

**Konsequenzen einer Telomerase-Defizienz in  
Alveolarepithelzellen *in vitro* und in Mausmodellen *in vivo* –  
Korrelation zu Pathogenitätsmechanismen der Idiopathischen  
Pulmonalen Fibrose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Saskia Schlenker (geb. Huber)  
aus 78112 St. Georgen

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Medizinische Forschergruppe Lungenfibrose

Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Betreuer: Herr Prof. Dr. med. Andreas Günther

Gutachter: Herr Prof. Dr. Eli El Agha

Tag der Disputation: 02.03.2026

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
CCL18 .....	7
T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	12
VEGF .....	12
Abbildungsverzeichnis .....	12
1.    Einleitung .....	14
1.1    Telomere und Telomerase .....	14
1.1.1    Telomeropathien.....	21
1.1.2    Maus und Mensch: Unterschiede in der Telomerbiologie .....	23
1.2    ER-Stress.....	24
1.2.1    PERK-Signalweg .....	25
1.2.2    ATF6-Signalweg .....	25
1.2.3    IRE1-Signalweg .....	26
1.2.4    Apoptose durch CHOP.....	27
1.2.5    ERAD .....	29
1.3    Idiopathische pulmonale Fibrose .....	30
1.4    Pathogenese der IPF .....	35
1.5    Ziel der Arbeit .....	43
2.    Material und Methoden .....	44
2.1.    Labortechnische Geräte.....	44
2.2.    Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	45
2.3.    Zellkultur: Reagenzien, Medien und Zusätze .....	46
2.4.    Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengewebe .....	47
2.5.    Verwendete Kits .....	47
2.6.    Antikörper .....	48
2.7.    Verwendete Proben .....	49

2.7.1.	Zelllinie und deren Kultivierung .....	49
2.7.2.	Mausstämme.....	51
2.8.	Oligonukleotid-Primer .....	51
2.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	54
2.10.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	55
2.11.	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot .....	58
2.12.	Immunologischer Nachweis der Proteincarbonylierung.....	60
2.13.	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Immunhistochemie.....	62
2.14.	RNA-Isolation .....	64
2.14.1.	RNA-Isolation aus murinem Lungengewebe .....	64
2.14.2.	RNA-Isolation aus A549-Zellen .....	65
2.15.	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	66
2.16.	Reverse Transkription der RNA.....	66
2.17.	Genexpressionsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR.....	67
2.17.1.	Agarose-Gelelektrophorese .....	68
2.18.	Densitometrische Auswertung und statistische Methoden.....	69
3.	Ergebnisse: <i>Telomerase</i> -Knockout in genetisch veränderten Mäusen <i>in vivo</i> .....	70
3.1.	Vergleich des Lungenphänotyps der <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> KO-Mäuse mit Wildtyp-C57BL/6J-Mäusen .....	70
3.2.	Proteinexpressionsanalyse von p53 und p21 in Lungengewebe von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse .....	71
3.3.	Genexpressionsanalysen in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse.....	74
3.3.1.	Genexpressionsanalysen in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> -Mäusen versus Wildtyp-Mäuse	74
3.3.2.	Genexpressionsanalysen in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse.....	77
3.4	Untersuchungen zur Surfactantprozessierung in <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen mittels Western Blot-Methodik .....	79

3.5	Untersuchung der Grp78-Proteinexpression in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen per Western Blot und Immunhistochemie .....	81
3.6	Untersuchung der Xbp1- sowie Chop-Proteinexpression in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen per Western Blot und Immunhistochemie .....	84
3.7	Untersuchung der TGF- $\beta$ -Proteinexpression in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen per Immunhistochemie .....	85
3.8	Untersuchung der Sirt1-Proteinexpression in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen per IHC und Western Blot .....	87
3.9	Untersuchung der Arginase-1- und Integrin- $\beta$ 6 – Expression in Lungen von <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> - und <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen durch Immunhistochemie und Western Blot-Methodik .....	88
3.10	Untersuchung der Proteinoxidation in Lungen von F3 <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> -Mäusen .....	91
4.	Zelluläre Konsequenzen der Telomeraseinhibition in A549-Zellen <i>in vitro</i> .....	92
4.1	Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von surfactantassoziierten Genen .....	93
4.2	Einfluss der Telomeraseinhibition auf Unfolded Protein Response, Zellzyklusarrest und Apoptose.....	94
4.3	Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Markern des oxidativen Stresses und Antioxidantien .....	97
4.4	Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes .....	99
4.5	Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Sirtuin 1 und Sirtuin 2 .....	101
4.6	Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Fibrose- und Inflammationsmarkern .....	102
5.	Diskussion .....	105
5.1	ER-Stressauslösung durch beeinträchtigte Telomeraseaktivität und damit verbundener Telomerverkürzung .....	105
5.2	Gestörte Surfactantproteinprozessierung durch Telomerverkürzung .....	110
5.3	Emphysementwicklung, Seneszenz und Apoptose durch Telomerverkürzung ..	115

5.4 Aktivierung proinflammatorischer Signalwege durch Telomerverkürzung .....	123
5.5 Aktivierung profibrotischer Signalwege durch Telomerverkürzung .....	128
5.6 Erhöhte Sirtuinexpression durch Telomerverkürzung .....	142
5.7 Vermehrte Proteinoxidation durch Telomerverkürzung .....	145
5.8 Kompensatorische Expressionserhöhung der Komponenten des Telomerasekomplexes durch Telomerverkürzung .....	151
5.9 Schlussfolgerungen, Limitationen und Ausblick .....	155
6. Zusammenfassung .....	160
Abstract .....	161
7. Anhang .....	162
7.1 Ehrenwörtliche Erklärung .....	162
7.2 Danksagung .....	163
Literaturverzeichnis .....	163

## Abkürzungsverzeichnis

(-/-)	Knockout beider Allele
AARE1/AARE2	Amino Acid Response Element 1 bzw. 2
Abb.	Abbildung
ABCA3	Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily A Member 3
AEC II	Typ-II-Alveolarepithelzellen
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase
ALT	Alternative Telomerverlängerung
AP	Alkalische Phosphatase
AP1	Activator Protein 1
ARG1	Arginase-1
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD
ASK1	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6 $\alpha$	Activating Transcription Factor 6 alpha
ATF6 $\beta$	Activating Transcription Factor 6 beta
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
ATS	American Thoracic Society

ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
ATS	American Thoracic Society
BAK	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
BAK	BCL2 Antagonist/ Killer
BAL	Bronchiallavage
BAX	Apoptosis regulator BAX
BAX	Bcl-2-associated X Protein
BCL2	B Cell Lymphoma 2
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-XL	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BID	BH3-interacting Domain Death Agonist
BIM	Bcl-2-Like Protein 11
BSA	Rinderserum-Albumin
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CASP11	Caspase 11
CCL18	C-C Motiv Chemokin 18
CCL2	C-C Motiv Chemokin 2
CCSP	Clara Cell Secretory Protein
CDK1-6	Cyclin Dependent Kinase 1-6
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHAC1	Glutathione-Specific Gamma Glutamylcyclotransferase 1
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CIP1	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis Oncogene
CNX	Calnexin
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-Reactive Protein
CTD	Connective Tissue Disease (Kollagenose)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTSH	Cathepsin H
CXCL12	C-X-C Motiv Chemokin 12
D.h.	Das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DBB2	Damage Specific DNA Binding Protein 2
DDR	DNA Damage Response
DERL2	Derlin-2
DERL3	Derlin-3
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DKC1	Dyskerin
D <sub>LCO</sub>	Kohlenmonoxid-Transferfaktor
D <sub>LCO</sub> /VA	Kohlenmonoxid-Transferfaktor bezogen auf das Alveolarvolumen
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium

	Nährstoffmischung F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP)
DNPH	2,4- Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxy-Nukleotid
DR5	Death Receptor 5
DR5	Death Receptor 5
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDEM	ER Degradation-Enhancing $\alpha$ -Mannosidase-Like Protein
EDN1	Endothelin 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 $\alpha$	Eukaryotischer Transkriptionsfaktor 2, Alpha-Subeinheit
ELMOD2	ELMO Domain Containing 2
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation
ERK1/ERK 2	Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2
ERLEC1	Endoplasmic Reticulum Lectin 1
ErManI	ER-Mannosidase I
ERN1	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1
ERN2	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 2
ERO1 $\alpha$	Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 alpha
ERSE	ER-Stress Response Element
ER-Stress	Endoplasmatischer Retikulum-Stress
ET-A, ET-B	Endothelinrezeptor A und B
EZM	Extrazelluläre Matrix
F3/ F5	Dritte Generation/ Fünfte Generation
F10	Faktor X
FADD	FAS-associated Death Domain Protein
FADD	FAS-Associated Death Domain Protein
FEV <sub>1</sub>	Forcierte Einsekundenkapazität
FGFR	Fibroblast Growth Factor-Rezeptor
FIP	Familiäre idiopathische interstitielle Pneumonie
FIP	familiäre idiopathische interstitielle Pneumonie
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GAR1	H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 1
GERD	Gastroösophagealer Reflux
Glc	Glucose
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GP130	Glykoprotein 130
GRB2	Growth Factor Receptor-bound Protein 2
GRP78	78-kDa Glucose-Regulated Protein
GRP94	Glucose-Regulated Protein 94
GTP	Guanosintriphosphat
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HP	Haptoglobin
HRCT	Hochauflösende Computertomographie
HRD1	Hydroxymethyl Glutaryl-Coenzyme A Reductase Degradation Protein 1
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP47	Heat Shock Protein 47
Hsp70	70 Kilodalton Heat Shock Protein
HSP90B1	Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
IGFBP3	Insulin-like Growth Factor-binding Protein 3
IHC	Immunhistochemie
IIP	Idiopathische Interstitielle Pneumonie
IKB	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IKK	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase
IL-10	Interleukin 10
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin 8
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP3	Inositoltriphosphat
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
IRE1 $\alpha$	Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAP	Latency-associated Peptide

LPS	Lipopolysaccharid
LPS	Lipopolysaccharide
LTBP	Latent Transforming Growth Factor beta-binding Protein
Man	Mannose
Man	Mannose
MAP3K	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase
MAPK	Mitogen Activated Kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MEK 1/2	Dual Specificity Mitogen-activated Protein Kinase Kinase MEK 1/2
MEM	Minimal Essential Medium
<i>MIR17</i>	microRNA 17
MMP's	Matrixmetalloproteinasen
MUC5B	Mucin-5B
Myd88	Myeloid Differentiation Factor 88
NAc	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAPSA	Napsin A
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NF-Y	Nuclear Factor Y
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NHP2	H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2
NLRP3	NOD-, LRR- and Pyrin Domain Containing Protein 3
NLRP3	NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3)
NOP10	H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 3
NOX2	NADPH-Oxidase Isoform 2
NOX4	NADPH-Oxidase Isoform 4
NOXA1	NOX Activator 1
NOXO1	NADPH Oxidase Organizer 1
NRF2	NF-E2-Related Factor
NSIP	Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie
P11, P19, P46	Passage 11, Passage 19, Passage 46
P22phox	Cytochrome B-245 Light Chain
P47phox	Neutrophil Cytosol Factor 1
P50ATF6	Cytoplasmatischer Anteil des gespaltenen ATF6
P67phox	Neutrophil Cytosol Factor 2
PAI1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor-Rezeptor
PERK	PKR-Like ER Kinase
PGC	Pepsinogen C
PKB	Proteinkinase B
POT1	Protection of Telomeres Protein 1
PRDX 1-6	Peroxiredoxin 1-6
proSP-B	Unprozessiertes Surfactantprotein B, 42 kDa
proSP-C	Unprozessiertes Surfactantprotein C, 21 kDa
pSer <sup>15</sup>	An Serin 15 phosphoryliertes p53
PUMA	P53-Upregulated Modulator of Apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R18S	18S rRNA
RAF	über RAF Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
RAP1	Repressor and Activator Protein 1
RB	Retinoblastoma-Associated Protein
RB	Retinoblastoma-Associated Protein
RIDD	Regulated IRE1-Dependent Decay
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RTEL1	Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEL1L	Sel-1 Homolog 1
SHCA	SHC-Transforming Protein 1
SIP1	Site-1-Protease
SIP2	Site-2-Protease
siRNA	Small interfering RNA.
siRNA	Small Interfering RNA
SIRT1	Sirtuin 1
SIRT2	Sirtuin 2
SMAD-Proteine	Mothers Against Decapentaplegic Homolog -Proteine
SOS	Son of Sevenless
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SPF	Specific Pathogen-Free
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription

