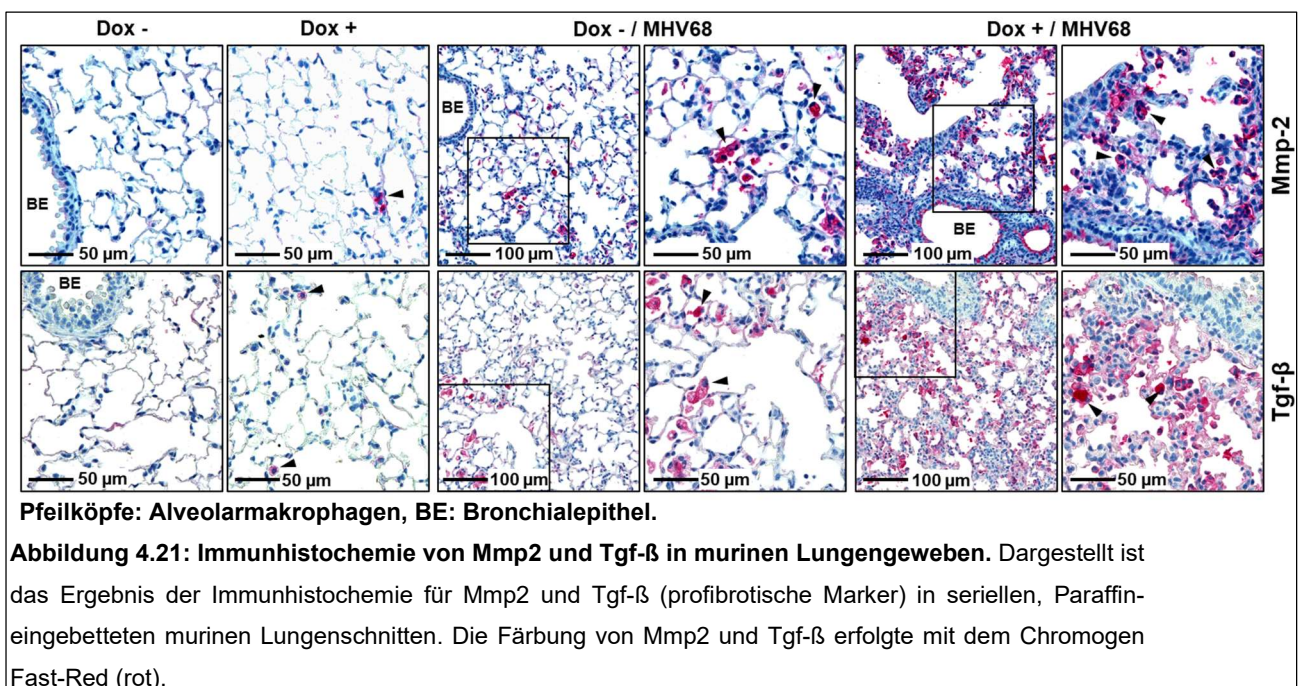


**Abbildung 4.20: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von pro-fibrotischen und proinflammatorischen Faktoren.** **A** Ergebnisse der quantitativen *Real Time* RT-PCR für unterschiedliche profibrotische und proinflammatorische Marker. (n = 6 je Gruppe). Die Berechnung der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurde wie in 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben. **B** Ergebnisse des Western blots mit den dazugehörigen statistischen Auswertungen. (n = 5-6 je Gruppe). Zur statistischen Auswertung wurde eine Densitometrie mit der Computer-Software ImageJ durchgeführt, wobei die jeweiligen Bandenintensitäten gegen  $\beta$ -Aktin bzw. Gapdh normalisiert wurden. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben.

In Übereinstimmung mit den Immunblot-Daten zeigte die immunhistochemische Analyse eine signifikante Überexpression von Mmp-2 in den AM beider Herpesvirus-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen bei 15 d.p.i., die bei den AM-Kumulationen in fibrotischen Lungen von MHV68-infizierten transgenen Dox+ Chop-Mäusen weitaus stärker war (Abb. 4.21). Darüber hinaus zeigte das Bronchialepithel bei



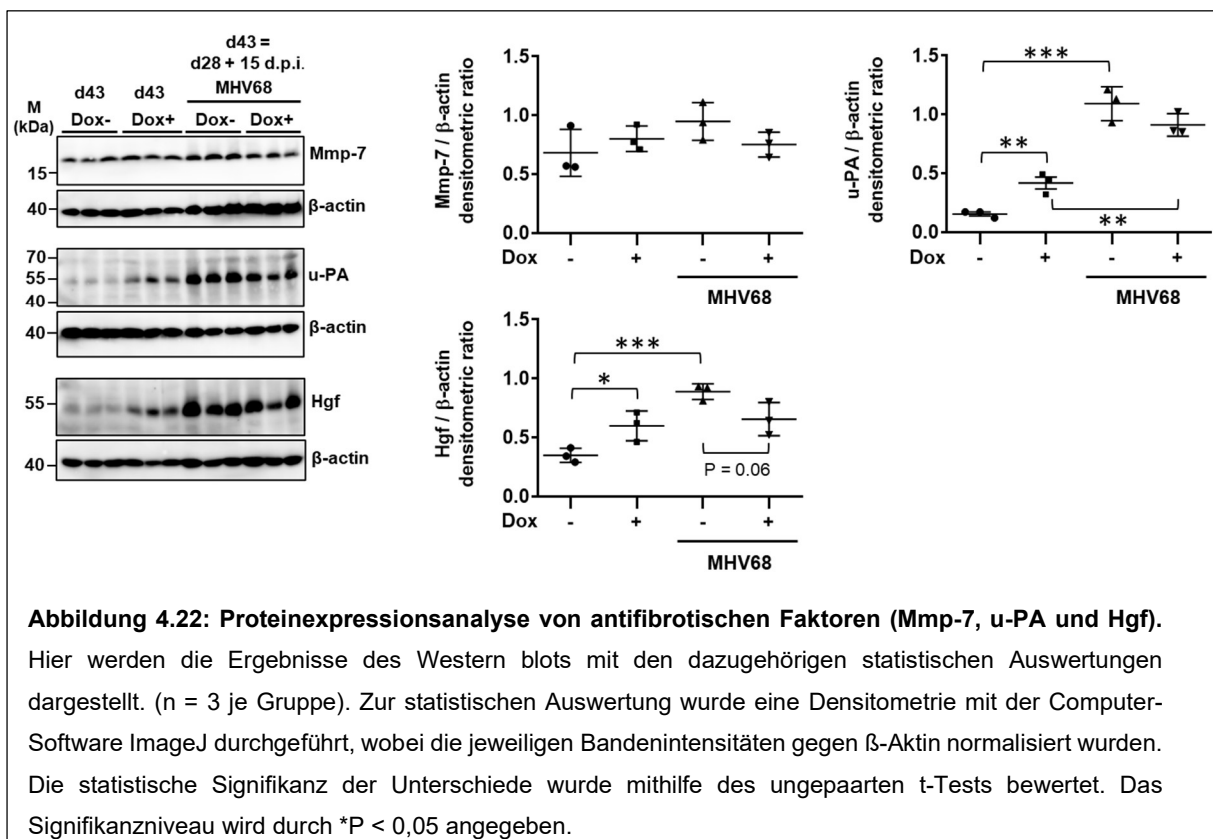
diesen Mäusen in der Nähe von Bereichen mit dichter Fibrose eine hochregulierte Mmp-2-Expression, wohingegen Bronchiolen infizierter Dox- Mäuse keine Expression von Mmp-2 zeigten. Zudem wurde festgestellt, dass TGF- $\beta$  in Bereichen mit Anreicherung mit AM beider MHV68-infizierter Mausgruppen überexprimiert ist, wobei die Hochregulierung in den fibrotischen Lungen infizierter transgener Dox+ Chop-Mäuse viel stärker ist (Abb. 4.21). Bemerkenswert ist, dass nicht infizierte Chop-Mäuse unter Dox+ Bedingungen 43 Tage lang auch einen Anstieg der Mmp-2- und Tgf- $\beta$ -exprimierenden AM im Vergleich zu nicht infizierten Dox-transgenen Mäusen zeigten (Abb. 4.21), wodurch der profibrotische Phänotyp der transgenen Chop-Mäuse bestätigt wurde.



HGF ist ein Wachstumsfaktor mit einer anti-apoptotischen Funktion in epithelialen und endothelialen Zellen. *In vitro* hemmt HGF die epithelial-mesenchymale Transition und fördert die Apoptose in Myofibroblasten. *In vivo* hat HGF anti-fibrotische Charakteristika in experimentellen Modellen von Lunge-, Nieren-, Haut- und Leberfibrose gezeigt (Crestani et al., 2012).

Um die Rolle von diesem Faktor in unserem Mausmodell zu untersuchen, wurde Hgf auf der Proteinexpressionsebene untersucht (Abb. 4.22), dabei wurde folgendes festgestellt: Es zeigte sich eine signifikante Induktion von Hgf in den Gruppen Dox+/MHV68, Dox-/MHV68 und Dox+ im Vergleich zur Gruppe Dox-. Interessanterweise ist die Expression von Hgf in der Gruppe Dox+/MH68 nicht signifikant reduziert im Vergleich zur Gruppe

Dox-/MHV68. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass wegen der fibrotischen Umwandlung in der Gruppe Dox+/MHV68 anti-fibrotische Faktoren wie Hgf weniger exprimiert werden als in der Gruppe Dox-/MHV68. Urokinase oder Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, kurz u-PA, ist eine Peptidase und spielt eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse und besitzt eine antifibrotische Funktion (Günther et al., 2003). In der (Abb. 4.22) zeigte u-PA eine vermehrte signifikante Expression in den Virusgruppen gegenüber Dox+ und Dox-. Die Expression ist allerdings in Dox+/MHV68 geringer als in Dox-/MHV68. Mmp-7 zeigte keine relevanten Expressionsunterschiede.