T <sup>-</sup>	A549-Zellen, deren Telomerase durch BIBR1532-Behandlung inhibiert wurde
T <sup>+</sup>	Nicht mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen, Telomerase funktionsfähig
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris-Buffered Saline with Tween20
TCAB1	Telomerase Cajal Body Protein 1
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGFBR 1-3	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1-3
TGF- $\beta$ , TGFB	Transforming Growth Factor beta
T <sub>H</sub> 2-Zellen	Typ-2-T-Helferzellen
TIN2	TRF1-Interacting Nuclear Protein 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
tPA, PLAT	Tissue-type Plasminogen Activator
TPP1	TIN2-Interacting Protein
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRB3	Tribbles Homolog 3
TRF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1
TRF2	Telomeric Repeat Binding Factor 2
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTF1	Thyroid Transcription Factor 1
TUNEL	TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
UIP-Muster	Usual Interstitial Pneumonia- Muster
UIP-Muster	Usual Interstitial Pneumonia-Muster
uPA,PLAU	Urokinase-type Plasminogen Activator
UPR	Unfolded Protein Response
VATS	Videoassistierte Thorakoskopie
VCP	Valosin-Containing Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
Wt	Wildtyp
XBP1	X-Box Binding Protein 1
XBP1(s)	Gespleißte Form von XBP1
$\alpha$ -SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** (eigene Abbildung nach [435]) Semikonservative Replikation und Endreplikationsproblem an den Telomeren..... 16

<b>Abbildung 2</b> ([435], modifiziert): Telomerstruktur.....	17
<b>Abbildung 3</b> (eigene Abbildung nach [435]): Shelterinkomplex .....	18
<b>Abbildung 4</b> (eigene Abbildung nach [157]): Struktur des Telomerasekomplexes .....	19
<b>Abbildung 5</b> (eigene Abbildung): Die ER-Stressantwort.....	29
<b>Abbildung 6</b> : Idiopathische interstitielle Pneumonien .....	30
<b>Abbildung 7</b> (eigene Abbildung nach [372]): Diagnoseschema IPF.....	32
<b>Abbildung 8</b> ([28, 45], modifiziert): UIP-Muster mit Honeycombing im HRCT (A und B) und in der Biopsie (C).....	34
<b>Abbildung 9</b> (eigene Abbildung): IPF-Pathogenese .....	42
<b>Abbildung 10</b> : Labortechnische Geräte .....	45
<b>Abbildung 11</b> : Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	46
<b>Abbildung 12</b> : Zellkultureagenzien .....	47
<b>Abbildung 13</b> : Verwendete Kits .....	48
<b>Abbildung 14</b> : Verwendete Primärantikörper .....	49
<b>Abbildung 15</b> : Verwendete Sekundärantikörper.....	49
<b>Abbildung 16</b> : Mausspezifische Primer .....	52
<b>Abbildung 17</b> : Humanspezifische Primer .....	54
<b>Abbildung 18</b> : SDS-PAGE Pipettierschema .....	56
<b>Abbildung 19</b> (Fisher Scientific): Proteingrößenstandard.....	57
<b>Abbildung 20</b> ([488]): Reaktion einer Proteincarbonyl-Gruppe mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin am Beispiel einer Lysinseitenkette .....	61
<b>Abbildung 21</b> : Schritte der PCR .....	67
<b>Abbildung 22</b> (Eurogentec): Größenstandard SmartLadder .....	69
<b>Abbildung 23</b> : Lungenphänotyp von F3 und F5 $Terc^{(-/-)}$ -Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. ....	71
<b>Abbildung 24</b> : Proteinexpressionsanalyse von p53 und p21 in F3 $Terc^{(-/-)}$ - und F3 $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen versus Wildtypmäuse.....	73
<b>Abbildung 25</b> : Genexpression von zellulären Stressmarkern in Lungengewebe von F3 $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen versus Wildtypmäuse. ....	76
<b>Abbildung 26</b> : Genexpressionsanalyse von zellulären Stressmarkern in Lungengewebe von F3 $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ - versus Wildtypmäusen .....	79
<b>Abbildung 27</b> : Analyse der Proteinexpression der Surfactantproteine in den F3- $Terc^{(-/-)}$ - und F3- $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. ....	81
<b>Abbildung 28</b> : Grp78-Proteinexpression im Lungengewebe von $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. ....	82
<b>Abbildung 29</b> : IHC-Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression von Grp78 in Lungengewebe von $Terc^{(-/-)}$ - und $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. ....	83
<b>Abbildung 30</b> : Untersuchung der Xbp1- sowie Chop-Proteinexpression in Lungen von $Terc^{(-/-)}$ - und $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.....	85
<b>Abbildung 31</b> : Untersuchung der TGF- $\beta$ -Proteinexpression in Lungen von $Terc^{(-/-)}$ - und $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp per Immunohistochemie. ....	86

<b>Abbildung 32:</b> Untersuchung der Sirt1-Proteinexpression in Lungen von Terc <sup>(-/-)</sup> - und Terc <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp per Western Blot und Immunhistochemie. ....	87
<b>Abbildung 33:</b> Lokalisation des Sirt1-Proteins in Terc <sup>(-/-)</sup> -, Terc <sup>(-/-)</sup> -SPC/GFP- und Wildtypmäusen per Immunhistochemie. ....	88
<b>Abbildung 34:</b> Proteinexpression (Western Blot) von Arginase-1 und Integrin-β6 in Lungen von Terc <sup>(-/-)</sup> - und Terc <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. ....	90
<b>Abbildung 35:</b> Lokalisationsbestimmung des Arginase-1-Proteins in Terc <sup>(-/-)</sup> -Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen per Immunhistochemie. ....	91
<b>Abbildung 36:</b> Proteinoxidation in F3 Terc <sup>(-/-)</sup> -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. ....	92
<b>Abbildung 37:</b> Expression von surfactantprozessierenden Proteasen in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	94
<b>Abbildung 38:</b> Genexpression von ER-Stress-Markern in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	97
<b>Abbildung 39:</b> Expression von Genen des oxidativen und antioxidativen Stoffwechsels in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	99
<b>Abbildung 40:</b> Genexpression von Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	101
<b>Abbildung 41:</b> Expression des SIRT1- und SIRT2-Gens in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	102
<b>Abbildung 42:</b> Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen in telomeraseinhibierten A549-Zellen. ....	105
<b>Abbildung 43:</b> Übersicht über die untersuchten ER-Stressmarker. ....	110
<b>Abbildung 44:</b> Emphysementstehung durch Telomerverkürzung. ....	123

## 1. Einleitung

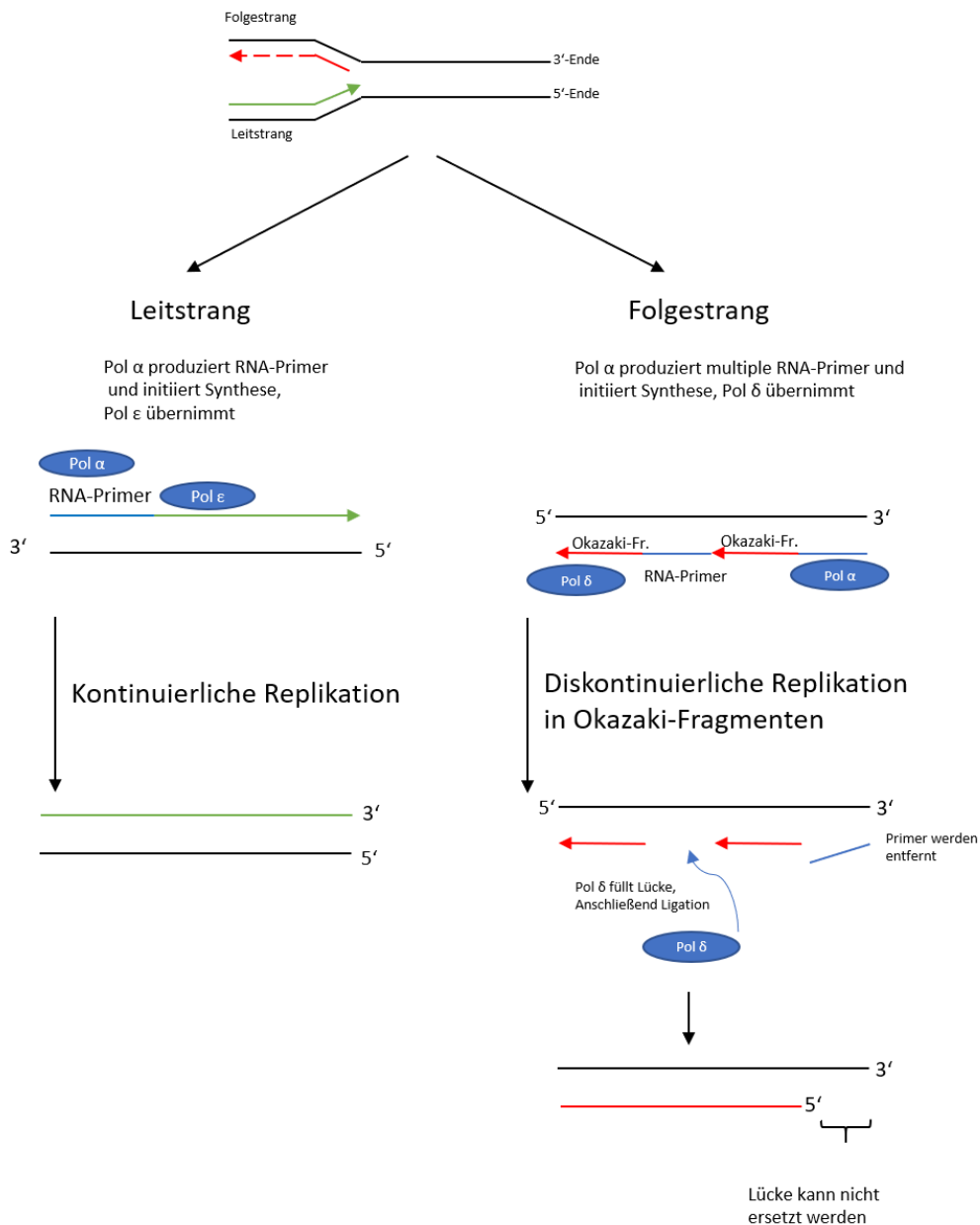
### 1.1 Telomere und Telomerase

Telomere sind repetitive nichtkodierende DNA-Sequenzen an den Enden linearer Chromosomen, die in humanen Zellen etwa 7-11 Kilobasen (kb) lang sind und aus Wiederholungen der hexameren Sequenz TTAGGG bestehen [57, 349]. Sie schützen die chromosomalen Enden davor, als DNA-Strangbrüche erkannt zu werden und gewährleisten dadurch die Stabilität des Genoms. Zudem lösen sie das Endreplikationsproblem: Am Folgestrang der DNA wird diese stückchenweise von RNA-Primern ausgehend in Okazaki-Fragmenten synthetisiert. Nach Degradation der Primer füllt die DNA-Polymerase  $\delta$  die entstehenden Lücken auf. Da sie jedoch nicht an das freie Ende des 5'-Stranges binden kann, gehen hier bei jeder Replikation etwa 50-200 bp des 5'-Stranges verloren. Folglich verbleibt ein einzelsträngiger Überhang am 3'-Strang (Abb. 1) [96, 436, 506].

Die Telomere der Chromosomen können sich mit jeder Zellteilung verkürzen, ohne dass dabei kodierende Sequenzen verlorengehen. Unterschreitet die Telomerlänge bei humanen Zellen nach durchschnittlich 40-60 Teilungen das sogenannte Hayflick-Limit, gehen diese in die replikative Seneszenz über [179, 436]. Seneszenz bezeichnet einen Zustand von Zellen, in dem diese irreversibel dem Zellzyklus entzogen sind [187]. Außer durch den Zellzyklusarrest sind seneszente Zellen weiterhin durch einen veränderten Metabolismus, eine veränderte abgeflachte Morphologie, Chromatinveränderungen, die Sekretion bestimmter Signalmoleküle des Senescence-associated Secretory Phenotype (SASP) und Apoptoseresistenz gekennzeichnet [187].

Bei Zellen, denen Checkpoints des Zellzyklus wie p53 beispielsweise aufgrund einer Mutation oder eines *Knockouts* (KO) fehlen, sind weitere Teilungen bis zur „Krise“ möglich. Hierunter versteht man massenhafte Apoptose aufgrund dysfunktional kurzer Telomere. Zellen mit aktivierter Telomerase sind in der Lage, die Krise zu überstehen und werden immortalisiert [96, 436, 506].

# Semikonservative DNA-Replikation und das Endreplikationsproblem



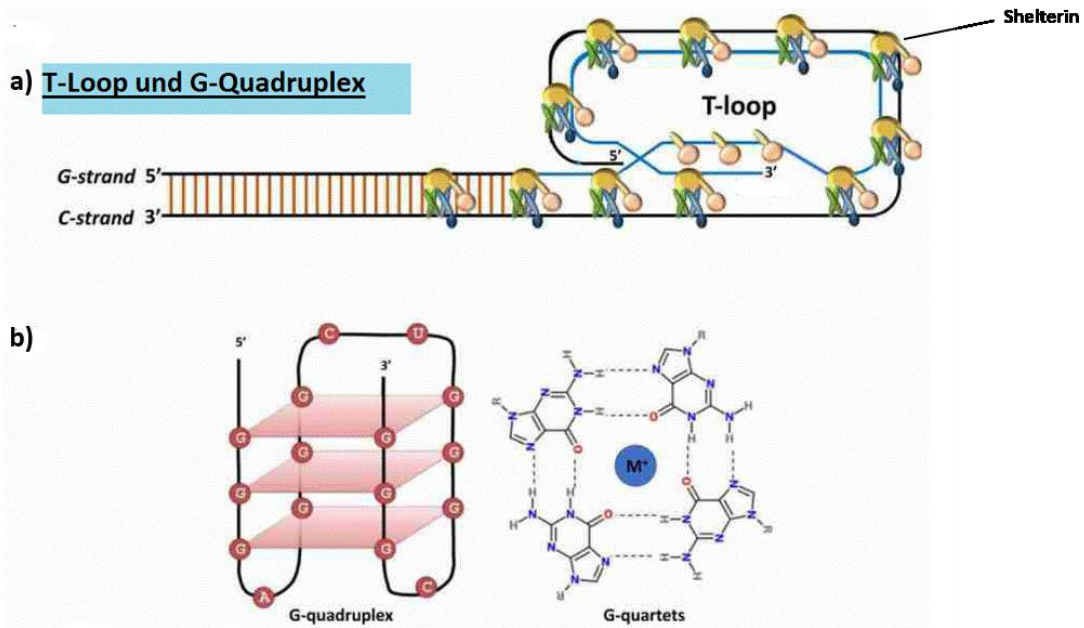
**Abbildung 1:** (eigene Abbildung nach [436]) Semikonservative Replikation und Endreplikationsproblem an den Telomeren

Die Grafik zeigt auf der linken Seite die kontinuierliche Replikation am Leitstrang, wo ein einzelner RNA-Primer durch die Primaseaktivität der Polymerase  $\alpha$  synthetisiert und die anschließende Replikation initial von der DNA-Polymerase  $\alpha$  und im Verlauf von der DNA-Polymerase  $\epsilon$  übernommen wird. Rechts wird die diskontinuierliche Replikation am Folgestrang gezeigt, wo ebenfalls die Polymerase  $\alpha$  die Primer produziert, die Replikation jedoch dann durch die Polymerase  $\delta$  übernommen wird. Da die Replikation immer nur in 5'-3'-Richtung ablaufen kann, der Folgestrang jedoch in die entgegengesetzte Richtung durch die Helikase geöffnet wird, müssen hier viele Primer synthetisiert werden und die Replikation läuft stückchenweise in Okazaki-Fragmenten ab. Nach Entfernung der Primer füllt die Polymerase  $\delta$  die entstehenden Lücken. Am 5'-Ende der Telomere kann die Lücke bei fehlendem Primer jedoch nicht aufgefüllt werden, weswegen sich die Telomere mit jeder Zellteilung verkürzen.

**Abkürzungen:** Pol= Polymerase

Um Telomere vor dem Abbau durch Exonukleasen beziehungsweise dem Erkantwerden als Doppelstrangbruch durch die DNA-Reparaturenzyme zu schützen, sind sie in einer bestimmten Form aufgebaut.

Entweder faltet sich der einzelsträngige guaninreiche G-Strang als lassoähnlicher T-Loop zwischen den beiden Doppelsträngen zurück oder er arrangiert sich in G-Quadruplexen. Diese sind um ein zentrales Kation angeordnet und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (**Abbildung 2**) [162, 441].



*Abbildung 2 ( [436], modifiziert): Telomerstruktur*

a) T-Loop: Der 3'-Überhang faltet sich lassoähnlich zwischen die Doppelstränge zurück und paart sich mit korrespondierenden Basenpaaren. Hierdurch wird ein freies Helixende vermieden. Telomere werden durch die Proteine des Shelterinkomplexes vor Fusion und Aktivierung der DNA Damage Response geschützt.

b) Telomerische DNA ist guaninreich. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninbasen bilden sich G-Tetraden (rechts), die durch ein zentrales Kation weiter stabilisiert werden. Die G-Tetraden der Telomere können intramolekulare 4-strängige Helices, die G-Quadruplexe, bilden (links).

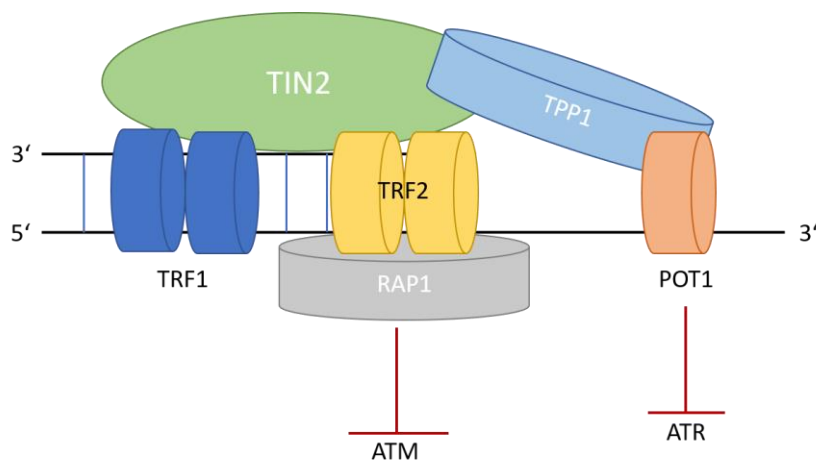
Weiterhin werden humane Telomere durch die Proteine des aus sechs Untereinheiten bestehenden Shelterinkomplexes geschützt. Telomeric Repeat Binding Factor 1 und 2 (TRF1 und TRF2) binden als Homodimere direkt an die doppelsträngige telomerische DNA, während Protection of Telomeres Protein 1 (POT1) den einzelsträngigen 3'-Überhang bindet. Verbunden werden die Einzelkomponenten durch TRF1-Interacting Nuclear Protein 2 (TIN2) und TIN2-Interacting Protein (TPP1). Die sechste Komponente, Repressor and Activator Protein 1 (RAP1), bindet nur an TRF2 (**Abbildung 3**). Shelterin als Komplex schützt die telomerische DNA vor Fusion und davor, als DNA-Schaden erkannt zu werden [406]. Die einzelnen Komponenten erfüllen dabei unterschiedliche Aufgaben:

So sind TRF1 und 2 negative Regulatoren der Telomerlänge, ihre Überexpression führt zu Telomerverkürzung [433]. Durch Rekrutierung von Helikasen sind TRF1 und TRF2 zudem essentiell für die Replikation der Telomerregion [141, 417].

TRF2 ist für die Ausbildung des T-Loops bedeutsam und verhindert zusätzlich, dass die Telomerenden über den Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM)-Signalweg als Doppelstrangbruch erkannt werden [223, 456].

POT1 hemmt die Fusion der Telomerenden, die Erkennung des 3'-Überhanges als Einzelstrangbruch durch den Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related (ATR)-Signalweg und die Einleitung der homologen Rekombination [109, 181, 191]. Zudem rekrutiert der Komplex aus POT1 und TPP1 die Telomerase an die Telomere, wodurch deren Aktivität und Prozessivität erhöht wird [476, 508]. Im Unterschied zu Menschen besitzen Mäuse mit *Pot1a* und *Pot1b* zwei Homologe von POT1 [191].

Bei zunehmender Telomerverkürzung nimmt die Menge gebundenen Shelterins ab, bis schließlich keine ausreichende Hemmung der DNA Damage Response mehr besteht. Dies führt zu Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose und im Extremfall zu Telomerefusionen und genomischer Instabilität. Dementsprechend sind Mutationen in den für Shelterinkomponenten kodierenden Genen auch schwerwiegend und führen beim Menschen zu Krankheiten wie Dyskeratosis congenita. Im Mausmodell ist ein Knockout der entsprechenden Gene mit Ausnahme von *Rap1* bereits embryonal letal [406].



**Abbildung 3** (eigene Abbildung nach [436]): Shelterinkomplex

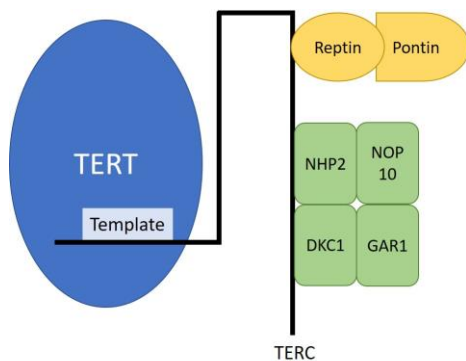
TRF und TRF2 binden als Homodimere an die doppelsträngige DNA, RAP1 bindet direkt an TRF2. TRF1 und TRF2 sind für die Ausbildung des T-Loops und die Rekrutierung von Helikasen bedeutsam, RAP1 und TRF2 verhindern die Erkennung der telomerischen DNA als Doppelstrangbruch über den ATM-Signalweg. POT1 bindet an den 3'-Überhang und verhindert gemeinsam mit TPP1 die Aktivierung der DDR über ATR. TIN2 hält den gesamten Shelterinkomplex wie eine Klammer zusammen.

**Abkürzungen:** TIN2= TRF1-Interacting Nuclear Protein 2. TRF1/ TRF2= Telomeric Repeat Binding Factor 1/2. TPP1= TIN2-Interacting Protein. RAP1= Repressor and Activator Protein 1. POT1= Protection of Telomeres Protein 1. ATM= Ataxia Telangiectasia-Mutated Signalweg. ATR= Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Signalweg

Eine Möglichkeit, der zunehmenden Verkürzung der Telomere entgegenzuwirken, bietet die reverse Transkriptase Telomerase. Das humane Telomerase-Holoenzym besteht aus

der katalytischen Untereinheit Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und dem Template für die reverse Transkription, Telomerase RNA Component (TERC). Gemeinsam mit den assoziierten Proteinen Dyskerin (DKC1), H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 3 (NOP10), H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2 (NHP2), H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 1 (GAR1) und den ATPasen Pontin und Reptin entsteht der Telomerasekomplex. Diese zusätzlichen Komponenten stabilisieren den Komplex und sind an Biogenese, Funktion und subzellulärer Lokalisation der Telomerase beteiligt (Abb.4) [436].

Im Unterschied zu anderen reversen Transkriptasen kann die Telomerase hunderte Nukleotide an einen einzigen DNA-Primer anfügen, anders ausgedrückt besitzt sie eine hohe Prozessivität [452]. Bei Erreichen des 5'-Endes des TERC-Template wird die frisch synthetisierte DNA neu positioniert, sodass weitere Nukleotide angefügt werden können, ohne dass sich die Telomerase ablösen muss [506]. Als Primer dient hierbei der Einzelstrangüberhang der telomerischen DNA, die Telomerase kann jedoch praktisch jeden guaninreichen Einzelstrang als Primer verwenden [160, 321].



*Abbildung 4 (eigene Abbildung nach [157]): Struktur des Telomerasekomplexes*

Die reverse Transkriptase Telomerase besteht aus der eigentlichen katalytischen Untereinheit (TERT), dem RNA-Template TERC sowie die assoziierten Proteinen NHP2, NOP10, DKC1, GAR1 sowie den ATPasen Reptin und Pontin. Diese Proteine sind an Biogenese, Funktion und subzellulärer Lokalisation der Telomerase beteiligt.