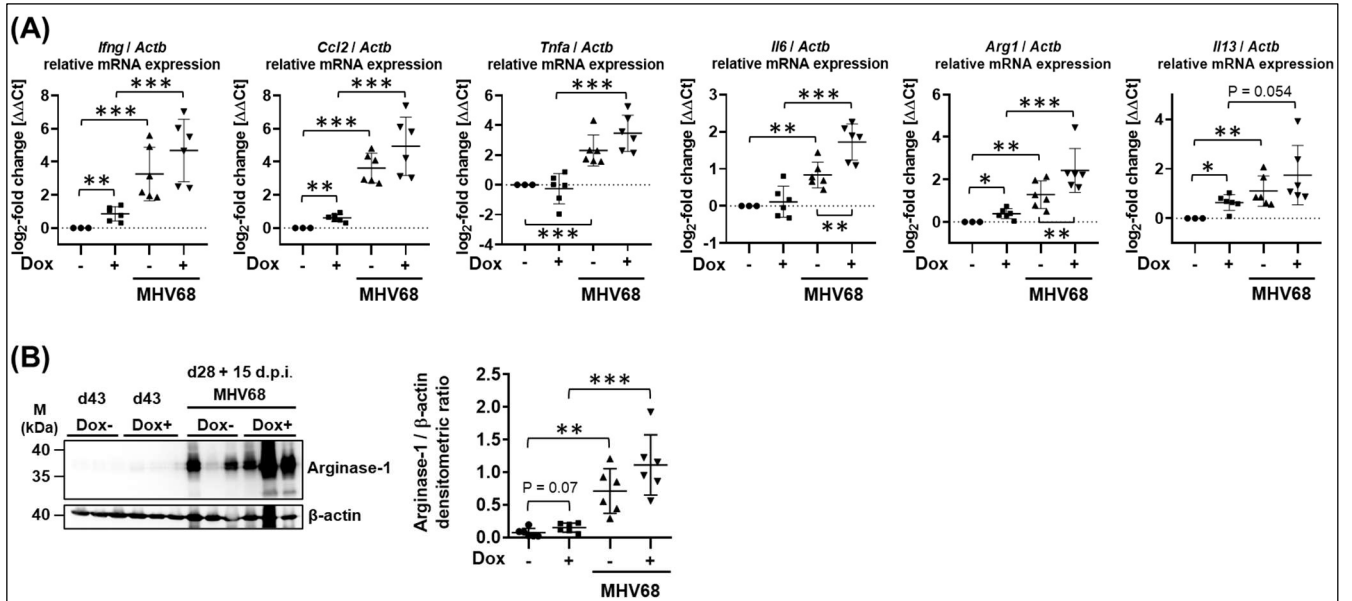
#### 4.5 Die mit Herpesviren infizierten Chop-exprimierenden Mäuse zeigten eine erhöhte M2-Makrophagenpolarisation

Schließlich haben wir den Status der Makrophagen-Biogenese und M2-Makrophagen-Differenzierung in der Lunge von Dox+ (Chop-exprimierenden) Mäusen im Vergleich zu mit MHV68 infizierten Dox- Mäusen und im Vergleich zu den nicht infizierten Dox+ und Dox- Kontrollen untersucht. In Übereinstimmung mit der beobachteten Makrophagen-

---

Rekrutierung und AM-Kumulationen bei einer Herpesvirus-Infektion (Abb. 4.4) war die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine *Ifng*, *Ccl2* (*C-C motif chemokine 2*, auch bekannt als *monocyte chemoattractant protein 1*), *Tnfa* und *Il6* in der Lunge von MHV68 infizierten Dox<sup>+</sup> und Dox<sup>-</sup> transgenen Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollmäusen (Abb. 4.23 A). Wichtig ist, dass diese Marker für die klassische M1-Makrophagenaktivierung in der Lunge von MHV68-infizierten Dox<sup>+</sup> Chop-Mäusen stärker hochreguliert waren als in infizierten Dox<sup>-</sup> Mäusen, obwohl der Unterschied nur für *Il6* eine statistische Signifikanz erreichte. Darüber hinaus zeigten die Lungen von MHV68-infizierten Dox<sup>+</sup> (Chop exprimierenden) Mäusen im Vergleich zu infizierten Dox<sup>-</sup>Mäusen (und nicht infizierten Kontrollen) gleichzeitig eine erhöhte Expression des M2-Makrophagen-Markers Arginase-1 (*Arg1*) und des Th2-Zytokins *Il13*, von dem bekannt ist, dass es eine alternative Aktivierung von (residentem) AM induziert (Zhang et al., 2016) (Abb. 4.23 A). Obwohl IL-6 als proinflammatorisches Zytokin gilt, wurde interessanterweise auch berichtet, dass es die Polarisation von M2-Makrophagen fördert (Braune et al., 2017). Darüber hinaus wurde die gemischte Hochregulation von Th1- und Th2-Zytokinen zusammen mit *Arg1* im Allgemeinen auch in der Lunge von nicht infizierten (Chop-exprimierenden) Dox<sup>+</sup> Mäusen im Vergleich zu naiven Dox<sup>-</sup> Mäusen beobachtet (Abb. 4.23 A), allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als unter Bedingungen einer MHV68-Infektion.

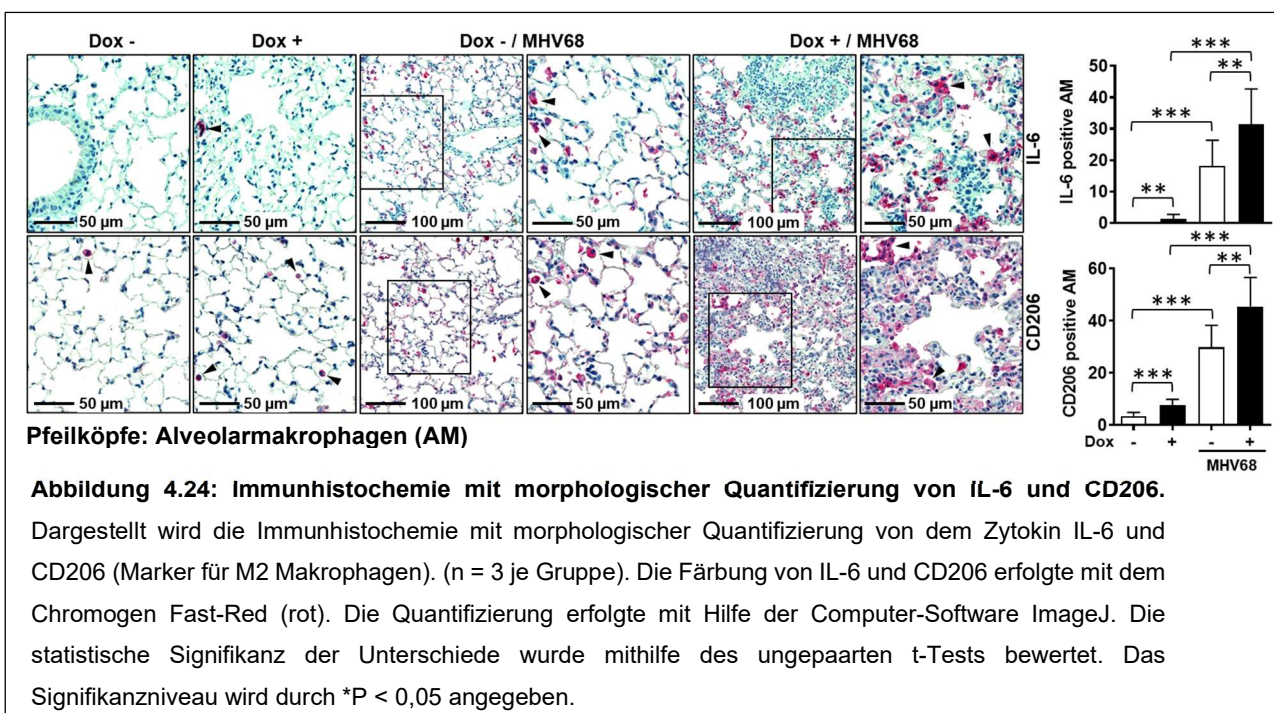
In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten war die Proteinexpression von Arginase-1 in der Lunge von Dox<sup>+</sup> (Chopexprimierenden) Mäusen, die mit MHV68 infiziert waren, im Vergleich zu allen anderen Mäusegruppen am höchsten (Abb. 4.23 B). Eine leichte Hochregulierung des Arginase-1-Proteins war auch in der Lunge von nicht infizierten Chop-exprimierenden Mäusen unter 43-tägiger Dox<sup>+</sup> Behandlung im Vergleich zu naiven, Dox<sup>-</sup>transgenen Mäusen zu beobachten (Abb. 4.23 B).



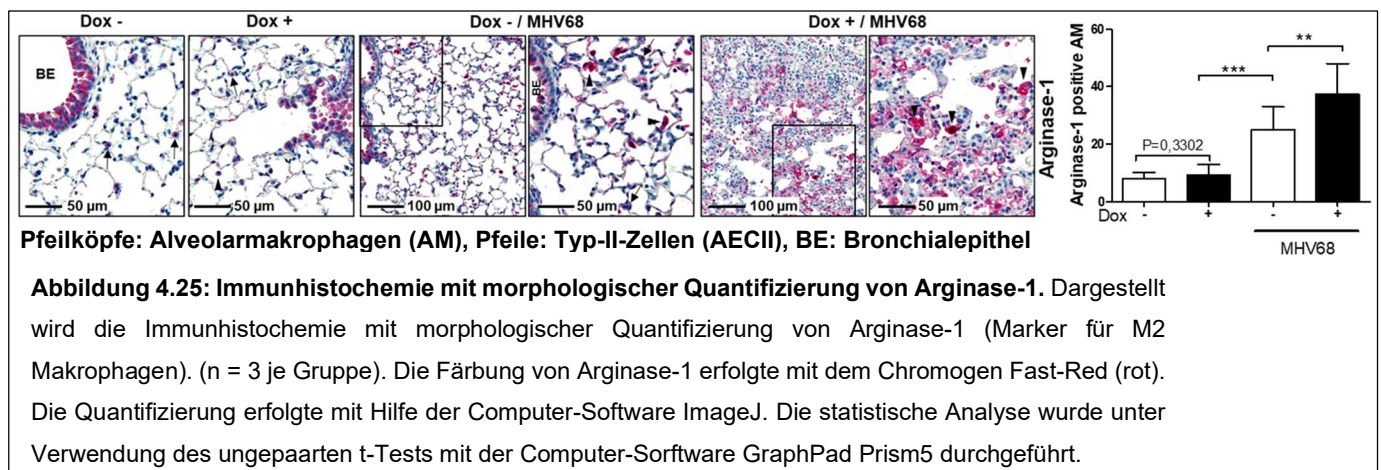
**Abbildung 4.23: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von Th1 und Th2 Markern sowie von M2 Makropagenmarkern.** **A** Ergebnisse der quantitativen Real Time RT-PCR für Th1, Th2 und M2 Makropagen Marker. (n = 6 je Gruppe). Die Berechnung der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurde wie in 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben. **B** Ergebnis des Western blots für den M2 Makropagen Marker Arginase-1 mit dazugehöriger statistischer Auswertung dargestellt. (n = 6 je Gruppe). Zur statistischen Auswertung wurde eine Densitometrie mit der Computer-Software ImageJ durchgeführt, wobei die jeweiligen Bandenintensitäten gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert wurden. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests bewertet. Das Signifikanzniveau wird durch \*P < 0,05 angegeben.

Schließlich zeigte die immunhistochemische Analyse eine signifikante IL-6-Hochregulation in den AM beider Herpesvirus-infizierten Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen bei 15 d.p.i., die bei den AM-Kumulationen in fibrotischen Lungen von MHV68-infizierten transgenen Dox+ (Chopexprimierenden) Mäusen weitaus stärker war (Abb. 4.24). In ähnlicher Weise wurde festgestellt, dass der M2-Makropagenmarker CD206 (auch bekannt als Makropagen-Mannose-Rezeptor 1) in AM-Kumulationen beider MHV68-infizierter Mausgruppen überexprimiert ist, wobei die Hochregulierung in den fibrotischen Lungen infizierter transgener Dox+ (Chopexprimierenden) Mäuse deutlich stärker ausgeprägt ist (Abb. 4.24). In Übereinstimmung mit dem profibrotischen Phänotyp transgener Chop-Mäuse zeigten nicht infizierte Chop-Mäuse unter Dox+ Bedingungen 43 Tage lang auch einen Anstieg von IL-6 oder CD206 im Vergleich zu nicht infizierten Dox- transgenen Mäusen (Abb. 4.24).





Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der immunhistochemischen Analyse für Arginase-1 gemacht. Die AM von Herpesvirus-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen zeigten eine signifikante Expression von Arginase-1 (Abb. 4.25, angezeigt durch Pfeilköpfe) mit der höchsten Akkumulation von Arginase-1-positivem AM in den fibrotischen Lungen von MHV68-infizierten transgenen Dox+ Mäusen. Arginase-1 wurde im Allgemeinen auch im Bronchialepithel (BE) sowie in AECII (Abb. 4.25, angezeigt durch Pfeile) von nicht infizierten und MHV68-infizierten transgenen Dox- und Dox+ Mäusen gefunden.



---

## 5. Diskussion

Die idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronische pulmonale Erkrankung unbekannter Ätiologie und gehört zu den diffusen parenchymatösen Lungenerkrankungen, sie ist durch einen progressiven Verlauf, eine signifikante Morbidität und eine schlechte Prognose gekennzeichnet (Sgalla et al., 2018). Zur Pathogenese sind verschiedene Theorien in der Literatur zu finden. Die chronische Schädigung und Apoptose des alveolären Epithels, genauer der Typ II Zellen (AECII), stehen bei der Pathogenese als Auslöser im Mittelpunkt dieser Diskussion. Das aktuelle Paradigma zur Pathogenese der IPF besagt, dass repetitive epitheliale Schädigungen und ein programmiertes Zelltod im Zusammenhang mit genetischen Faktoren zur Aktivierung von Fibroblasten führen, mit einem aberranten, fibroproliferativ geprägten Wundheilungsprozess (Burman et al., 2018b).

Das endoplasmatische Retikulum ist für die Homöostase des Proteinhaushalts verantwortlich. Es hilft der Proteinfaltung und dient der Qualitätskontrolle der Proteinproduktion. Jede Störung in diesem Prozess kann zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen führen und einen ER-Stress hervorrufen. Unabhängig von der genauen Identität dieser Störung wird der ER-Stress durch die Ungefaltete Protein Antwort (``unfolded protein response``, UPR), bestehend aus genereller translationaler Attenuation (allgemein reduzierte Produktion von Proteinen), Induktion von ER-Chaperonen (Helfermoleküle zur korrekten Faltung von Proteinen) und Aktivierung der Proteindegradationsmaschinerie, beseitigt. Kann der ER-Stress dadurch nicht beendet werden, entwickelt sich eine maladaptive, d.h. nachteilig angepasste, apoptotische UPR (Tanjore et al., 2012). Aktuell ist durchaus bekannt, dass ER-Stress/UPR eine pathologische Rolle in der Fibrose von multiplen Organen wie Leber, Niere und Lunge spielt (Tanjore et al., 2013).

Wie bereits oben erwähnt spielt die chronische Schädigung von AECII mit nachfolgender Apoptose eine essentielle Rolle bei der IPF. Sie führt zur Aktivierung und Transdifferenzierung von Fibroblasten zu kontraktilen kollagen-produzierenden Myofibroblasten (Uhal et al., 1998). In vielen Publikationen wurde ein maladaptiver, apoptotischer ER-Stress in AECII von Patienten mit sporadischer und familiärer IPF beobachtet (Korfei et al., 2008; Lawson et al., 2008; Cha et al., 2012). In familiären

---

Formen kann der ER-Stress durch Mutationen von Genen der Surfactant Proteinen SP-C (*SFTPC*) und SP-A (*SFTPA*), die eine Fehlfaltung von SP-C bzw. SP-A verursachen, hervorgerufen werden (Thomas et al., 2002; Maitra et al., 2010). Bei den sporadischen Fällen werden mehrere Ursachen vom ER-Stress/UPR wie Umweltfaktoren, oxidativer Stress, DNA Schädigung, virale Infektionen und Altern diskutiert (Yoshida, 2007; Wang and Kaufman, 2012). Falls die ER-Homöostase nicht wiederhergestellt werden kann, wird eine maladaptive, apoptotische UPR ausgelöst, indem verschiedene Signalwege eingeleitet werden, u.a die Hochregulation vom proapoptotischen Transkriptionsfaktor C/EBP homologous protein (CHOP) (Zinszner et al., 1998). CHOP induziert die Transkription von proapoptotischen Faktoren wie BH-3 only (*BIM*) (Puthalakath et al., 2007) und Death receptor 5 (*DR5*) (Yamaguchi and Wang, 2004) und hemmt anti-apoptotische Gene wie B-cell leukemia/lymphoma 2 protein (*BCL2*) (McCullough et al., 2001).

Um den Einfluss vom CHOP auf die Apoptose in AECII weiter abzuklären, wurde *in vitro* Chop in einem Experiment mit konditionaler Chop Überexpression in epithelialen AECII-like MLE12 Zellen (murin) durch die Verwendung des "Tetracycline-On" Vektorsystems induziert. Eine erhöhte Expression von der gespaltenen Kaspase 3 wurde 6 h nach CHOP Überexpression in MLE12 Zellen nachgewiesen, außerdem war Laktat Dehydrogenase (LDH) als Zellmarker des Zelluntergangs 6 h nach CHOP Überexpression ebenfalls signifikant erhöht (Klymenko et al., 2019). ER-Stress assoziiertes Zellsterben durch CHOP-vermittelte Apoptose wurde zudem in verschiedenen Erkrankung wie Typ-II Diabetes (Oyadomari et al., 2002), Steatohepatitis (Toriguchi et al., 2014) und Organfibrose wie Leber, Niere und Lunge (Toriguchi et al., 2014; Yao et al., 2016; Burman et al., 2018a) festgestellt. Weiterhin schützt die Deletion von *CHOP/Chop* Genen in mehreren Zelllinien *in vitro* vor der ER-Stress-induzierten Apoptose (Zinszner et al., 1998; Yoshida, 2007).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die konditionale Chop-Überexpression in alveolären Typ-II-Zellen (AECII) in einem transgenen Maus-Modell *in vivo* (doppelt-transgene SP-C rtTA/tetO7-Chop-Mäuse) ebenfalls zu der Induktion von Kaspase-3-Spaltung und somit zur Apoptose dieser Zellen führte. Zusätzlich wurde eine Induktion und Hochregulation der pro-apoptotischen "Chop-Zielgene" *Casp11*, *Il1b*, *Il6*, *Ero1a*, *Dr5* und *Gadd34* auf Transkriptebene durch qPCR beobachtet. Jedoch zeigten die

---

transgenen Mäuse mit konditionaler, AECII-spezifischer Überexpression von Chop nach einem Monat keine Entwicklung von Lungenfibrose, obwohl profibrotische Gene in den Maus-Lungen signifikant hochreguliert waren (Dissertation Klymenko, Oleksiy, Universität Gießen, 2016). Wir vermuteten daher, dass die in diesem Model auslösbare Apoptose durch die Transgeninduktion nicht ausreichend war, um eine Fibrose auszulösen und dass *second hits* wie z. B. oxidativer Stress (durch Umwelt-Faktoren) oder durch eine respiratorische Infektion notwendig sind, um den ER-Stress bzw. die Apoptose der AECII zu verstärken und dann eine Fibrose auszulösen. In der Literatur wird beschrieben, dass in den Lungen von Patientin DNA von einem oder mehreren Herpesviren mit IPF nachgewiesen werden kann, was eine Involvierung von Herpesvirus-Infektion in der Pathogenese der IPF zumindest vermuten lässt (Tang et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden tierexperimentelle Versuche mit transgenen Mäusen ausgewertet, die Chop im alveolären Epithel durch die Gabe von Doxycyclin überexprimieren. Dabei wurde gezielt der Frage nachgegangen, ob die Maus mit AECII-spezifischer, konditionaler Überexpression von Chop (durch das Tetrazyklin on/off System) ein Individuum mit genetischer Suszeptibilität zur Entwicklung einer Lungenfibrose darstellt, welches durch "*second hits*" wie z. B. oxidativer Stress (durch Umwelt-Faktoren) oder durch eine Herpesvirus-Infektion eine Lungenfibrose entwickelt. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von ER-Stress, der Induktion vom CHOP durch die proapoptotische UPR, der Rolle von Herpesviren in der Pathogenese von IPF, wurden die doppelt transgenen Mäuse (mit 28-tägiger Transgen-Expression) mit dem murinen  $\gamma$ -Herpesvirus-68 (MHV68) infiziert und am Tag 15 d.p.i (also mit 43-tägiger Transgen-Expression) getötet und Lungen asserviert. In dieser Arbeit wurden ER-Stress Marker (Chop, Xbp1s, Grp78, Grp94, Trb3, Atf3 und Dr5), profibrotische Marker (Mmp2, Pai-1, Smad3, Ap-1/Jun, Vimentin, Ctgf, Tgf- $\beta$ , Stat-3 und Cyclin D1), Apoptose Marker (gespaltene Kaspase 3, gespaltene Kaspase 9 und gespaltene Parp-1), inflammatorische und Makrophagen Marker (Ccl2, Interferon- $\gamma$ , Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-13 CD206 und Arginase-1) und epithelassozierten Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) auf Proteinebene mit Immunoblots, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz und auf mRNA-Ebene mit qPCR (RT-PCR) untersucht. Zur Quantifizierung des fibrotischen Umbaus in der Histologie wurde eine morphometrische Analyse durch ein bildanalytisches Verfahren (SeMeLuG Modul der Axiovision Software) durchgeführt.

---

Eine MHV68-Infektion förderte die ausgeprägte Entwicklung einer Lungenfibrose bei den transgenen Mäusen, die Chop exprimierten, vermutlich durch eine Erhöhung der AECII-Apoptose und eine Verstärkung vorhandener profibrotischer Reaktionen (einschließlich einer erhöhten Makrophagenrekrutierung), wohingegen zeigten infizierte Mäuse ohne Chopüberexpression in AECII eine akute Pneumonitis mit mäßiger Entzündung, aber keine Lungenfibrose. Die letzte Beobachtung steht im Einklang mit verschiedenen früheren Studien, in denen berichtet wurde, dass MHV68 allein nicht ausreicht, um bei nicht betroffenen, „normalen“ oder Wildtyp-Mäusen eine Lungenfibrose auszulösen (Mora et al., 2005). Allerdings führte die Instillation von MHV68 in die Lungen gealterter Wildtyp-Mäuse (>16 Monate) bei 15 d.p.i. zur Induktion einer viral induzierten Lungenfibrose, die mit erhöhtem ER-Stress und Apoptose im AECII sowie einer erhöhten Neigung zur TGF- $\beta$ -Produktion im Vergleich zu jungen Mäusen (3 Monate) (Torres-González et al., 2012) einherging.