**Abkürzungen:** DKC1=Dyskerin, GAR1= H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 1, NHP2= H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2, NOP10= H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 3, TERT= Telomerase Reverse Transkriptase

Telomeraseaktivität ist in fetalem humanem Gewebe der 16. Entwicklungswoche ubiquitär nachweisbar, in der weiteren Entwicklung nimmt diese jedoch zunehmend ab und ist in adulten somatischen Zellen nicht mehr nachweisbar [504]. Die meisten humanen adulten Stammzellen weisen zwar Telomeraseaktivität auf, diese ist jedoch im Vergleich zu embryonalen Stammzellen deutlich geringer ausgeprägt[189].

Ursache hierfür ist in der Regel die Repression der *TERT*-Expression, während *TERC* weiter exprimiert wird. Ausnahmen sind Keimzellen und Zellen mit hohem regenerativen

Potential wie hämatopoetische Zellen, periphere Lymphozyten und bestimmte epitheliale Zellen der Haut, der Haarfollikel, des Endometriums und des Gastrointestinaltraktes [225]. Auch eine als Progenitorzellen geltende Teilpopulation der Typ II-Zellen des Alveolarepithels weist Telomeraseaktivität auf. Selbst in diesen Zellen nimmt die Telomerlänge jedoch mit zunehmendem Alter ab [121, 225].

Die Aktivität der Telomerase wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Hierzu gehören Transkription, alternatives Splicing von *TERC* und *TERT*, posttranslationale Modifizierungen sowie Transport und Zusammenbau der Untereinheiten. Weiterhin wird sie von Faktoren wie UV-Strahlung, Interferon-alpha und Östrogen beeinflusst [96].

Die katalytische Aktivität der Telomerase ist von der Telomerlänge abhängig, kürzere Telomere werden bevorzugt verlängert [452]. Wie die Erkennung der Telomerlänge auf molekularer Ebene abläuft, ist noch ungeklärt, es existieren jedoch verschiedene Modelle. Das Proteinzählmodell geht davon aus, dass Proteine des Shelterinkomplexes, die mit zunehmender Telomerlänge in größerer Zahl binden können, als negative Regulatoren der Telomeraseaktivität wirken [296]. Hierfür spricht, dass Knockouts von *TRF1*, *TRF2*, *POT1*, und *TIN2* jeweils zu exzessiver Telomerverlängerung führen [159]. Das Replikationsgabelmodell führt diesen Ansatz weiter. Hier wird angenommen, dass die Telomerase an die Replikationsgabel gebunden ist und die Shelterinproteine, wenn sie an langen Telomeren in großer Anzahl vorliegen, eine Dissoziation der Telomerase von der Replikationsgabel bewirken. Dadurch verliert sie den Kontakt zu den Telomerenden und kann sie folglich nicht verlängern [159]. Das Schalter-Modell geht dagegen davon aus, dass an lange Telomere gebundene Proteine eine Konformationsänderung derselben in eine durch die Telomerase nicht verlängerbare Konformation bewirken können [452].

Die Telomerase ist jedoch nicht die einzige Möglichkeit der Verlängerung kurzer Telomere. Bestimmte Krebszellen erhalten ihre Telomerlänge stattdessen mithilfe der alternativen Telomerverlängerung (ALT) [71].

Untersuchungen an menschlichen Probanden zeigen, dass die individuelle Telomerlänge erblich ist und von der Länge der elterlichen Telomere abhängt. Zudem haben Alter (zunehmende Verkürzung) und Umweltfaktoren Einfluss auf die Telomerlänge. Als wichtigster Faktor gilt hier oxidativer Stress, weitere sind Inflammation, Lebensstil, physiologischer Stress und Kontakt zu Karzinogenen. Raucher haben signifikant kürzere Telomere als Nichtraucher [436].

### 1.1.1 Telomeropathien

Telomeropathien sind Krankheiten, die durch sehr kurze Telomere verursacht werden. Phänotypisch können sich diese Erkrankungen auf unterschiedliche Art und in verschiedenen Altersklassen manifestieren, weswegen man sie im klinischen Alltag verschiedenen Krankheitsbildern zuordnet. Zu diesen gehören Dyskeratosis congenita, Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom, Revesz-Syndrom, aplastische Anämie und idiopathische Lungenfibrose (IPF). Der Pathomechanismus ist jedoch immer derselbe: Durch Mutationen in für Bestandteile des Telomerase- oder Shelterinkomplexes kodierenden Genen kommt es insbesondere in Geweben mit hohem Zellumsatz zu zunehmender Telomerverkürzung und Auslösung der DNA-Damage-Response. Seneszenz beziehungsweise Apoptose sind die Folge. Entscheidend ist hierfür nicht die durchschnittliche Telomerlänge, sondern die Länge der kürzesten Telomere [24, 226, 383].

Die Dyskeratosis congenita ist mit einer Prävalenz von eins zu einer Million eine seltene, aber schwerwiegende Krankheit. Die typische klinische Trias, die sich meist innerhalb der ersten Lebensdekade manifestiert, besteht aus oraler Leukoplakie, Nageldystrophie und Hyperpigmentierung der Haut. In den jungen Erwachsenenjahren kommt in 80% der Fälle eine Knochenmarksinsuffizienz dazu. Viele weitere Organsysteme können betroffen sein, beispielsweise sind Lungenfibrose, Wachstumsretardierung und frühzeitig ergrauendes Haar häufig. Bekannte molekulargenetische Ursachen sind Mutationen in den für Telomerase- bzw. Shelterinkomponenten kodierenden Genen *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOPI0*, *NHP2*, *TIN2* und *Telomerase Cajal Body Protein 1 (TCAB1)* [24, 118]. Seltene und besonders schwer verlaufende Formen der Dyskeratosis congenita sind das Hoyeraal-Hreidarsson- und das Revesz-Syndrom. Beide können durch eine *TIN2*-Mutation verursacht werden und sind durch extrem kurze Telomere und den bereits pränatalen Beginn gekennzeichnet. Zusätzlich zu den Symptomen der Dyskeratosis congenita treten beim Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom Mikrozephalie, intrauterine Wachstumsretardierung, zerebelläre Hypoplasie und Immundefizienz auf. Typisch für das Revesz-Syndrom ist darüber hinaus eine bilaterale exsudative Retinopathie. Während in den ersten Jahren vor allem die Folgen der Immundefizienz krankheitsbestimmend sind, kommen im Verlauf Knochenmarksversagen und aplastische Anämie hinzu [24, 195].

Ein Großteil der Telomeropathien beginnt jedoch erst im Erwachsenenalter, am häufigsten ist hierbei die IPF. Etwa 8-15% der familiären und 1-3% der sporadischen

Fälle trägt Mutationen in für Bestandteile des Telomerase- oder Shelterinkomplexes kodierenden Genen [24]. Am häufigsten betroffen sind hierbei *TERC* oder *TERT*, seltener *DKC1*, *TIN2* und das für eine an der Telomerreplikation beteiligte Helikase kodierende Gen 'Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1' (*RTEL1*) [25, 193, 222, 252]. In den letzten Jahren wurden zudem IPF-Patienten mit Mutationen in *TPP1* sowie *POT1* beschrieben [192, 228]. Darüber hinaus konnten Alder et al. in einer Analyse peripherer Leukozyten zeigen, dass idiopathische interstitielle Pneumonien wie die IPF allgemein mit verkürzten Telomeren einhergehen. Unabhängig vom jeweiligen Mutationsstatus der Gene des Telomerasekomplexes wiesen 97% der untersuchten Patienten im Vergleich zu gleich alten gesunden Probanden verkürzte Telomere auf. Diese Verkürzung ließ sich auch im Alveolarepithel nachweisen [12].

Mutationen in *TERC* und *TERT* finden sich außerdem in 3-5% der Patienten mit aplastischer Anämie, die ebenfalls als Telomeropathie einzuordnen ist [24].

Die Telomersyndrome sollten nicht als isolierte Krankheitsbilder betrachtet werden, da ihnen ein gemeinsamer Pathomechanismus zugrunde liegt. Folglich gibt es auch Überlappungen zwischen den klinischen Bildern. So haben IPF-Patienten mit Mutationen in den Telomerasegenen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Leberfibrose und Knochenmarksinsuffizienz. Auf der anderen Seite vertragen DC-Patienten die der Stammzelltransplantation vorangehende Chemotherapie meist äußerst schlecht und entwickeln gehäuft eine Lungenfibrose, da die pulmonale Regenerationsfähigkeit durch die Telomerverkürzung eingeschränkt ist. Die Telomerlänge ist ein erblicher Faktor, weswegen sich in Familien mit Telomeropathien über die Generationen hinweg ein immer früher auftretendes und zunehmend schwerwiegenderes Krankheitsbild zeigt. Dabei zeigen frühere Generationen eher milde Ausprägungen wie IPF im höheren Erwachsenenalter, spätere Generationen dann Formen wie das Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom bereits im Kleinkindalter [24, 256].

Die Telomerverkürzung hat auf die verschiedenen Zellpopulationen unterschiedliche Auswirkungen. In sich schnell teilenden Geweben wie dem Knochenmark führt sie zur frühzeitigen Erschöpfung der regenerativen Kapazität der Stammzellen und resultierend daraus zu einer Verringerung der Stammzellzahl. Im Falle des Knochenmarks endet dies in der Panzytopenie oder aplastischen Anämie [24, 156]. Lungengewebe hat einen weitaus geringeren Zellumsatz als Zellen des hämatopoetischen Systems, weswegen sich die Telomere der pulmonalen Stammzellen nicht so schnell verkürzen [24]. Dementsprechend entwickeln telomerasedefiziente Mäuse im Tiermodell zwar einen

Verlust der als Progenitorzellen geltenden Typ-II-Zellen durch Apoptose und daraus folgend eine Simplifizierung der Alveolarstruktur, aber keine spontane Lungenfibrose [266]. Die Widerstandsfähigkeit der Lunge ist jedoch stark eingeschränkt, bei Schäden des Alveolarepithels kann sich dieses nur begrenzt regenerieren und wird schnell durch Narbengewebe ersetzt. So reagieren beispielsweise *Tert*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse schon auf für Wildtyp-Mäuse subtoxische Mengen an Bleomycin mit der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose [366]. In sich langsam teilenden Geweben wird für die Entwicklung eines pathologischen Phänotyps folglich ein sogenannter „Second Hit“ benötigt, der zur Erschöpfung der parenchymalen Regenerationsfähigkeit und zum Ersatz des funktionalen durch fibrotisches Gewebe führt [24].

Seneszenz durch Telomerverkürzung trägt auch durch einen weiteren Mechanismus zur Fibroseentstehung bei: Senescente Zellen sind mit einem sekretorischen Phänotyp assoziiert (SASP). Die hierbei vermehrt sekretierten Cytokine wie IL-6 und IL-1 $\beta$  sind ebenfalls in der Lage, profibrotische Wirkung zu entfalten [98]. Einen dritten Mechanismus, über den verkürzte Telomere krankheitsverursachend sind, konnten Guo et al. in Akita-Mäusen beobachten. Hier führen dysfunktionale Telomere zu einem veränderten Genexpressionsmuster, wodurch die Insulinsekretion der Betazellen trotz erhaltener Betazellmasse gestört wird. Dieses Prinzip könnte auch bei anderen sekretorischen Zelltypen wie den alveolären Typ II-Zellen bei der IPF zum Tragen kommen [163].

### 1.1.2 Maus und Mensch: Unterschiede in der Telomerbiologie

Die Telomerlänge in menschlichen Zellen korreliert invers mit dem Alter der entsprechenden Menschen. Selbiges trifft zwar auch für Mäuse zu, jedoch haben Labormäuse wie die des C57BL/6J-Stammes durchschnittlich 5-10-fach längere Telomere als Menschen, obwohl sie wesentlich kürzer leben. Dies liegt daran, dass Mäuse auch in somatischen Zellen Telomerase exprimieren [75, 395]. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied lieferten Seluanov et al., als sie nachwiesen, dass die Telomeraseaktivität, zumindest in Nagern, invers mit deren Körpermasse korreliert. Mit der größeren Körpermasse gehen eine höhere Gesamtzellzahl und damit ein höheres Entartungsrisiko einher. Die Autoren folgerten, dass man die verringerte Telomeraseexpression in größeren Tieren als Mechanismus zur Krebsvermeidung interpretieren kann [413].

## 1.2 ER-Stress

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist eine Organelle mit vielseitigen Funktionen. An den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums werden sekretorische und Transmembranproteine synthetisiert und unter Chaperon-Assistenz gefaltet, das ER ist somit die erste Station des sekretorischen Weges. Außerdem finden hier posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Disulfidbrückenbildung statt. Das glatte ER ist der Ort der Synthese von Phospholipiden, Fettsäuren und Steroidhormonen sowie der Xenobiotika-Entgiftung. Zudem werden im endoplasmatischen Retikulum neue Biomembranen gebildet und es stellt den wichtigsten Calciumspeicher der Zelle dar.