In dieser Arbeit schien die virale Genomlast in der Lunge von MHV68-infizierten Chop-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chop erhöht zu sein, was darauf hindeutet, dass transgene Mäuse, die Chop in AECII überexprimieren, eine beeinträchtigte Kontrolle von Virusinfektionen aufweisen. Es wurde gezeigt, dass der ER-Stress die lytische Replikation des Gammaherpesvirus reguliert, da die Induktion vom ER-Stress durch Thapsigargin eine EBV-Reaktivierung und eine lytische Replikation in lymphoblastoiden Zelllinien verursachte, die in Gegenwart des ER-Stress-Inhibitors Salubrinal aufgehoben wurde (Taylor et al., 2011). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die ektopische Chop-Expression *in vitro* die durch den B-Zell-Rezeptor (BCR) vermittelte lytische Reaktivierung von MHV68 in transformierten Lymphom-SL-1-Zellen fördert (Zhou et al., 2018). Zusammen mit unserer Beobachtung deuten diese Daten darauf hin, dass die Chop-Induktion im Allgemeinen die lytische/chronische Herpesvirus-Infektion verschlimmert, was vermutlich der Grund für die erhöhte AECII-Apoptose und die Entwicklung von Lungenfibrose bei 15 d.p.i. in MHV68-infizierten transgenen Mäusen, die AECII-Chop exprimieren, war. Interessanterweise verursachte die MHV68-Infektion in Dox- Mäusen keine „endogene“ Chop-Induktion in den AECII dieser Mäuse. Das war überraschend, da bei einer MHV68-Infektion im Allgemeinen ein signifikanter Anstieg der pulmonalen ER-Stressreaktionen beobachtet wurde. Interessanterweise zeigten die AM beider MHV68-infizierten Mäusegruppen eine zytoplasmatische Induktion von Chop, die in den fibrotischen Lungen infizierter Mäuse

---

mit AECII-Chop-Überexpression intensiver zu sein schien. In ähnlicher Weise war die robuste MHV68-induzierte Xbp-1-Expression insbesondere auf die AM beider infizierten Mäusegruppen beschränkt, aber nicht infizierte Dox<sup>+</sup> Mäuse zeigten auch eine Xbp-1-Induktion in ihren AM im Vergleich zu naiven Mäusen ohne Chopexpression in AECII, wohingegen Chop nie in AM der nicht infizierten Mausgruppen gefunden wurde. Die ER-Chaperone Grp78 und Grp94 wurden in den AM nach einer MHV68-Infektion ebenfalls stark überexprimiert, aber AECII beider infizierten Mausgruppen zeigten ebenfalls eine Hochregulierung von Grp78/Grp94. Dies legt nahe, dass diese Chaperone in AECII durch einen virusinduzierten, Ire-1/Xbp-1-unabhängigen Mechanismus aktiviert wurden.

Neben einer erhöhten ER-Stressmarker-Expression zeigten die AM beider infizierten Mausgruppen auch eine Apoptose-Induktion, vermutlich aufgrund einer lytischen Infektion während der akuten Phase. Wichtig ist, dass eine MHV68-Infektion (im Allgemeinen) mit einer erhöhten Makrophagenrekrutierung verbunden war, die bei Dox<sup>+</sup>/MHV68 Mäusen erhöht war, vermutlich durch eine erhöhte Produktion von Ccl2 in den verletzten AECII, das Makrophagen an die Entzündungsstelle lockt und dadurch mehrere Angriffspunkte für Virusinfektionen schafft. Tatsächlich zeigen unsere Daten, dass gleichzeitig mit der erhöhten Makrophagenkumulation die Ccl2-Expression in den Lungen von MHV68-infizierten Chop-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chopexpression (und nicht infizierten Kontrollen), aber auch in den Lungen von nicht infizierten Mäusen mit alleiniger Chopüberexpression im Vergleich zu den unbehandelten Dox<sup>-</sup> Mäusen hochreguliert war, was darauf hindeutet, dass „Chop-Mäuse“ aufgrund der vulnerablen AECII eine erhöhte Anfälligkeit für die Rekrutierung von Makrophagen in ihrer Lunge zeigten. Eine erhöhte Ccl-2 Expression wurde in den Lungen von Patienten mit IPF beobachtet (Suga et al., 1999).

Bei Gewebeschädigung werden sogenannte DAMPs (damage-associated molecular patterns) von den geschädigten und verstorbenen Zellen freigesetzt, diese Moleküle lösen wiederum eine entzündliche Reaktion aus (Zhang et al., 2010). Diese Reaktion beinhaltet die Rekrutierung und Aktivierung von verschiedenen Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen und Fibroblasten, die zusammen die Gewebereparatur organisieren (Wynn, 2008). Wenn der Heilungsprozess gut organisiert wird, wird die entzündliche Reaktion schnell beendet und die normale Gewebearchitektur wiederhergestellt. Wenn die Wundheilung allerdings chronifiziert oder dysreguliert verläuft, kann sich eine Fibrose

---

bzw. Vernarbung mit Funktionsverlust und evtl. Versagen des jeweiligen Organs entwickeln (Wynn and Ramalingam, 2012). Obwohl dieser Reparaturprozess durch mehrere Zellen reguliert wird, scheinen Makrophagen eine kritische regulatorische Aktivität auf allen Stadien der Wundheilung und Fibrose zu haben (Wynn and Barron, 2010). In vielen Publikationen wird über die Rolle von Makrophagen in der Pathogenese der IPF diskutiert. Makrophagen werden in pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Makrophagen unterschieden. Polarisierter Makrophagen verändern ihren Phänotyp entsprechend des lokalen Zytokin-Milieus (Dang et al., 2014). M1 Makrophagen produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-12 $\beta$ , IL-23, und TNF $\alpha$ . und führen zur Gewebeverletzung. Umgekehrt werden M2 Makrophagen durch Mediatoren wie IL-4, IL-13, TGF- $\beta$ , and IL-10 induziert und sind an den Gewebereparaturprozessen und auch an der aberranten Wundheilung während der Fibrose beteiligt (Byrne et al., 2016; Cheng et al., 2021). Aus der Literatur ist es schon bekannt, dass M2 Makrophagen bei der Entwicklung von Lungenfibrose beteiligt sind. Wenn aktiviert, produzieren sie profibrotische Faktoren wie TGF- $\beta$  und PDGF, die die Aktivierung von Fibroblasten, die Proliferation und Differenzierung von Myofibroblasten sowie die Kollagensynthese induzieren (Song et al., 2000; Hou et al., 2018; Zhang et al., 2018). Lungen von IPF Patienten sind während der Progression deren Erkrankung überwiegend vom M2 Makrophagen infiltriert (Ji et al., 2014), In einigen tierexperimentellen Studien wird vorgeschlagen, die M2 Makrophagen als Grundstein der zielgerichteten Therapie der IPF zu betrachten (Murray et al., 2010; Tao et al., 2014). Die Aktivität von diesen Zellen wird durch den ER-Stress moduliert (Oh et al., 2012). Wichtig ist, dass in unserer Studie ein gewisser Anteil größere und/oder schaumige AM offenbar nicht von viral induzierter Apoptose betroffen zu sein schien, insbesondere in den Lungen von MHV68-infizierten Mäusen, die AECII-Chop exprimierten. Dies deutet daraufhin, dass bei diesen AM eine latente Infektion vorliegt. Die Anzahl größerer und/oder schaumigerer AM war bei diesen infizierten „Chop-Mäusen“ im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chopexpression im Allgemeinen erhöht und es wurde festgestellt, dass sie den alternativen profibrotischen M2-Phänotyp aufweisen. Yao und Mitarbeiter beobachteten in fibrotischen Lungen von mit Bleomycin behandelten Mäusen eine erhöhte Expression von Grp78, Atf4 und Chop in CD206-exprimierenden M2-Makrophagen und beschrieben Chop als das Schlüsselprotein, das an der Differenzierung von M2-Makrophagen beteiligt ist (Yao et al., 2016). Darüber hinaus bewirkte die direkte

---

*In-vitro*-Infektion primärer Makrophagen mit dem Herpesvirus KSHV deren Polarisation in M2/tumorassoziierte Makrophagen (TAM), was stark mit der STAT3-Phosphorylierung und der robusten ER-Stressinduktion verbunden war. Letzters war erkennbar an der Aktivierung von IRE-1/XBP-1-Arm und der PRKR-ähnlichen endoplasmatischen Retikulumkinase (PERK)/ATF4-Zweig in Korrelation mit der Hochregulierung der Effektoren GRP78 bzw. CHOP (Gilardini Montani et al., 2020). Interessanterweise wurde auch beobachtet, dass die Aktivierung von IRE-1/XBP-1 durch KSHV die Sekretion von entzündungshemmenden (IL-10) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-8) förderte, während die Aktivierung von PERK/ATF4 nur an der IL-6-Produktion in M2/TAM-polarisierten Makrophagen beteiligt war (Gilardini Montani et al., 2020).

In dieser Arbeit war ER-Stress im Allgemeinen in verschiedenen AM-Populationen von MHV68-infizierten Mäuselungen ausgeprägt und Mäuse mit induzierter Chopüberexpression in AECII, die mit MHV68 infiziert waren, zeigten viel mehr M2-Makrophagen (mit ER-Stress) als infizierte Mäuse ohne Chopexpression, was durch die erhöhte Viruslast in den Lungen der infizierten chopexprimierenden Mäuse erklärt werden konnte. Darüber hinaus beobachteten wir auch eine signifikant erhöhte STAT-3-Aktivierung und IL-6-Produktion in der Lunge von MHV68-infizierten, Dox+ Mäuse im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chopexpression, was auch die erhöhte M2-Makrophagen-Aktivierung in dieser Gruppe erklären könnte. Obwohl IL-6 häufig mit entzündungsfördernden Funktionen in Verbindung gebracht wird, wurde gezeigt, dass IL-6 auch die Differenzierung von M2-Makrophagen und die Fähigkeit zur Wundheilung bei verschiedenen Pathologien induziert (Braune et al., 2017). In unserer Arbeit über MHV68-infizierte transgene Chop-Mäuse legen wir nahe, dass das von AECII produzierte IL-6 zusätzlich zum „Makrophagen-ER-Stress“ zur M2-Polarisierung von AM beigetragen haben könnte, da die nicht infizierten Chop-Mäuse unter 43-tägiger Doxycyclin-Behandlung auch eine erhöhte STAT-3-Aktivierung und IL-6-Expression zeigten im Vergleich zu Dox- Mäusen, die mit Standardfutter gefüttert wurden.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die anhaltende Replikation von MHV68 während der chronischen Phase der Infektion bei Wildtyp-Mäusen, beispielsweise infizierten C57Bl/6J-Mäusen, sehr gering ist und diese im Allgemeinen keine langfristigen pathologischen Auswirkungen aufgrund von MHV68 zeigen (Weinberg et al., 2004). Im



---

Gegensatz dazu zeigten Th2-abhängige IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Knockout-Mäuse [*Ifngr1*<sup>(-/-)</sup>], die mit MHV68 infiziert waren, eine anhaltende Replikation während der chronischen Phase der Infektion und die Tiere entwickelten eine fortschreitende Lungenfibrose (Mora et al., 2005). In unserer Studie zeigten MHV68-infizierte Dox+ Mäuse auch die Entwicklung einer schweren Lungenfibrose und eine erhöhte virale Genomlast in der Lunge bei 15 d.p.i. Das deutet darauf hin, dass erhöhte Expression von Chop in AECII möglicherweise in der Lage ist, die lytische und chronische MHV68-Infektion bei diesen transgenen Mäusen zu verschlimmern. Dabei kann es gelegentlich auch zu einer lytischen Reaktivierung latent infizierter Lungenzellen kommen. Da eine starke Hochregulierung der *Ifng*-Expression in den Lungen beider MHV68-infizierter Mäusegruppen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen beobachtet wurde, mit einer klaren Tendenz zur Hochregulierung der *Ifng*-Transkripte in den Lungen infizierter Dox+ Mäuse im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chop-Transgen-Induktion, erscheint es klar, dass, die bei MHV68-infizierten, AECII-Chop-exprimierenden Mäusen beobachtete Lungenfibrose nicht mit beeinträchtigten Immunantworten vom Th1-Typ zusammenhängt. Stattdessen war die Entstehung einer Lungenfibrose bei diesen Mäusen vermutlich auf eine verschlimmerte MHV68-Infektion, einen erhöhten AECII-Schaden und ein profibrotisches Lungenmilieu zurückzuführen. Alle diese könnte durch eine erhöhte Alveolar-Chopexpression bedingt sein, was zu einer erhöhten Makrophagenaktivierung, M2-Makrophagen-Differenzierung und einer starken Fibroblastenproliferation führte. Übereinstimmend war die Expression von profibrotischem Mmp-2, Tgf- $\beta$ , Arginase-1 und insbesondere Pai-1 bei MHV68-infizierten, Dox+ Mäusen im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chopexpression in AECII signifikant erhöht, wobei die Lokalisierung im kumulierenden AM vorherrschte. Die Immunhistochemie für CD206 und Arginase-1 ergab, dass die kumulierenden AM von MHV68-infizierten chopexprimierenden Mäusen neben der ER-Stressmarker-Expression auch eine Polarisation zum M2-Phänotyp anzeigte, die auch jedoch in viel geringerem Ausmaß bei infizierten Mäusen ohne Chop-Transgen-Induktion vorhanden war. Andererseits beobachteten wir auch, dass MHV68-infizierte Mäuselungen eine erhöhte Expression der Th1-Zytokine *Ifng*, *Ccl2* und *Tnfa* zeigten, parallel zur Hochregulierung des pleiotropen *Il6*, des M2-Makrophagenmarkers *Arg1* und des Th2-Zytokins *Il13* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein gemischter M1- und M2-Phänotyp von AM in MHV68-infizierten Lungen

---

vorliegt. Interessanterweise wurde zuvor über den gemischten klassischen und alternativen Aktivierungsphänotyp von AM in der Lunge von MHV68-infizierten, syngenetisch Knochenmarkstransplantierten C57Bl/6-Mäusen berichtet, die am Tag 21 nach der Gammaherpesvirus-Infektion im Vergleich zu nicht transplantierten Mäusen eine schwere Pneumonitis und Fibrose aufwiesen (Coomes et al., 2011). Darüber hinaus wurde auch bei Wildtyp-Mäusen gezeigt, dass eine latente MHV68 Infektion in der Lage ist, fibrotische Reaktionen in Gegenwart einer starken antiviralen IFN- $\gamma$ -Reaktion zu verstärken (Stoolman et al., 2010).

Wichtig ist, dass die gemischte Th1- und Th2-Signatur in der Lunge von MHV68-infizierten Dox + Mäusen im Vergleich zu infizierten Mäusen ohne Chopexpression zusammen mit Arginase-1, CD206 und gleichzeitig mit der erhöhten Makrophagenakkumulation hochreguliert war. Zusammen mit dem Vorhandensein von Tgf- $\beta$  und Mmp-2 exprimierenden AM, bestätigt dies das profibrotische Milieu und die erhöhte Anfälligkeit für MHV68-induzierte Lungenfibrose bei diesen transgenen Mäusen mit einer Chop-Überexpression in den AECII.

Anschließend wenden wir uns den antifibrotischen Reaktionen zu. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (englisch *hepatocyte growth/scatter factor*, HGF) ist ein parakriner Wachstumsfaktor für Epithel- und Endothelzellen, der wird von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Neutrophilen produziert und reguliert die Entwicklung und Morphogenese vom Epithelgewebe in verschiedenen Organen (Fujita et al., 1996; Crestani et al., 2012). Nach *tissue injury* wird HGF reaktiv in verschiedenen Geweben u.a in der Lunge produziert und unterstützt die Regeneration der Lunge (Yanagita et al., 1993; Stern et al., 2000). Außerdem exprimieren die AECII den HGF-Rezeptor Met sowie unter normalen Bedingungen als auch nach Schädigung des Alveolarepithels (Crestani et al., 2002). HGF induziert die Proliferation von AECII und fördert dadurch den Heilungsprozess des Alveolarepithels nach einer Gewebeschädigung (Jaffré et al., 2002). Für uns erscheint es interessant, HGF zu untersuchen, da es antifibrotisch wirkt. HGF entfaltet seine antifibrotische Wirkung durch die Induktion der Apoptose von Myofibroblasten und Hemmung der TGF  $\beta$  abhängigen Aktivierung und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, HGF hemmt auch die Apoptose von Endothel- und Epithelzellen (Crestani et al., 2012).

---

Wir haben die Hgf Expression mittels Immunoblots getestet, dabei wurde eine signifikante Induktion von Hgf in den Gruppen (Dox+/MHV68 und Dox-/MHV68) vs. (Dox+ und Dox-) festgestellt. Interessanterweise ist die Expression von Hgf in der Gruppe (Dox+/MH68) schwächer als die Gruppe (Dox-/MHV68). Passend zur relativ verminderten Expression von Hgf in der Gruppe Dox+/MHV68 wurde eine vermehrte Lungenfibrose in dieser Gruppe beobachtet, die auf biochemischer Ebene mit einer Hochregulation von profibrotischen Markern einhergeht. Es kann daher vermutet werden, dass die verminderte Expression des antifibrotisch wirkenden HGF die Entstehung der Fibrose begünstigt hat. In einer Publikation wurde *in vitro* die HGF Produktion in Fibroblasten von IPF Patienten mit einer Kontrollgruppe verglichen, es zeigte sich eine Reduktion um ca. 50% der basalen HGF Produktion in den Fibroblasten der IPF Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Marchand-Adam et al., 2003). Eine niedrige Kapazität oder ein Defekt der pro-HGF Aktivierung in den Fibroblasten kann laut einer Publikation der Grund für die Reduktion der pro-HGF Aktivierung in IPF Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auf der anderen Seite war die Expression von *HGF activator* spezifischen Inhibitoren (HAI-1 und HAI-2) in IPF Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe höher. TGF  $\beta$  reduzierte durch eine Senkung der HGF Activator Expression und die Induktion der Expression von dessen Inhibitoren ebenfalls die Fähigkeit der Lungenfibroblasten, pro-HGF zu aktivieren, (Marchand-Adam et al., 2006).

Lungenfibrose ist mit einer Hemmung der Aktivität von Plasminogenaktivatoren assoziiert (Horowitz et al., 2019). Die Zunahme der Expression von PAI-1 auf Kosten der endogenen Plasminogenaktivatoren wie Urokinase trägt zu dieser Hemmung in Mausmodellen bei (Sisson and Simon, 2007). Das Ungleichgewicht zwischen PAI-1 und den Plasminogenaktivatoren hat manchen Studien zufolge eine kausale Rolle in der Entwicklung von Lungenfibrose. Urokinase oder Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator, kurz uPA, ist ein Enzym, welches eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse spielt. In einer tierexperimentellen Studie schützte uPA vor Lungenfibrose und reduzierte die parenchymale Steifigkeit der Lunge, außerdem verringert uPA die Fibrose in Mäusen mit einem bereits stattgehabten fibrotischen Umbau durch eine Zunahme der Apoptose von Myofibroblasten und verbesserte die Homöostase der Alveolarepithelzellen (Horowitz et al., 2019). Die Gabe von uPA supprimierte fast vollständig die fibroproliferative Reaktion der Lunge von Bleomycin behandelten Kaninchen (Günther et al., 2003). Wir haben daher dieses antifibrotische Enzym uPA untersucht. In der Immunoblot-Analyse war

---

Urokinase deutlich höher in Dox+/MHV68 und Dox-/MHV68 vs. Dox+ und Dox-exprimiert. Die Expression fiel in Dox+/MHV68 geringer aus als in Dox-/MHV68. Passend dazu konnte in einer publizierten Studie gezeigt werden, dass AECII von Patienten mit IPF und Mäusen mit Bleomycin induziertem Lungenfibrose eine gesteigerte Expression von PAI-1 und reduzierte Expression vom uPA aufweisen (Marudamuthu et al., 2015). In unserer Arbeit haben wir ähnliches beobachten können, Pai-1 war auf der in Dox+/MHV68 am stärksten, uPA in Dox+/MHV68 geringer exprimiert als in Dox-/MHV68. Dieses Ungleichgewicht zwischen PAI-1 und uPA hat laut der Literatur eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Fibrose, die wir in der Gruppe Dox+/MHV68 histologisch nachweisen konnten.

Zusammenfassend belegen diese Befunde, dass eine gezielte Chopüberexpression in AECII zu einer beeinträchtigten Kontrolle der chronischen MHV68-Infektion und zu einer verstärkten M2-Makrophagen-Aktivierung in der Lunge transgener Mäuse führte, was schließlich zur Entwicklung einer Lungenfibrose führt. Wir kommen zu dem Schluss, dass die „Chop-Maus“, ähnlich wie beim menschlichen IPF, ein Individuum mit einem suszeptibelen und vorgeschädigten Alveolarepithel und einer profibrotischen Mikroumgebung darstellt, das als Reaktion auf einen zweiten Stimulus dazu neigt, eine Lungenfibrose zu entwickeln.

---

## Zusammenfassung

Die idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) ist die häufigste und prognostisch gravierendste Erkrankung der interstitiellen Lungenerkrankungen und eine Erkrankung des hohen Alters mit tödlichem Ausgang. Die Ursachen und Pathomechanismus der IPF sind noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand intensiver Forschung. Aktuell geht man von einer chronischen Schädigung der alveolären Typ II Zellen (AECII) mit einer fehlgesteuerten Wundheilungsreaktion aus, die durch eine überschießende Apoptose der AECII initiiert wird. Ergebnisse aus mehreren Studien zeigten, dass der pro-apoptotischer ER-Stress für das Absterben der AECII verantwortlich ist.

Der ER-Stress wird hauptsächlich durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen verursacht, als Reaktion versucht die Zellen diesen ER-Stress durch die „Ungefaltete Protein Antwort“ (unfolded protein response, UPR) bestehend aus genereller translationaler Attenuation (allgemein reduzierte Produktion von Proteinen), Induktion von ER-Chaperonen (Helfermoleküle zur korrekten Faltung von Proteinen) und Aktivierung der Proteindegradationsmaschinerie, zu überwinden. Wird der ER-Stress dadurch nicht beseitigt, entwickelt sich eine maladaptive und apoptotische UPR, was zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges, u.a durch die Induktion des pro-apoptotischem CHOP-Gens, führt.

In unserer klinischen Forschergruppe der Lungenfibrose wurde ein transgenes Maus-Modell mit konditionaler Chop-Überexpression in den AECII entwickelt. Die *Chop*-Gen Induktion in diesen doppelt transgenen Mäusen erfolgt durch das "*Tetracycline-On-system*" (SP-C rtTA/tetO7-Chop). Nachdem die transgenen Mäuse 28 Tage lang mit Doxycyclin gefüttert wurden, könnte *in vivo* eine Chop-Überexpression und eine Induktion der Kaspase-3 Spaltung beobachtet werden, zusätzlich wurde auch eine Hochregulation anderer pro-apoptotischen und pro-fibrotischen Effektormoleküle festgestellt. Dennoch entwickelten die Mäuse nach 1 Monat keine Lungenfibrose.