Wird die Proteinfaltungsfunktion des ER derart gestört, dass ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren, spricht man von endoplasmatischem Retikulum-Stress (ER-Stress) [408]. Alle Faktoren, die die Proteinfaltung beeinträchtigen, können ER-Stress auslösen. Hierzu gehören Energiemangel bei Glucosedepriuation, Störungen im Redox- oder Ionenmilieu des ER, Steigerung der Proteinsynthese und Störungen des Proteinabbaus. Auch Mutationen in proteinkodierenden Genen und fehlerhafte posttranslationale Modifikationen können zu Fehlfaltungen und damit zu ER-Stress führen. Um die gestörte Homöostase wiederherzustellen, wird die Unfolded Protein Response (UPR) in der Zelle aktiviert. Diese erhöht Volumen und Faltungskapazität des ER, während gleichzeitig die Proteinlast reduziert wird [245].

Mechanismen der UPR sind globale Translationsrepression, Induktion von Komponenten der ER-assoziierten Proteindegradation (Endoplasmic Reticulum-associated protein degradation, ERAD) und Autophagie, gesteigerte Expression von faltungsunterstützenden ER-Chaperonen, sowie, bei ausgeprägtem ER-Stress, Apoptoseinduktion [523].

Drei verschiedene ER-Stress-Sensoren in Form von Transmembranproteinen in der Membran des ER dienen dazu, einen Anstieg in der Menge an un- oder fehlgefalteten Proteinen zu detektieren: Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha ( $IRE1\alpha$ ), eine Serin-/Threoninkinase und Endoribonuklease, der Leuzinzipper-Transkriptionsfaktor Activating Transcription Factor 6 alpha ( $ATF6\alpha$ ) und die Serin-/Threoninkinase PKR-like ER Kinase (PERK) [173, 423, 457]. Sie sind mit ihrer luminalen Seite an das zur 70 Kilodalton Heat Shock Protein Familie (Hsp70) gehörende Chaperon 78-kDa Glucose-

Regulated Protein (GRP78) gebunden, das bei Akkumulation ungefalteter Proteine abdissoziiert und somit die Aktivierung der Transmembranproteine ermöglicht [52].

### 1.2.1 PERK-Signalweg

Die Kinase PERK wird durch Oligomerisierung und Transphosphorylierung aktiviert und phosphoryliert dann ihrerseits den eukaryotischen Translations-Initiierungsfaktor 2 an der Alpha-Subeinheit ( $eIF2\alpha$ ). Durch die daraus resultierende Verhinderung der Bildung des 43S-Initiationskomplexes wird die Translationsrate und somit die Proteinlast im ER stark gesenkt [182]. Zusätzlich wird der Zellzyklus durch verminderte Translation des Cyclins D1 in der G1-Phase angehalten [69]. Die Translation bestimmter Proteine wie des Activating Transcription Factor 4 (ATF4) läuft unter diesen Bedingungen jedoch verstärkt ab [171]. ATF4 induziert die Transkription von für ER-Chaperone kodierenden Genen und Genen des Aminosäurestoffwechsels, der antioxidativen Stressantwort, der Autophagie und – bei langanhaltendem oder ausgeprägtem ER-Stress – der Apoptose [43, 172, 174, 287, 437]. Letzteres wird über die Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP Homologous Protein (CHOP) vermittelt [172].

Weiterhin phosphoryliert PERK den Transkriptionsfaktor NF-E2-Related Factor (NRF2), welcher die Expression von Genen der antioxidativen Stressantwort induziert und somit der unter ER-Stress verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entgegenwirkt [106].

### 1.2.2 ATF6-Signalweg

Wie PERK, so wird auch ATF6 $\alpha$  durch Dissoziation von GRP78 aktiviert. Hierbei wird die Golgi-Lokalisationssequenz freigelegt und ATF6 $\alpha$  wandert zum Golgi-Apparat, wo es durch Site-1- und Site-2-Proteasen (SIP1 und SIP2) gespalten wird [423]. Das dabei entstehende cytoplasmatische p50ATF6 besitzt eine Masse von 50 kDa und transloziert in den Nukleus, wo es gemeinsam mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor Nuclear Factor Y (NF-Y) an "ER Stress-Response-Element (ERSE)"-Sequenzen von DNA bindet. Diese ERSE-DNA-Motive sitzen in der Promotorregion von Genen, die für ER-Chaperone wie GRP78, Glucose-Regulated Protein 94 (GRP94) und Calreticulin kodieren. Deren Induktion erhöht wiederum die Faltungskapazität des ER [524]. Außer mit NF-Y interagiert ATF6 $\alpha$  noch mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren [15]. ATF6 $\alpha$  ist nicht nur an der adaptiven UPR, sondern auch an der Apoptoseinduktion durch CHOP-Hochregulation beteiligt [119]. Dimerisierung der Proteine ATF6 $\alpha$  und ATF6 $\beta$ ,

die durch paraloge Gene codiert werden, scheint eine inhibierende Wirkung auf die ATF6 $\alpha$ -vermittelte Geninduktion zu haben [455].

### 1.2.3 IRE1-Signalweg

Die Kinase/ Endoribonuklease IRE1 wird nach GRP78-Dissoziation durch Dimerisierung und Transphosphorylierung aktiviert [523]. Unterstützt wird dieser Prozess durch Co-Chaperone wie die Foldase Heat Shock Protein 47 (HSP47) [416]. Es existieren zwei Paraloge für IRE1. Das für IRE1 $\alpha$  kodierende Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1-Gen (*ERN1*) wird ubiquitär exprimiert, sein Knockout ist bei Mäusen bereits in der Embryonalphase letal. Im Gegensatz dazu ist die Präsenz von IRE1 $\beta$  auf Bronchialepithel und Gastrointestinaltrakt begrenzt, ein *Ern2*-Knockout verursacht bei den betroffenen Mäusen lediglich eine Kolitis [206, 299].

Aktiviertes IRE1 $\alpha$  spleißt mit seiner Endoribonuklease-Aktivität die unter ER-Stressbedingungen durch ATF6 verstärkt transkribierte mRNA des X-Box Binding Protein 1 (XBP1). Dieses unkonventionelle Splicing findet im Zytoplasma statt und ermöglicht eine schnelle Reaktion als Antwort auf Stressreize, da die mRNA bereits fertig synthetisiert vorliegt und nicht erst transkribiert werden muss. Die gespleißte mRNA codiert für den Leuzinzipper-Transkriptionsfaktor XBP1(s) [526]. XBP1(s) induziert die Transkription von Genen, die für folgende Proteine kodieren: Foldasen und ER-Chaperone wie GRP78, Proteine der Membranogenese und Lipidbiosynthese sowie Komponenten des ERAD. Zu Letzteren zählen ER Degradation-Enhancing  $\alpha$ -Mannosidase-Like Protein 1 (EDE1) sowie Derlin-2 (DERL2) und Derlin-3 (DERL3) [265, 345, 525]. Wie ATF6 interagiert auch XBP1(s) mit anderen Transkriptionsfaktoren [15].

Weiterhin baut IRE1 als Endoribonuklease gezielt mRNA ab, um damit die Translationsmaschinerie für Proteine der UPR freizumachen [194]. Im Gegensatz zur XBP1-Spaltung ist an diesem Regulated IRE1-Dependent Decay (RIDD) genannten Mechanismus verstärkt IRE1 $\beta$  beteiligt. Abgebaut wird mRNA, die eine bestimmte Konsensussequenz trägt. Diese mRNA codiert bevorzugt für Proteine, die im ER translatiert werden, ihr Abbau senkt somit die ER-Proteinlast und wirkt in der Regel protektiv. Allerdings kann RIDD auch proapoptotisch wirken, beispielsweise durch Spaltung der Proform der microRNA 17 (*MIR17*). *MIR17* verhindert normalerweise die Translation der Procaspase 2, Abbau der microRNA führt also zu vermehrter Caspase 2-Aktivität und zur intrinsischen Apoptose [304, 347, 465]. Weiterhin entfällt durch die

Degradation von *MIR17* auch deren hemmende Wirkung auf die mRNA des Thioredoxin Interacting Proteins (TXNIP), wodurch dieses das NOD-, LRR- and Pyrin Domain-Containing Protein 3-Inflammasom (NLRP3-Inflammasom) aktivieren kann. Infolgedessen wird eine sterile Entzündungsreaktion bis hin zur Pyroptose ausgelöst [49, 67, 270]. Darüber hinaus bewirkt RIDD eine Repression der Translation durch Abbau der 28S rRNA [205].

Auch an der Apoptoseinduktion im Rahmen der UPR ist der IRE1-Signalweg beteiligt. Einerseits kann XBP1(s) über ERSE-Sequenzen die Transkription des proapoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP induzieren, andererseits kann IRE1 $\alpha$  durch Komplexbildung mit TNF Receptor-Associated Factor 2 (TRAF2) und Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) über den c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalweg direkt den programmierten Zelltod auslösen [119, 337, 527].

#### 1.2.4 Apoptose durch CHOP

Wie bereits erwähnt, konvergieren die Signalwege der drei Sensormoleküle ATF6, IRE1 und PERK bei starkem oder lange anhaltendem ER-Stress in der Induktion des proapoptotischen Leuzinzipper-Transkriptionsfaktors CHOP. Dieser wird auch unter Nicht-Stress-Bedingungen auf einem sehr niedrigen Level exprimiert, unter ER-Stress vervielfacht sich die Expression jedoch [245].

Essentiell für die *CHOP*-Transkription ist die Aktivierung des PERK-ATF4-Signalweges. Hierbei bindet ATF4 an die Amino Acid Response Elements 1 oder 2 (*AARE1/AARE2*) im *CHOP*-Promotor [30]. Auch der ATF6- und IRE1 $\alpha$ -Signalweg können die Expression von *CHOP* induzieren, jedoch findet dies erst im späteren Verlauf der ER-Stressantwort und über die cis-Elemente *ERSE1* und *ERSE2* statt [119, 527]. Posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung an Serinresten durch p38-mitogenaktivierte Kinasen (p38 MAPK) verstärken die Aktivität von CHOP als Transkriptionsfaktor [482].

CHOP bewirkt eine p53-unabhängige vermehrte Transkription proapoptotischer Gene, wobei die genauen Gene je nach Zelllinie unterschiedlich sind: Hierzu gehören Bcl-2-Like Protein 11 (*BIM*), Death Receptor 5 (*DR5*) und p53-Upregulated Modulator of Apoptosis (*PUMA*) [371][385]. Gleichzeitig verringert CHOP die Expressionsrate antiapoptotischer Gene wie B-Cell Lymphoma-2 (*BCL2*) [306].

Als Heterodimer mit ATF4 induziert CHOP außerdem die Transkription des für die Pseudokinase Tribbles Homolog 3 (*TRB3*) kodierenden Genes. Bei leichtem bzw.

kurzzeitigem ER-Stress ist TRB3 rückkoppelnd ein negativer Regulator dieser beiden Aktivatoren. Im Falle von langanhaltendem ER-Stress ist TRB3 jedoch an der CHOP-vermittelten Apoptose beteiligt, in dem es die Serin-/Threoninkinase Proteinkinase B (PKB) bindet und deren Phosphorylierung und damit Aktivierung verhindert. Infolgedessen verliert PKB die hemmende Wirkung auf die proapoptotischen Mitglieder der B Cell Lymphoma 2 (BCL2)-Familie und die Zelle geht in die Apoptose [122, 346]. Weiterhin wirkt CHOP der adaptiven UPR entgegen und lenkt diese dadurch in Richtung Apoptose um: CHOP induziert die Transkription von Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34 (*GADD34*), einer Proteinphosphatase, die die PERK-vermittelte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  rückgängig macht und die Proteinlast im ER somit wieder erhöht. Die ebenfalls durch CHOP verstärkte Transkription des Genes, das für die an der Disulfidbrückenbildung beteiligten Oxidoreduktase Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 Alpha (ERO1 $\alpha$ ) codiert, entfaltet eine ambivalente Wirkung. Sie bewirkt zwar eine Zunahme der Faltungskapazität des ER, allerdings entstehen hierbei als Nebenprodukte proapoptotisch wirkende Sauerstoffradikale [297]. Verstärkt wird die ROS-Wirkung durch Depletion der zellulären Glutathionreserven durch selektive Glutathion-Spaltung. Verantwortlich hierfür ist die Glutathione-Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1 (*CHAC1*). *CHAC1* gehört ebenfalls zu den von CHOP induzierten Genen [254].