Wir vermuten daher, dass die Intensität der Apoptose in den AECII durch die konditionale Chop-Überexpression allein nicht ausreicht, um die Fibrosierung der Lunge auszulösen und dass ein "second hit" notwendig ist. Mehrere Studien zeigten, dass eine Herpesvirusinfektion eine Rolle in dem Pathomechanismus der Lungenfibrose spielen

---

könnte, weil Hüllproteinen und Viruspartikeln von verschiedenen Herpesviren in den AECII von IPF-Patienten festgestellt wurden.

Es wurden daher die transgene-Chop Mäuse am Tag 28 mit oder ohne Transgen-Induktion mit dem murinen  $\gamma$ -Herpesvirus-68 (MHV68) infiziert und am Tag 15 d.p.i getötet. Die Lungen dieser Tiere wurden dann auf ER-Stress Marker, profibrotische Marker, Apoptose Marker, inflammatorische, Makrophagen Marker und epithelassoziierte Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) auf Proteinebene mit Immunoblots, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz und auf mRNA-Ebene mit qPCR (RT-PCR) hin untersucht. Unter diesen Bedingungen wurde nur in den Lungen der Dox+/MHV68 Mäuse eine Fibrose beobachtet, in den infizierten Dox- Mäusen sowie in den nicht infizierten Dox+ und Dox- Gruppen konnte keine Fibrose dokumentiert werden. Nach unseren Analysen war die Entwicklung einer Lungenfibrose bei diesen Mäusen vermutlich auf eine Verstärkung der MHV68-Infektion, einen vermehrten AECII-Schaden und eine profibrotische Lungenumgebung durch die Chopüberexpression in den AECII zurückzuführen. Dies führte zudem zu einer erhöhten Makrophagenaktivierung, M2-Makrophagendifferenzierung und einer starken Fibroblastenproliferation.

Unsere Daten belegen, dass eine gezielte AECII-Schädigung durch ektopische Chop-Expression eine chronische MHV68-Infektion bei transgenen Mäusen förderte und die Lunge zudem anfälliger für die Aktivierung von M2-Makrophagen machte, was schließlich zu einer Lungenfibrose führte. Wir schlussfolgern, dass die transgene Maus mit AECII-spezifischer, konditionaler Überexpression von Chop ein Individuum mit genetischer Suszeptibilität zur Entwicklung einer Lungenfibrose darstellt, welches durch "second hits" wie z. B. oxidativer Stress (durch Umwelt-Faktoren) oder durch eine Herpesvirus-Infektion eine Lungenfibrose entwickelt.

---

## **Summary**

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most common and the most important disease of the Interstitial Lung Diseases (ILD), it's an age-related disease with a fatal outcome. One of the main causes of IPF is a chronic damage of the alveolar epithelium, which can lead to an apoptosis of the alveolar type II cells and consequently to an abnormal healing process which ends with a fibrotic remodeling of the lung. According to many studies it has been observed that the pro-apoptotic ER-stress is responsible for the death of the alveolar type II cells.

The ER-stress is caused mainly by the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum, in response to this the cell tries to overcome this through the unfolded protein response (UPR), to restore the normal function of the cell the UPR is composed of three molecular mechanisms, which are: (1) stopping the protein translation. (2) degrading the misfolded proteins. (3) increasing the production of the chaperones involved in protein folding. In conditions of prolonged stress, the UPR turns into a maladaptive pathway that promotes the death of the cell by apoptosis through the mitochondrial pathway by the upregulation of pro-apoptotic factors such as CHOP.

In the clinical research group of the pulmonary lung fibrosis of the University of Giessen we developed a double transgenic mouse with an overexpression of the pro-apoptotic ER-stress factor Chop exclusively in the AECII by using the Tetracycline-On-system (SP-C rtTA/tetO7-Chop). In response to doxycycline-feeding (28 days), a nuclear chop-overexpression in AECII was observed, which led to an increased apoptosis of these cells, but not in the development of lung fibrosis in the chop-mice, although significant upregulation of profibrotic markers was observed. We therefore assumed, that the extent of apoptosis in the AECII only through the transgenic induction and the chop-overexpression was not sufficient to develop lung fibrosis, and that "second hits" such as aging, herpes virus infection and reactive oxygen species exposure may be required to cause high levels of apoptosis on AECII and to develop a "full-blow" lung fibrosis. Indeed, several studies have suggested that herpesviruses may play a role in IPF-pathogenesis, because DNA and envelope-proteins of various herpesviruses have been detected in AECII of IPF-patients, and co-localized with markers of ER-stress.

---

After 28 days of transgenic induction with doxycycline we infected the Chop-mice with murine gamma-herpesvirus-68 (MHV68) and harvested the lungs 15 days post infection (d.p.i.). The lungs of these animals were then examined for ER stress markers, profibrotic markers, apoptosis markers, inflammatory markers, macrophage markers and epithelial-associated proteins (SP-A, SP-B, SP-C, and SP-D) using immunoblots, immunohistochemistry, immunofluorescence and qPCR (RT-PCR). Under these conditions, fibrosis was only observed in the lungs of Dox+/MHV68 mice, whereas no fibrosis was documented in the infected Dox- mice or in the non-infected Dox+ and Dox- groups. According to our analysis, the development of pulmonary fibrosis in these mice was likely due to an enhanced MHV68 infection, increased AECII damage and a profibrotic lung environment caused by the Chop overexpression in AECII cells. This also led to increased macrophage activation, M2 macrophage differentiation and robust fibroblast proliferation.

Our data support that targeted AECII injury by ectopic Chop expression promoted chronic MHV68 infection in transgenic mice and also rendered the lung to increased susceptibility to M2 macrophage activation, ending up in lung fibrosis. We conclude that the transgenic mouse with AECII-specific, conditional overexpression of Chop represents an individual with genetic susceptibility to the development of pulmonary fibrosis, which can be triggered by “second hits” such as oxidative stress (due to environmental factors) or a herpesvirus infection.



---

## Abzürungsverzeichnis

AECII	Alveoläre epitheliale Typ-II Zelle
AM	Alveolarmakrophagen
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Activator protein 1
ATF3	Activating transcription Factor 3
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
BiP/GRP78	Binding immunoglobulin Protein / 78 kDa glucose-regulated protein
BLM	Bleomycin
BSA	Bovine serum albumin
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CTGF	Connective tissue growth factor
DKC1	Dyskerin Pseudouridine Synthase 1
Dox	Doxycyclin
Dr5	Death receptor 5
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated degradation system
ERO1 $\alpha$	ER Oxidoreductin-1 $\alpha$

---

EZM	Extrazelluläre Matrix
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GRP94	94 kDa glucose-regulated protein
HGF	Hepatocyte growth factor
HRCT	High resolution computer tomography
HRP	Horse Radish Peroxidase
Ifng	Interferon- $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
ILD	Interstitial Lung Diseases
IP3R1	Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type 1
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
IRE1 $\alpha$	Inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHV68	Murines $\gamma$ -Herpesvirus-68
MMP	Matrix Metalloproteinase
NAF1	Nuclear Assembly Factor 1 Ribonucleoprotein
PAI1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1
PARN	Poly(A)-specific ribonuclease
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor

---

PERK	Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Smad3	Small Mothers Against Decapentaplegic
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TBS/T	Tris gepufferte Salzlösung
TCAB1	Telomerase Cajal body protein 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TERC	Telomerase RNA Komponente
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TINF2	TERF1 Interacting Nuclear Factor 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Trb3	Tribbles homolog 3
UIP	Usual interstitial pneumonia
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
UPR	Unfolded protein response
XBP1	X box binding protein 1

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Kreuzungsschema zur Generierung von doppelt-transgenen Chop Mäusen.	S18
Abb. 3.2: Aufbau der Tierversuche.	S19
Abb. 3.3: Erläuterung der bildmorphometrischen Analyse eines histologischen Schnittes.	S25
Abb. 4.1: Messung der Viruslast durch quantitative Real-Time-PCR.	S37
Abb. 4.2: Masson-Goldner-Trichromfärbung in seriellen Paraffin-eingebetteten Murinen Lungenschnitten.	S38
Abb. 4.3: Mittlere Septendicke.	S38
Abb. 4.4: Immunhistochemie mit morphologischer Quantifizierung von proSP-C und Vimentin.	S39
Abb. 4.5: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von Surfactantproteinen.	S41
Abb. 4.6: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von Chop.	S42
Abb. 4.7: Immunhistochemie von proSP-C und Chop in den murinen Lungengeweben.	S43
Abb. 4.8: Immunhistochemie von Chop in den virusinfizierten Gruppen.	S44
Abb. 4.9: Expression und Lokalisation von CD206, Vimentin und Arginase in den murinen Lungengeweben.	S44
Abb. 4.10: Immunhistochemie von CD206 und Chop in den murinen Lungengeweben.	S45
Abb. 4.11: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von den ER-Stress Markern Xbp1(s), Grp78, Grp94.	S46
Abb. 4.12: Immunhistochemie von Tff-1 und Xbp-1 in den murinen Lungengeweben.	S47
Abb. 4.13: Immunhistochemie von proSP-C und Grp78 in den murinen Lungengeweben.	S48

---

Abb. 4.14: Immunhistochemie von proSP-C und Grp94 in den murinen Lungengeweben.	S49
Abb. 4.15: Immunhistochemie von F4/80, Grp78 und Grp94 in den virusinfizierten Gruppen.	S50
Abb. 4.16: Genexpressionsanalyse von schwerem ER-Stress Markern Atf3, Trb3 und Dr5.	S50
Abb. 4.17: Immunoblot-Analyse der Expression von <i>cleaved</i> Caspase 3, Caspase 9 und Parp-1.	S51
Abb. 4.18: Immunfluoreszenzfärbung für proSP-C den apoptotischen Marke gespaltene Caspase 3 in murinen Lungengeweben.	S52
Abb. 4.19: Immunfluoreszenzfärbung für Vimentin den apoptotischen Marker gespaltene Caspase 3 in murinen Lungengeweben.	S53
Abb. 4.20: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von pro-fibrotischen und proinflammatorischen Faktoren.	S55
Abb. 4.21: Immunhistochemie von Mmp2 und Tgf- $\beta$ in den murinen Lungengeweben.	S56
Abb. 4.22: Proteinexpressionsanalyse von antifibrotischen Faktoren (Mmp-7, u-PA und Hgf).	S57
Abb. 4.23: Gen- und Proteinexpressionsanalyse von Th1 und Th2 Markers sowie von M2 Makropagenmarkern.	S59
Abb. 4.24: Immunhistochemie mit morphologischer Quantifizierung von IL-6 und CD206.	S60
Abb. 4.25: Immunhistochemie mit morphologischer Quantifizierung von Arginase-1.	S60

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: eingesetzte Primärantikörper für die Immunhistochemie und ihre Verdünnungen.	S13
Tabelle 3.2: eingesetzte Primärantikörper für die Immunoblotanalyse und ihre Verdünnungen.	S13
Tabelle 3.3: eingesetzte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse und Immunoblotanalyse.	S14
Tabelle 3.4: Primer und Sonden für die virale gB-DNA-Analyse, die in Taqman qPCR verwendet werden.	S15
Tabelle 3.5: Primer für die quantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR.	S15
Tabelle 3.6: Detaillierte Darstellung des Aufbaus der tierexperimentellen Untersuchungen.	S19
Tabelle 3.7: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel der SDS-PAGE.	S28