Außer am programmierten Zelltod ist CHOP auch an inflammatorischen Signalwegen beteiligt. So induziert ER-Stress in murinen Peritonealmakrophagen Chop-vermittelt die Transkription und Translation der Caspase 11, dem murinen Homolog der humanen Caspasen 4 und 5. Diese rekrutiert und aktiviert proteolytisch Procaspase 1, welche wiederum die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und Interleukin-18 (IL-18) schneidet und dadurch aktiviert [130]. Zudem löst Caspase 11 durch Proteolyse des porenbildenden Gasdermins die Pyroptose aus [116, 340]. Hattori et al. konnten 2003 zeigen, dass CHOP auch an der Interleukin-6-Expression (IL-6) beteiligt ist, indem es Heterodimere mit Inhibitoren der IL-6-Transkription bildet und diese somit abfängt [177].

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die ER-Stressantwort.

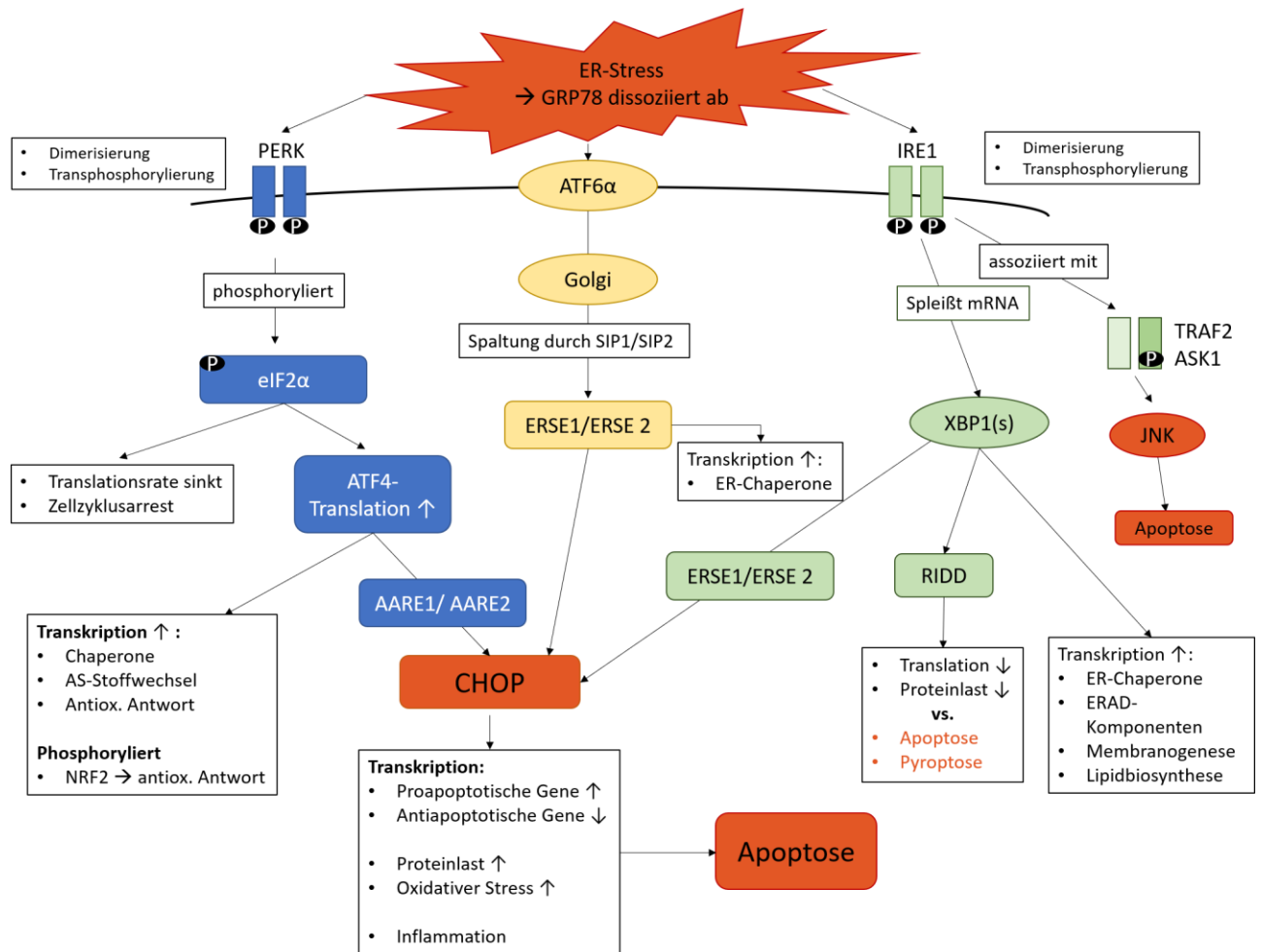


Abbildung 5 (eigene Abbildung): Die ER-Stressantwort

Abkürzungen: AARE= Amino Acid Response Element, antioxid.= antioxidativ, AS= Aminosäure, ASK1=Apoptotic Signal-Regulating Kinase 1, ATF4= Activating Transcription Factor 4, ATF6α= Activating Transcription Factor 6 alpha, CHOP= C/EBP Homologous Protein, eIF2α= Alpha-Subeinheit des eukaryotischer Transkriptionsfaktor 2, ERAD= Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation, ERSE1/2 = ER Stress Response Element 1/2, GRP78= 78-kDa Glucose-Regulated Protein, IRE1= Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha, JNK=c-Jun N-terminale Kinase, NRF2=NF-E2-Related Factor, □= Phosphorylierung, PERK= PKR-Like ER Kinase, RIDD= Regulated IRE1-Dependent Decay, SIP1/2= Site-1/ Site-2-Protease, TRAF2= TNF Receptor-Associated Factor 2, XBP1(s)= gespleißte Form des X-Box Binding Protein 1

## 1.2.5 ERAD

Terminal missgefaltete Proteine im ER werden durch das ERAD-System abgebaut.

Wie genau diese Proteine von der ERAD-Maschinerie erkannt werden, ist bisher erst teilweise erforscht. Bestandteile des E3-Ligase-Komplexes in der Membran des endoplasmatischen Retikulums scheinen jedoch als Sensoren daran beteiligt zu sein [396, 438].

Über den Mechanismus bei n-glykosylierten Glykoproteinen ist etwas mehr bekannt: Deren  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Kern wird beim Eintritt in das ER-Lumen durch die ER-Glucosidasen I und II gekürzt, sodass ein monoglucosyliertes Glykoprotein entsteht. Dieses wird durch die Lektin-Chaperone Calnexin (CNX) und Calreticulin gebunden, die gemeinsam mit anderen Chaperonen bei der Faltung assistieren [251]. Fertig gefaltete

Proteine werden nach Entfernung des terminalen Glucoserestes durch die Glucosidase II in den Golgi-Apparat weitergeleitet, während inkomplett gefaltete Proteine durch die UDP-Glucose/Glycoprotein Glucosyl Transferase reglucosyliert werden [251, 351].

N-glykosylierte Glykoproteine, die sehr lange zur Faltung benötigen, werden dem Calnexin/ Calreticulin-Zyklus des ER-Lumens dagegen durch Trimmen des Mannoserestes entzogen. Dieses Trimmen erfolgt durch ER-Mannosidase 1 (EDEM1), EDEM3 oder Mannosidase Alpha Class 1C Member 1 [198, 350, 351]. Im Anschluss werden die gekürzten Glykoproteine durch Lektine, zu denen auch EDEM1 gehört, erkannt und über einen Translokationskomplex ins Cytosol geschleust. Nach Ubiquitinierung werden sie hier schließlich durch das 26S-Proteasom abgebaut [330]. Gene des ERAD werden sowohl durch ATF6 als auch durch XBP1(s) induziert [4, 15].

### 1.3 Idiopathische pulmonale Fibrose

Die idiopathische pulmonale Fibrose gehört zur Gruppe der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP), einer Gruppe von Lungenkrankheiten, deren jeweilige Ursache noch nicht bekannt ist. Alle IIP betreffen hauptsächlich das pulmonale Interstitium, den Bereich zwischen epithelialer und endothelialer Basalmembran, und gehen mit einer für das jeweilige Krankheitsbild spezifischen Mischung aus Inflammation und Fibrose einher [28]. Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die IIP.

<b>Idiopathische interstitielle Pneumonien</b>	
<b>IPF</b>	<b>Seltenere IIP</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute interstitielle Pneumonie</li> <li>• Desquamative interstitielle Pneumonie</li> <li>• Lymphogene interstitielle Pneumonie</li> <li>• Kryptogen organisierende Pneumonie</li> <li>• Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie</li> <li>• Respiratorische Bronchiolitis mit begleitender interstitieller Lungenbeteiligung</li> </ul>

Abbildung 6: Idiopathische interstitielle Pneumonien

**Abkürzungen:** IPF= Idiopathische pulmonale Fibrose, IIP= Idiopathische interstitielle Pneumonie

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine auf die Lunge begrenzte chronisch-progressive fibrosierende interstitielle Pneumonie unbekannter Ursache, die histopathologisch und/ oder radiologisch mit einem Usual Interstitial Pneumonia- Muster (UIP-Muster) einhergeht. Klinisch ist die hauptsächlich ältere Menschen betreffende

Erkrankung durch zunehmende Atemnot, trockenen Husten und Verschlechterung der Lungenfunktion gekennzeichnet. Ihre Prognose ist mit einer medianen Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren nach Diagnosestellung sehr schlecht, insbesondere bei Rauchern, älteren Patienten und Patienten männlichen Geschlechts [275] [372].

Die IPF ist zwar die häufigste unter den interstitiellen Lungenerkrankungen, absolut gesehen mit einer Inzidenz von 0.7 (Taiwan) - 63 (USA) pro 100.000 Einwohner jedoch eine seltene Erkrankung [275]. Mit zunehmendem Alter nimmt die Inzidenz zu, das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 66 Jahre, wobei die Diagnose selten vor dem 50. Lebensjahr gestellt wird [154, 238].

Ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung der IPF ist langjähriges Rauchen, insbesondere bei Patienten mit kumulativ mehr als 20 Pack Years. Weiterhin gehen höheres Alter und, mit einem Anteil von 70% der Erkrankten, männliches Geschlecht mit einem erhöhten IPF-Risiko einher. Umwelteinflüsse wie die Exposition gegenüber Metall- und Holzstaub sowie die Tätigkeit in Landwirtschaft oder Viehhaltung sind, ebenso wie die Erkrankung an Diabetes mellitus, pulmonaler Hypertonie und obstruktiver Schlafapnoe, ebenfalls mit IPF assoziiert [372, 533]. Als endogener Risikofaktor für die Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose gilt gastroösophagealer Reflux (GERD) [374]. Darüber hinaus sind virale Infektionen mit IPF assoziiert. So konnten Sheng et al. in einer Meta-Analyse zeigen, dass Infektionen mit den humanen Herpesviren 7 und 8 (HHV-7, HHV-8) sowie dem Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus (EBV) mit einem erhöhten IPF-Risiko einhergehen [424].

Bis zu 20% der IPF-Fälle treten familiär gehäuft auf, womit die IPF die häufigste Form der familiären idiopathischen interstitiellen Pneumonien (FIP) darstellt [146]. Für diese familiäre Krankheitsform sind über 60 unterschiedliche Genmutationen im Surfactantprotein C (SP-C)-Gen (*SFTPC*) und einzelne im Surfactantprotein A2-Gen (SP-A2, *SFTPA2*) bekannt, welche jedoch alle sehr selten sind. In 8-15% der FIP-Fälle, und damit deutlich häufiger, finden sich Mutationen in den für Bestandteile des Telomerase- oder Shelterinkomplexes kodierenden Genen [245].

Klinisch präsentieren sich IPF-Patienten meist mit recht unspezifischen Symptomen, wodurch die Zeit zwischen Symptombeginn und Diagnosestellung im Median 2,2 Jahre beträgt [154]. Typisch sind trockener Husten und zunehmende Belastungsdyspnoe. In 50-70% der Fälle kommen Trommelschlegelfinger und/oder Uhrglasnägel hinzu, bei 98% der Patienten lässt sich bibasilares Knisterrasseln (Sklerosiphonie) auskultieren [165, 372].