---

## Literaturverzeichnis

- Ankermann, T., Claviez, A., Wagner, H.-J., Krams, M., and Riedel, F. (2003). Chronic interstitial lung disease with lung fibrosis in a girl: uncommon sequelae of Epstein-Barr virus infection. *Pediatric pulmonology* 35, 234-238. <https://doi.org/10.1002/ppul.10244>.
- Armanios, M.Y., Chen, J.J.-L., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R.G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., and Phillips, J.A., et al. (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 356, 1317-1326. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066157>.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H.R.H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics* 5, 209-219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2, 326-332. <https://doi.org/10.1038/35014014>.
- Bouros, E., Filidou, E., Arvanitidis, K., Mikroulis, D., Steiropoulos, P., Bamias, G., Bouros, D., and Kolios, G. (2017). Lung fibrosis-associated soluble mediators and bronchoalveolar lavage from idiopathic pulmonary fibrosis patients promote the expression of fibrogenic factors in subepithelial lung myofibroblasts. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 46, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2017.08.012>.
- Braune, J., Weyer, U., Hobusch, C., Mauer, J., Brüning, J.C., Bechmann, I., and Gericke, M. (2017). IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol* 198, 2927-2934. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600476>.
- Burman, A., Kropski, J.A., Calvi, C.L., Serezani, A.P., Pascoalino, B.D., Han, W., Sherrill, T., Gleaves, L., Lawson, W.E., and Young, L.R., et al. (2018a). Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein. *JCI insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99543>.
- Burman, A., Tanjore, H., and Blackwell, T.S. (2018b). Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69, 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.015>.
- Byrne, A.J., Maher, T.M., and Lloyd, C.M. (2016). Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends in molecular medicine* 22, 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.004>.
- Cha, S.-I., Ryerson, C.J., Lee, J.S., Kukreja, J., Barry, S.S., Jones, K.D., Elicker, B.M., Kim, D.S., Papa, F.R., and Collard, H.R., et al. (2012). Cleaved cytokeratin-18 is a mechanically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 13, 105. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-105>.

- 
- Cheng, P., Li, S., and Chen, H. (2021). Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/cells10020436>.
- Codd, V., Nelson, C.P., Albrecht, E., Mangino, M., Deelen, J., Buxton, J.L., Hottenga, J.J., Fischer, K., Esko, T., and Surakka, I., et al. (2013). Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nature genetics* 45, 422-7, 427e1-2. <https://doi.org/10.1038/ng.2528>.
- Coomes, S.M., Farmen, S., Wilke, C.A., Laouar, Y., and Moore, B.B. (2011). Severe Gammaherpesvirus-Induced Pneumonitis and Fibrosis in Syngeneic Bone Marrow Transplant Mice Is Related to Effects of Transforming Growth Factor- $\beta$ . *The American journal of pathology* 179, 2382-2396. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.002>.
- Crestani, B., Dehoux, M., Hayem, G., Leçon, V., Hochedez, F., Marchal, J., Jaffré, S., Stern, J.-B., Durand, G., and Valeyre, D., et al. (2002). Differential role of neutrophils and alveolar macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 1015-1022. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000024361.92500.19>.
- Crestani, B., Marchand-Adam, S., Quesnel, C., Plantier, L., Borensztajn, K., Marchal, J., Mailleux, A., Soler, P., and Dehoux, M. (2012). Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 9, 158-163. <https://doi.org/10.1513/pats.201202-018AW>.
- Dang, M.A., Batra, A., Freise, I., Köhl, A., Erben, U., and Siegmund, B. (2014). Polariserte Makrophagen verändern ihren Phänotyp entsprechend des lokalen Zytokin-Milieus. *Z Gastroenterol* 52. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1386043>.
- Fujita, J., Hojo, S., Yamaji, Y., Takahara, J., and Yamadori, I. (1996). Hepatocyte growth factor and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 109, 1413. <https://doi.org/10.1378/chest.109.5.1413>.
- Gangadharan, B., Hoeve, M.A., Allen, J.E., Ebrahimi, B., Rhind, S.M., Dutia, B.M., and Nash, A.A. (2008). Murine gammaherpesvirus-induced fibrosis is associated with the development of alternatively activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 84, 50-58. <https://doi.org/10.1189/jlb.0507270>.
- Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)* 333, 1891-1894. <https://doi.org/10.1126/science.1209126>.
- Garmany, T.H., Moxley, M.A., White, F.V., Dean, M., Hull, W.M., Whitsett, J.A., Noguee, L.M., and Hamvas, A. (2006). Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatric research* 59, 801-805. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000219311.14291.df>.
- Gilardini Montani, M.S., Falcinelli, L., Santarelli, R., Granato, M., Romeo, M.A., Cecere, N., Gonnella, R., D'Orazi, G., Faggioni, A., and Cirone, M. (2020). KSHV infection skews macrophage polarisation towards M2-like/TAM and activates Ire1  $\alpha$ -XBP1 axis



---

up-regulating pro-tumorigenic cytokine release and PD-L1 expression. *British journal of cancer* 123, 298-306. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0872-0>.

Glassberg, M.K. (2019). Overview of idiopathic pulmonary fibrosis, evidence-based guidelines, and recent developments in the treatment landscape. *The American journal of managed care* 25, S195-S203.

Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1408, 79-89. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00060-X).

Guggemoos, S., Hangel, D., Hamm, S., Heit, A., Bauer, S., and Adler, H. (2008). TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J Immunol* 180, 438-443. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.438>.

Günther, A., Lübke, N., Ermert, M., Schermuly, R.T., Weissmann, N., Breithecker, A., Markart, P., Ruppert, C., Quanz, K., and Ermert, L., et al. (2003). Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits. *American journal of respiratory and critical care medicine* 168, 1358-1365. <https://doi.org/10.1164/rccm.2201082>.

Hetz, C., and Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nature reviews. Neurology* 13, 477-491. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.99>.

Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 186, 323-331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>.

Horowitz, J.C., Tschumperlin, D.J., Kim, K.K., Osterholzer, J.J., Subbotina, N., Ajayi, I.O., Teitz-Tennenbaum, S., Virk, A., Dotson, M., and Liu, F., et al. (2019). Urokinase Plasminogen Activator Overexpression Reverses Established Lung Fibrosis. *Thrombosis and haemostasis* 119, 1968-1980. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697953>.

Hou, J., Shi, J., Chen, L., Lv, Z., Chen, X., Cao, H., Xiang, Z., and Han, X. (2018). M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *Cell Commun Signal* 16, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0300-8>.

Huang, W.J., and Tang, X.X. (2021). Virus infection induced pulmonary fibrosis. *Journal of translational medicine* 19, 496. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03159-9>.

Jaffré, S., Dehoux, M., Paugam, C., Grenier, A., Chollet-Martin, S., Stern, J.-B., Mantz, J., Aubier, M., and Crestani, B. (2002). Hepatocyte growth factor is produced by blood and alveolar neutrophils in acute respiratory failure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 282, L310-5. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00121.2001>.

Ji, W.-J., Ma, Y.-Q., Zhou, X., Zhang, Y.-D., Lu, R.-Y., Sun, H.-Y., Guo, Z.-Z., Zhang, Z., Li, Y.-M., and Wei, L.-Q. (2014). Temporal and spatial characterization of

---

mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. *Journal of immunological methods* 403, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.012>.

Kim, I., Xu, W., and Reed, J.C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 7, 1013-1030. <https://doi.org/10.1038/nrd2755>.

Kim, K.K., Dotson, M.R., Agarwal, M., Yang, J., Bradley, P.B., Subbotina, N., Osterholzer, J.J., and Sisson, T.H. (2018). Efferocytosis of apoptotic alveolar epithelial cells is sufficient to initiate lung fibrosis. *Cell death & disease* 9, 1056. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1074-z>.

Kishaba, T. (2019). Evaluation and management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiratory investigation* 57, 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2019.02.003>.

Kishore, U., Greenhough, T.J., Waters, P., Shrive, A.K., Ghai, R., Kamran, M.F., Bernal, A.L., Reid, K.B.M., Madan, T., and Chakraborty, T. (2006). Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular immunology* 43, 1293-1315. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.08.004>.

Kistler, K.D., Nalysnyk, L., Rotella, P., and Esser, D. (2014). Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review of the literature. *BMC pulmonary medicine* 14, 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-139>.

Klymenko, O., Huehn, M., Wilhelm, J., Wasnick, R., Shalashova, I., Ruppert, C., Henneke, I., Hezel, S., Guenther, K., and Mahavadi, P., et al. (2019). Regulation and role of the ER stress transcription factor CHOP in alveolar epithelial type-II cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 97, 973-990. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01787-9>.

Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.-M., and Seeger, W., et al. (2008). Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178, 838-846. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-313OC>.

Kropski, J.A., and Blackwell, T.S. (2018). Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of fibrotic disease. *The Journal of clinical investigation* 128, 64-73. <https://doi.org/10.1172/JCI93560>.

Lawson, W.E., Crossno, P.F., Polosukhin, V.V., Roldan, J., Cheng, D.-S., Lane, K.B., Blackwell, T.R., Xu, C., Markin, C., and Ware, L.B., et al. (2008). Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294, L1119-26. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00382.2007>.

- 
- Li, Y., Gao, J., Wang, G., and Fei, G. (2016). Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental pulmonary fibrosis by activating TGF- $\beta$ 1. *Molecular medicine reports* 14, 1297-1301. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5366>.
- MacNeil, D.E., Bensoussan, H.J., and Autexier, C. (2016). Telomerase Regulation from Beginning to the End. *Genes* 7. <https://doi.org/10.3390/genes7090064>.
- Maitra, M., Wang, Y., Gerard, R.D., Mendelson, C.R., and Garcia, C.K. (2010). Surfactant Protein A2 Mutations Associated with Pulmonary Fibrosis Lead to Protein Instability and Endoplasmic Reticulum Stress\*. *The Journal of biological chemistry* 285, 22103-22113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121467>.
- Malizia, A.P., Keating, D.T., Smith, S.M., Walls, D., Doran, P.P., and Egan, J.J. (2008). Alveolar epithelial cell injury with Epstein-Barr virus upregulates TGFbeta1 expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295, L451-60. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00376.2007>.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- Marchand-Adam, S., Fabre, A., Mailleux, A.A., Marchal, J., Quesnel, C., Kataoka, H., Aubier, M., Dehoux, M., Soler, P., and Crestani, B. (2006). Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174, 58-66. <https://doi.org/10.1164/rccm.200507-1074OC>.
- Marchand-Adam, S., Marchal, J., Cohen, M., Soler, P., Gerard, B., Castier, Y., Lesèche, G., Valeyre, D., Mal, H., and Aubier, M., et al. (2003). Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 168, 1156-1161. <https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1514OC>.
- Martinez, F.J., Collard, H.R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J.J., Taniguchi, H., and Wells, A.U. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature reviews. Disease primers* 3, 17074. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>.
- Marudamuthu, A.S., Bhandary, Y.P., Shetty, S.K., Fu, J., Sathish, V., Prakash, Y.S., and Shetty, S. (2015). Role of the Urokinase-Fibrinolytic System in Epithelial–Mesenchymal Transition during Lung Injury. *The American journal of pathology* 185, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.027>.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 21, 1249-1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>.
- Mora, A.L., Torres-González, E., Rojas, M., Xu, J., Ritzenthaler, J., Speck, S.H., Roman, J., Brigham, K., and Stecenko, A. (2007). Control of virus reactivation arrests pulmonary herpesvirus-induced fibrosis in IFN-gamma receptor-deficient mice.

---

American journal of respiratory and critical care medicine 175, 1139-1150.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1426OC>.

Mora, A.L., Woods, C.R., Garcia, A., Xu, J., Rojas, M., Speck, S.H., Roman, J., Brigham, K.L., and Stecenko, A.A. (2005). Lung infection with gamma-herpesvirus induces progressive pulmonary fibrosis in Th2-biased mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 289, L711-21.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00007.2005>.

Murray, L.A., Rosada, R., Moreira, A.P., Joshi, A., Kramer, M.S., Hesson, D.P., Argentieri, R.L., Mathai, S., Gulati, M., and Herzog, E.L., et al. (2010). Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages. *PloS one* 5, e9683.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009683>.

Nash, A.A., Dutia, B.M., Stewart, J.P., and Davison, A.J. (2001). Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 356, 569-579. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0779>.

Oh, J., Riek, A.E., Weng, S., Petty, M., Kim, D., Colonna, M., Cella, M., and Bernal-Mizrachi, C. (2012). Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation. *The Journal of biological chemistry* 287, 11629-11641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.338673>.

Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of clinical investigation* 109, 525-532.  
<https://doi.org/10.1172/JCI14550>.

Petrovski, S., Todd, J.L., Durheim, M.T., Wang, Q., Chien, J.W., Kelly, F.L., Frankel, C., Mebane, C.M., Ren, Z., and Bridgers, J., et al. (2017). An Exome Sequencing Study to Assess the Role of Rare Genetic Variation in Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 196, 82-93.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201610-2088OC>.

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., and Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>.

Rabeyrin, M., Thivolet, F., Ferretti, G.R., Chalabreysse, L., Jankowski, A., Cottin, V., Pison, C., Cordier, J.-F., and Lantuejoul, S. (2015). Usual interstitial pneumonia end-stage features from explants with radiologic and pathological correlations. *Annals of diagnostic pathology* 19, 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.05.003>.

Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., and Lasky, J.A., et al. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183, 788-824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>.

- 
- Raghu, G., and Richeldi, L. (2017). Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine* 129, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.05.017>.
- Selman, M., and Pardo, A. (2020). The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cellular signalling* 66, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109482>.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., and Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respiratory Research* 19. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0730-2>.
- Sisson, T.H., and Simon, R.H. (2007). The plasminogen activation system in lung disease. *Current drug targets* 8, 1016-1029. <https://doi.org/10.2174/138945007781662319>.
- Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., and Exton, M.S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular immunology* 204, 19-28. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1687>.
- Stern, J.B., Fierobe, L., Paugam, C., Rolland, C., Dehoux, M., Petiet, A., Dombret, M.C., Mantz, J., Aubier, M., and Crestani, B. (2000). Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Critical care medicine* 28, 2326-2333. <https://doi.org/10.1097/00003246-200007000-00024>.
- Stoolman, J.S., Vannella, K.M., Coomes, S.M., Wilke, C.A., Sisson, T.H., Toews, G.B., and Moore, B.B. (2010). Latent infection by  $\gamma$ herpesvirus stimulates profibrotic mediator release from multiple cell types. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300, L274-85. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00028.2010>.
- Suga, M., Iyonaga, K., Ichiyasu, H., Saita, N., Yamasaki, H., and Ando, M. (1999). Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *The European respiratory journal* 14, 376-382. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b23.x>.
- Tang, Y.-W., Johnson, J.E., Browning, P.J., Cruz-Gervis, R.A., Davis, A., Graham, B.S., Brigham, K.L., Oates, J.A., Loyd, J.E., and Stecenko, A.A. (2003). Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of clinical microbiology* 41, 2633-2640. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2633-2640.2003>.
- Tanjore, H., Blackwell, T.S., and Lawson, W.E. (2012). Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 302, L721-9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00410.2011>.

---

Tanjore, H., Lawson, W.E., and Blackwell, T.S. (2013). Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochimica et biophysica acta* 1832, 940-947.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.011>.

Tao, B., Jin, W., Xu, J., Liang, Z., Yao, J., Zhang, Y., Wang, K., Cheng, H., Zhang, X., and Ke, Y. (2014). Myeloid-specific disruption of tyrosine phosphatase Shp2 promotes alternative activation of macrophages and predisposes mice to pulmonary fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193, 2801-2811.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303463>.

Taylor, G.M., Raghuwanshi, S.K., Rowe, D.T., Wadowsky, R.M., and Rosendorff, A. (2011). Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. *Blood* 118, 5528-5539. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347112>.

Thomas, A.Q., Lane, K., Phillips, J., Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D.A., Gaddipati, R., Marney, A., and Johnson, J., et al. (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165, 1322-1328.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200112-123OC>.

Toriguchi, K., Hatano, E., Tanabe, K., Takemoto, K., Nakamura, K., Koyama, Y., Seo, S., Taura, K., and Uemoto, S. (2014). Attenuation of steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis in mice fed a methionine-choline deficient diet by CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein deficiency. *Journal of gastroenterology and hepatology* 29, 1109-1118. <https://doi.org/10.1111/jgh.12481>.

Torres-González, E., Bueno, M., Tanaka, A., Krug, L.T., Cheng, D.-S., Polosukhin, V.V., Sorescu, D., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., and Rojas, M., et al. (2012). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Age-Related Susceptibility to Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46, 748-756.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0224OC>.

Uhal, B.D., Joshi, I., Hughes, W.F., Ramos, C., Pardo, A., and Selman, M. (1998). Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *The American journal of physiology* 275, L1192-9.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.6.L1192>.

Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of cell biology* 197, 857-867.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201110131>.

Weaver, T.E., and Conkright, J.J. (2001). Function of Surfactant Proteins B and C. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 555-578. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.555>.

Weinberg, J.B., Lutzke, M.L., Alfinito, R., and Rochford, R. (2004). Mouse strain differences in the chemokine response to acute lung infection with a murine gammaherpesvirus. *Viral immunology* 17, 69-77.  
<https://doi.org/10.1089/088282404322875467>.

- 
- Wu, R.A., Upton, H.E., Vogan, J.M., and Collins, K. (2017). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annual review of biochemistry* 86, 439-460. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045019>.
- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 117, 524-529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214, 199-210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
- Wynn, T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 208, 1339-1350. <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>.
- Wynn, T.A., and Barron, L. (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease* 30, 245-257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.
- Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 18, 1028-1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.
- Yamaguchi, H., and Wang, H.-G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 45495-45502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406933200>.
- Yanagita, K., Matsumoto, K., Sekiguchi, K., Ishibashi, H., Niho, Y., and Nakamura, T. (1993). Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury. *The Journal of biological chemistry* 268, 21212-21217.
- Yao, Y., Wang, Y., Zhang, Z., He, L., Zhu, J., Zhang, M., He, X., Cheng, Z., Ao, Q., and Cao, Y., et al. (2016). Chop Deficiency Protects Mice Against Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Attenuating M2 Macrophage Production. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24, 915-925. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.36>.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* 6, 1355-1364. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7).
- Yonemaru, M., Kasuga, I., Kusumoto, H., Kunisawa, A., Kiyokawa, H., Kuwabara, S., Ichinose, Y., and Toyama, K. (1997). Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal* 10, 2040-2045. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10092040>.
- Yoshida, H. (2007). ER stress and diseases. *The FEBS journal* 274, 630-658. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x>.

- 
- Zhang, L., Wang, Y., Wu, G., Xiong, W., Gu, W., and Wang, C.-Y. (2018). Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respiratory Research* 19. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0864-2>.
- Zhang, M.-Z., Wang, X., Wang, Y., Niu, A., Wang, S., Zou, C., and Harris, R.C. (2016). IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney international* 91, 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.08.020>.
- Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104-107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>.
- Zhao, J., Li, X., Guo, M., Yu, J., and Yan, C. (2016). The common stress responsive transcription factor ATF3 binds genomic sites enriched with p300 and H3K27ac for transcriptional regulation. *BMC genomics* 17, 335. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2664-8>.
- Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D.K., Minoo, P., Liu, Y., Banfalvi, A., Krishnaveni, M.S., Dubourd, M., Demaio, L., and Willis, B.C., et al. (2010). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Epithelial-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells: Effects of Misfolded Surfactant Protein. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45, 498-509. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0347OC>.
- Zhou, X.-C., Dong, S.-H., Liu, Z.-S., Liu, S., Zhang, C.-C., and Liang, X.-Z. (2018). Regulation of gammaherpesvirus lytic replication by endoplasmic reticulum stress-induced transcription factors ATF4 and CHOP. *The Journal of biological chemistry* 293, 2801-2814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813675>.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development* 12, 982-995. <https://doi.org/10.1101/gad.12.7.982>.



---

## Publikationsverzeichnis

### Vorträge:

Martina Korfei, Mohamed Smeda, Oleksiy Klymenko, Clemens Ruppert, Ingrid Henneke, Martin Huehn, Poornima Mahavadi, Susanne Herold, Werner Seeger, Heiko Adler, Andreas Guenther: Increased susceptibility to gammaherpesvirus-induced lung fibrosis of transgenic mice with conditional overexpression of the ER stress-factor Chop in alveolar epithelium, Herbsttagung 2019 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Freitag, 29.11.2019, Samstag, 30.11.2019, Berlin

Martina Korfei, Mohamed Smeda, Oleksiy Klymenko, Clemens Ruppert, Ingrid Henneke, Martin Huehn, Poornima Mahavadi, Susanne Herold, Werner Seeger, Heiko Adler, Andreas Guenther: Increased susceptibility to gammaherpesvirus-induced lung fibrosis of transgenic mice with conditional overexpression of the ER stress-factor Chop in alveolar epithelium, Jahrestagung des Deutschen Zentrums für Lungenforschung DPLD, Freitag, 04.12.2020

### Poster:

M. Korfei, M. Smeda, O. Klymenko, C. Ruppert, I. Henneke, I. Shalashova, M. Huehn, P. Mahavadi, S. Herold, W. Seeger, H. Adler, A. Guenther: Increased Susceptibility to Gammaherpesvirus-Induced Lung Fibrosis of Transgenic Mice with Conditional Overexpression of the Pro-Apoptotic ER-Stress-Factor Chop in Alveolar Epithelium, American Thoracic Society 2019 International Conference, Mai 17-22, 2019 - Dallas, TX

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

---

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Günther, Leiter des Zentrums für interstitielle und seltene Lungenerkrankungen am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit in seinem Zentrum durchzuführen und hat mich durch das Korrekturlesen der Arbeit sowie seine Unterstützung begleitet.

Ich danke allen Postdocs, Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten (MTRs) für die Betreuung, ihr Engagement, die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre während der gesamten Arbeit.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenso danke ich meiner Ehefrau für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung während dieser Zeit.