Der Krankheitsverlauf ist individuell sehr unterschiedlich und kann durch einen chronisch progredienten Lungenfunktionsverlust oder aber durch plötzliche Verschlechterung im Rahmen akuter Exazerbationen gekennzeichnet sein. Diese gehen mit diffusem Alveolarschaden, akuter Verschlechterung von Dyspnoe und trockenem Husten sowie neuem Auftreten von bilateralen Milchglasstrübungen in der hochauflösenden Computertomographie (HRCT) einher. In etwa 40% der Fälle enden akute Exazerbationen tödlich [372, 411, 434].

Zu den häufigsten Komorbiditäten der IPF zählen obstruktive Schlafapnoe, Bronchialkarzinom, pulmonale Hypertonie, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), GERD, Diabetes, vaskuläre Erkrankungen und koronare Herzkrankheit [154].

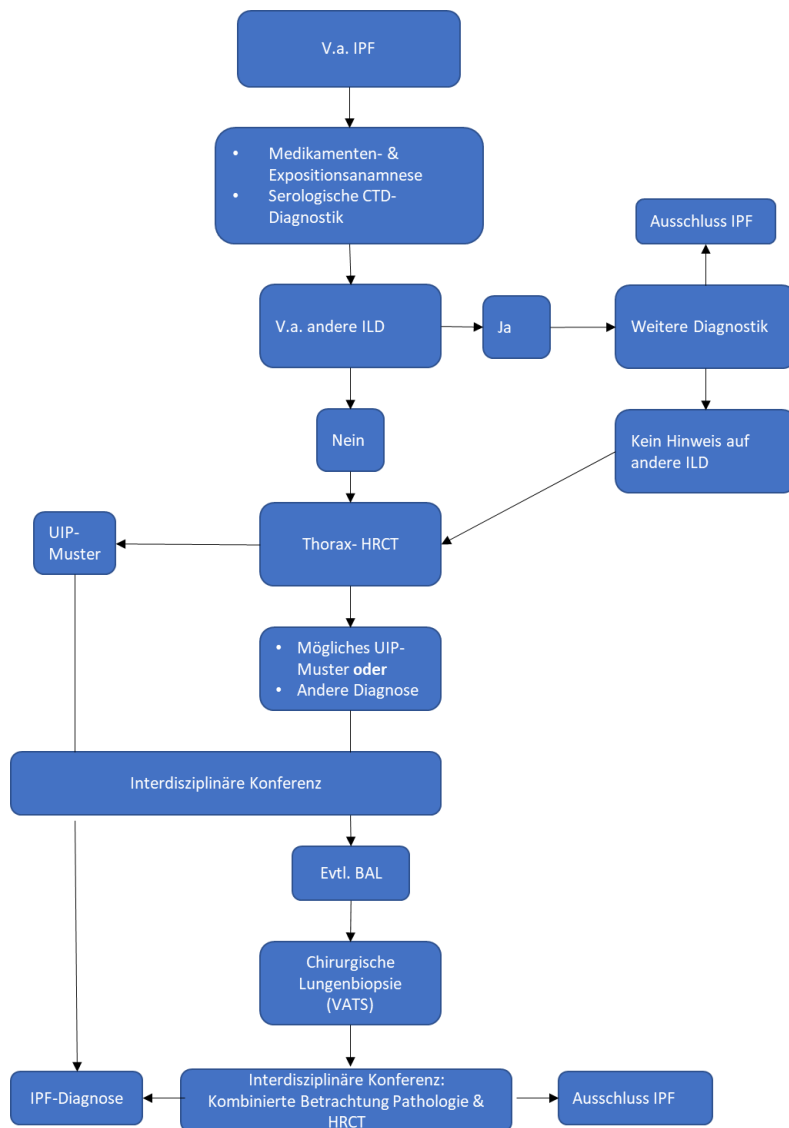


Abbildung 7 (eigene Abbildung nach [373]): Diagnoseschema IPF

**Abkürzungen:** BAL= Bronchiallavage, CTD= Connective Tissue Disease (Kollagenosen & rheumatische Erkrankungen), HRCT= Hochauflösende Computertomographie, ILD= Interstitielle Lungenerkrankung, IPF= Idiopathische pulmonale Fibrose, UIP= Usual Interstitial Pneumonia, V.a.= Verdacht auf, VATS= Videoassistierte Thorakoskopie

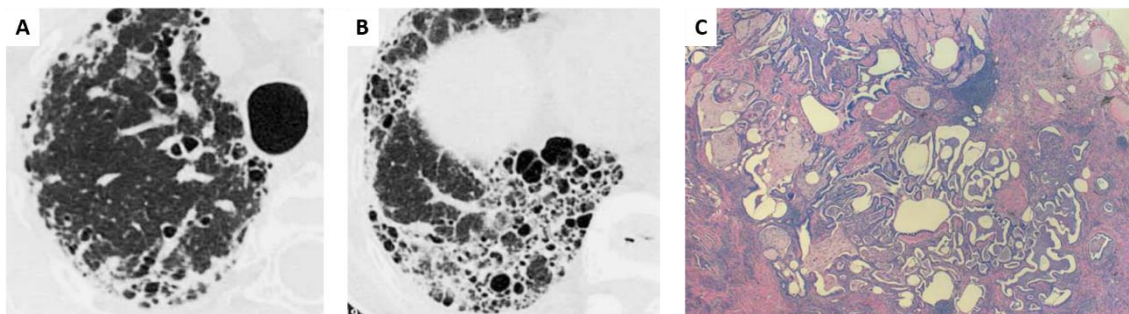
Abbildung 7 gibt einen Überblick über das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf IPF, wie es in der Leitlinie von Raghu et al. von 2018 empfohlen und im Folgenden genauer ausgeführt wird [373]: Die Diagnose IPF kann hiernach gestellt werden, wenn andere Ursachen interstitieller Lungenerkrankungen ausgeschlossen wurden und ein eindeutiges Usual Interstitial Pneumonia- Muster (UIP-Muster) entweder in der hochauflösenden Computertomographie (HRCT) oder in einer chirurgischen Biopsie vorliegt. Auch die Kombination aus wahrscheinlichem UIP-Muster sowohl in der HRCT als auch in der chirurgischen Biopsie ist ausreichend für die Diagnose IPF. Zum Ausschluss anderer interstitieller Lungenerkrankungen (ILD) dienen die Medikamenten- und Expositionsanamnese sowie die serologische Diagnostik. Hierdurch sollen rheumatische Erkrankungen bzw. Kollagenosen (CTD), die ebenfalls mit fibrotischen Veränderungen der Lunge assoziiert sein können, ausgeschlossen werden.

Das für die IPF pathognomonische UIP-Muster (Abb. 8) ist im HRCT durch subpleural und basal betontes sogenanntes Honeycombing gekennzeichnet. Bei den „Honigwaben“ handelt es sich um zystisch erweiterte terminale Luftwege mit durchschnittlich 3-10 mm Größe und klarer Begrenzung. Sie sind räumlich assoziiert mit Traktionsbronchiektasien/Traktionsbronchiolektasien. Reine Milchglastrübungen sind untypisch für die IPF, in geringer Ausprägung und in Kombination mit einer feinretikulären Zeichnungsvermehrung als Korrelat der Fibrose jedoch mit einem UIP-Muster vereinbar. Neue stärker ausgeprägte Milchglastrübungen bei Patienten mit bekannter IPF sprechen für eine akute Exazerbation. Ein definitives UIP-Muster wird bei Vorliegen aller genannter Charakteristika diagnostiziert, auf eine Lungenbiopsie kann dann verzichtet werden. Fehlen nur die Honigwaben, spricht man von einem wahrscheinlichen UIP-Muster. In diesem Fall, genau wie bei einem unklaren Befund, sollte eine chirurgische Lungenbiopsie (als videoassistierte Thorakoskopie (VATS)) und eventuell eine Bronchiallavage (BAL) durchgeführt werden [373].

Im bioptischen Befund ist das UIP-Muster (Abb. 8) durch eine unregelmäßig verteilte Fibrosierung der Lunge charakterisiert. Befallen sind insbesondere subpleurale und paraseptale Bereiche, wo zystisch vergrößerte Bronchioli als Honigwaben imponieren, sowie die Peripherie der Acini und Lobuli. Typisch ist auch die räumliche und zeitliche Heterogenität der Läsionen mit fleckförmig verteilten und die normale Lungenarchitektur zerstörenden Fibroblasten-Foci. Diese zeichnen sich durch Ablagerungen dichten azellulären Kollagens sowie Einwanderung von (Myo-) Fibroblasten aus und wechseln

sich mit Bereichen milder interstitieller Inflammation und normalem Lungengewebe ab. Die interstitielle Inflammation ist durch Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen in die Alveolarsepten sowie Hyperplasie der Typ II-Zellen gekennzeichnet, während sich im Bereich der Honigwaben Bronchialepithel und oft Muzinablagerungen finden. Hyperplasie glatter Muskelzellen fällt sowohl in den Honigwaben als auch in fibrotischen Arealen auf.

Die Diagnose eines definitiven UIP-Muster erfordert fleckförmige Fibrose mit oder ohne Honigwaben, Zerstörung der Lungenarchitektur und Abwechslung der Fibrose mit weniger stark befallenem Parenchym.



**Abbildung 8** ([28, 45], modifiziert): UIP-Muster mit Honeycombing im HRCT (A und B) und in der Biopsie (C)

Die Aussagekraft der zellulären BAL-Analyse in der IPF-Diagnostik ist begrenzt und dient vor allem der Abgrenzung gegenüber anderen interstitiellen Lungenerkrankungen. Typisch sind eine leichte Erhöhung des Eosinophilen-Anteils, eine gering ausgeprägte Lymphozytose und ein etwas erhöhtes CD4/CD8-Verhältnis [28, 373].

Die fortschreitende IPF geht mit zunehmendem Verlust an totaler Lungenvolumenkapazität, forcierter Vitalkapazität und forcierter Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) einher. Auch wenn die Ausgangsdaten keine Vorhersage für das Überleben des Patienten ermöglichen, sind doch die 12 Monats-Verlaufparameter sehr verlässliche Prädiktoren der Mortalität [94]. Weiterhin nehmen im Laufe der Erkrankung die Diffusionskapazität der Lunge ( $D_{LCO}$ ) sowie die auf das Alveolarvolumen bezogene Diffusionskapazität ( $D_{LCO}/VA$ ) ab [165]. Zur Objektivierung der Belastbarkeit des Patienten sowie zur Prognoseabschätzung wird der 6 Minuten-Gehtest angewandt [123].

Eine kausale Therapie der idiopathischen Lungenfibrose existiert zurzeit nicht. Es stehen jedoch zwei antifibrotisch wirksame und die Krankheitsprogression verlangsamernde Medikamente zur Verfügung: Pirfenidon und Nintedanib.

Der genaue molekulare Wirkmechanismus von Pirfenidon ist unbekannt. Es wirkt antifibrotisch, indem es sowohl die Fibroblastenproliferation als auch Transkription und Freisetzung des profibrotischen Zytokins Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sowie

die Kollagensynthese hemmt. Zudem entfaltet Pirfenidon über die translatorische Hemmung der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL-6 sowie die vermehrte Transkription des IL-10-Gens eine antiinflammatorische Wirkung [207, 208, 332]. In den klinischen CAPACITY-Studien verlängerte Pirfenidon die progressionsfreie Überlebenszeit und verringerte den Verlust an forcierter Vitalkapazität (FVC) und Gehstrecke im 6-Minuten-Gehtest [339].

Nintedanib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der dosisabhängig die Rezeptortyrosinkinasen Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor (VEGFR), Platelet Derived Growth Factor-Rezeptor (PDGFR) und Fibroblast Growth Factor-Rezeptor (FGFR) hemmt. Im Mausmodell der Lungenfibrose konnte gezeigt werden, dass dadurch Proliferation, Migration und Kollagensynthese der Fibroblasten eingeschränkt werden [498]. In klinischen Phase III-Studien konnte Nintedanib den FVC-Verlust im Laufe eines Jahres im Vergleich zu Placebo signifikant verringern, die Häufigkeit akuter Exazerbationen senken und die subjektive Symptomatik verbessern [388].

Zusätzlich zur antifibrotischen Medikation empfiehlt die American Thoracic Society (ATS), IPF-Patienten mit Antazida zu behandeln, da GERD einen mit IPF assoziierten Risikofaktor darstellt [372].

Zur nichtmedikamentösen Therapie bei IPF zählen die Langzeit-Sauerstofftherapie bei Ruhe-Hypoxämie sowie Rauchentwöhnung und pneumologische Rehabilitation. Geeignete Patienten sollten zudem frühzeitig an ein Transplantationszentrum angebunden werden, da die Lungentransplantation derzeit die einzige kurative Therapie der IPF darstellt [372].

#### 1.4 Pathogenese der IPF

Die genaue Pathogenese der IPF ist momentan noch unbekannt. Nachdem sie lange als eine inflammatorische Krankheit galt, geht die aktuelle Theorie davon aus, dass die Fibrose im Rahmen der IPF durch aberrante Wundheilung bei repetitiven Mikroverletzungen des Alveolarepithels auf der Basis einer erhöhten Suszeptibilität entsteht. Bedeutsam ist hierbei insbesondere die Apoptose der als Progenitorzellen geltenden Typ-II-Zellen und ihr Ersatz durch fibrotisches Gewebe [238].

Für diese erhöhte Anfälligkeit gegenüber schädigenden Einflüssen sind mehrere Ursachen bekannt, deren Gemeinsamkeit die Beeinträchtigung der normalen Funktion des Alveolarepithels ist [499].

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erläutert, sind zu verkürzten Telomeren führende Mutationen in für Komponenten des Telomerase- und Shelterinkomplexes kodierenden Genen in etwa 8-15% der familiären und 1-3% der sporadischen IPF-Fälle nachweisbar [23]. Im Vergleich zu gleich alten gesunden Menschen verkürzte Telomere lassen sich in IPF-Patienten unabhängig vom Mutationsstatus sowohl in peripheren Leukozyten als auch im Alveolarepithel nachweisen [12]. Kritisch kurze Telomere führen zur Induktion von replikativer Seneszenz und Apoptose [59, 537]. Untersucht man Typ-II-Alveolarepithelzellen aus IPF-Lungen, so fällt auf, dass vieler dieser Zellen im Gegensatz zu gesunden Kontrollen seneszent beziehungsweise apoptotisch sind [38, 117]. Da Typ-II-Zellen Progenitorzellen sind, resultiert hieraus eine verminderte Regenerationsfähigkeit des Alveolarepithels [39].

Für die familiäre interstitielle Pneumonie (FIP), deren häufigste Unterform die IPF ist, wurden zudem unterschiedliche Mutationen in den Surfactant-Genen *SFTPA2* und *SFTPC* beschrieben, die zur Entstehung verkürzter oder fehlgefalteter Surfactantproteine und dadurch zur Induktion einer ER-Stress-Antwort in den surfactantproduzierenden Typ-II-Zellen führen. Dies betrifft etwa 3% der adulten FIP-Fälle [145].

SP-C ist ein sehr hydrophobes Protein, das der Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen dient und ausschließlich von Typ-II-Pneumozyten synthetisiert wird [497]. Es wird als 21 kDa-Proprotein synthetisiert und durchläuft den sekretorischen Weg, wobei es durch die Proteasen Napsin A, Pepsinogen C und Cathepsin H gespalten wird. Gemeinsam mit den anderen Surfactantbestandteilen wird das mature 4,2 kDa-SP-C in den Lamellenkörperchen gespeichert und schließlich in den Alveolarraum freigesetzt [66, 245, 250]. Von den über 60 bekannten ILD-assoziierten *SFTPC*-Mutationen (alle heterozygot) liegen viele in der für die BRICHOS-Domäne des Proproteins kodierenden Region [245].

Ein Beispiel hierfür ist die Substitutionsmutation L188Q, bei der ein tertiärstrukturelevanter Leucin- durch einen Glutaminrest ersetzt wird. Diese Genmutation wurde in Patienten mit nicht-spezifischer interstitieller Pneumonie (NSIP) und IPF nachgewiesen und stört die SP-C-Reifung [454]. *In-vitro*-Expression des L188Q-SP-C führt zur Bildung von Proprotein-Aggregaten in ER und Cytosol, XBP1-Splicing, Beeinträchtigung der Proteasom-Funktion und vermehrter Apoptose [324]. Zudem durchlaufen L188Q-exprimierende Zellen *in vitro* eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und synthetisieren vermehrt mesenchymale Proteine wie Vimentin [451]. Auch *in vivo* lässt sich durch *L188Q-Sftpc*-Expression in transgenen Mäusen ER-

Stress provozieren, dennoch entwickeln diese Mäuse keine spontane Lungenfibrose. Auf einen „Second Hit“ mit intratracheal instilliertem Bleomycin reagieren sie jedoch mit deutlich stärkerer Fibroseentwicklung als Wildtyp-Mäuse [263]. Diese Beobachtung könnte erklären, warum dieselbe Genmutation im Menschen – je nach Art des „Second Hits“ - unterschiedliche schwere interstitielle Lungenerkrankungen auslösen kann [245]. Ein weiteres Beispiel für eine *SFTPC*-Mutation, die in IPF-Patienten nachgewiesen werden konnte, ist die Substitutionsmutation G100S, bei der in der BRICHOS Domäne des SP-C-Proteins das Glycin durch Serin ersetzt wird. Auch hier führt die *in vitro*-Expression dieser *SFTPC*-Variante in A549-Zellen zu gesteigerter Synthese der ER-Stressmarker GRP78 und XBP1 sowie zu vermehrter Apoptose [352].

SP-A ist ein hydrophiles Surfactantprotein, dessen Isoformen SP-A1 und SP-A2 an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. SP-A bildet bouquetartige Oligomere, die als Kollektine Pathogene opsonieren [502]. Für die Herabsetzung der pulmonalen Oberflächenspannung ist es jedoch nicht essentiell [247]. Wang et al. konnten in Stammbaumanalysen nachweisen, dass die SP-A2-Missense-Mutationen G231V (Austausch von Glycin durch Valin) und F198S (Austausch von Phenylalanin durch Serin) mit der Entstehung familiärer idiopathischer Lungenfibrose assoziiert sind [484]. *In vitro* werden die Proteinvarianten nicht ins Medium sezerniert, sondern im ER retiniert und proteasomal abgebaut. Dies geht mit einer erhöhten Menge an GRP78 und gespleißtem XBP1 einher, was auf zellulären ER-Stress schließen lässt [292]. Liu et al. konnten 2020 in einer chinesischen Familie mit familiärer IPF erstmal die Substitutionsmutation c.619A nachweisen, die zum Austausch von Asparagin durch Tyrosin führt. Bei Expression dieser *SFTPA2*-Variante in A549-Zellen konnten per Western Blot erhöhte Level an Caspase-3 sowie CHOP nachgewiesen werden. Auch hier kann folglich von einer genmutationsbedingten Auslösung von ER-Stress und Apoptose ausgegangen werden [282].

Surfactant besteht nur zu 10% aus Surfactantproteinen, die restlichen 90% sind Lipide, insbesondere Phospholipide. Gemeinsam mit den Surfactantproteinen werden diese Lipide vor der Freisetzung in den Alveolarraum in lysosomenähnlichen Lamellenkörperchen in den alveolären Typ II-Zellen gespeichert [44]. Adenosine Triphosphate (ATP) Binding Cassette Subfamily A Member 3 (ABCA3) ist ein ATP-abhängiger Lipidtransporter, der sich in der äußeren Wand der Lamellenkörperchen befindet und für den Transport der Surfactantlipide über die Lamellenkörperchenmembran zuständig ist. Außerdem ist ABCA3 für die Biogenese der

Lamellenkörperchen essentiell [86]. Es sind über 200 *ABCA3*-Mutationen bekannt, die mit interstitiellen Lungenerkrankungen unterschiedlichen Schweregrades einhergehen. Diese reichen von bereits unmittelbar postnatal letal endender Surfactantdefizienz bis hin zur erst im höheren Erwachsenenalter auftretenden IPF [44, 72, 93, 429]. In den Lungen pädiatrischer Patienten mit *ABCA3*-Mutation und ILD konnte eine robuste Expression von proSP-B nachgewiesen werden, wobei die Menge an maturem SP-B jedoch stark reduziert war. Dies könnte ein Hinweis auf eine Prozessierungsstörung durch die *ABCA3*-Mutation sein. Hierfür spricht insbesondere, dass *ABCA3*-Mutationen mit gestörter Bildung von Lamellenkörperchen, dem Ort der letzten Prozessierungsschritte des maturen SP-B, einhergehen. Korfei et al. vermuten, dass proSP-B bei *ABCA3*-Mutationen akkumuliert & ER-Stress auslöst, hierzu fehlen jedoch noch Daten [72, 245].

Wie bereits erwähnt, lassen sich die beschriebenen Pathogenitätsmechanismen teilweise auch in sporadischen IPF-Fällen nachvollziehen. So weisen bis zu 97% der Patienten mit sporadischer IPF verkürzte Telomere auf [12].

Zudem ist proapoptotischer ER-Stress auch in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF beobachtbar. ER-Stressmarker sind im Vergleich zu Spenderlungen sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene erhöht und koloalisieren in der Immunhistochemie mit Typ-II-Zellmarkern [246]. Als Ursachen kommen prinzipiell die gleichen Mechanismen wie in den genetisch definierten Formen der IPF in Frage, so lassen sich beispielsweise Störungen der Surfactantprozessierung mit pathologischer intrazellulärer Akkumulation von proSP-B auch in sporadischen Fällen nachweisen [12, 288]. Weitere mögliche Ursachen sind Proteinoxidation durch den in IPF-Lungen verstärkt nachweisbaren oxidativen Stress und Überlastung der Faltungsmaschinerie durch ebenfalls mit der IPF-Entstehung assoziierte bakterielle oder virale Infektionen [269, 317, 424].

Während der zur IPF-Pathogenese beitragende ER-Stress in Typ-II-Zellen proapoptotisch ist und somit zum Verlust dieser Progenitorzellen beiträgt, spielt die UPR in Fibroblasten eine protektive Rolle. IPF-Fibroblasten sind durch TGF- $\beta$ -vermittelte Umwandlung in Myofibroblasten, vermehrte Produktion extrazellulärer Matrix und Apoptoseresistenz gekennzeichnet [245]. Die in TGF- $\beta$ -behandelten humanen Fibroblasten *in vitro* nachweisbare adaptive ER-Stressantwort dient vermutlich dazu, dem gesteigerten Proteinumsatz zu begegnen und trägt somit zur Fibroseentstehung und Apoptoseresistenz der Fibroblasten bei [31].

Außer mit ER-Stress und mit verkürzten Telomeren ist die IPF in etwa einem Drittel der Fälle mit einem Polymorphismus im Muzin B (*MUC5B*)-Promotor assoziiert. Dieser ist damit der stärkste bekannte genetische Einflussfaktor auf die IPF-Entstehung [41, 540]. Inwiefern er zu einer erhöhten Vulnerabilität des Alveolarepithels beiträgt, ist jedoch noch ungeklärt. Mögliche Mechanismen sind eine durch die Überexpression der Muzin B-Variante verursachte Mukus-Hypersekretion mit behinderter mukoziliärer Clearance von Pathogenen, die Auslösung der ER-Stressantwort durch die vermehrte Muzinproduktion und direkte Zytotoxizität des Muzins [387].

Die *SFTPC*-Mutation I173T (Substitution von Isoleucin durch Threonin) wurde von van Moorsel et al. erstmals in einer Kohorte niederländischer IPF-Patienten beschrieben [467]. Expression dieser *Sftpc*-Variante im Mausmodell führt zur spontanen Entwicklung pulmonaler Fibrose [343]. Wie bereits erwähnt, ziehen dagegen weder Telomerverkürzung noch die Expression der IPF-assoziierten *Sftpc*-Variante *L188Q-Sftpc* im Mausmodell eine spontane Fibroseentwicklung nach sich [263, 266].

Für die IPF-typische aberrante Wundheilung mit übermäßiger Matrixdeposition und daraus folgender Fibrosierung sind demzufolge weitere Faktoren nötig, die das Alveolarepithel zusätzlich schädigen und damit dessen Kompensationsfähigkeit überfordern. Als solche „Second Hits“, die im Mausmodell meist durch Bleomycin oder Virusinfektionen simuliert werden, kommen prinzipiell alle mit der IPF-Entstehung assoziierten Risikofaktoren in Frage. Hierzu zählen beispielsweise das Rauchen, Herpesvirusinfektionen, Holzstaub und gastroösophagealer Reflux [372, 499].

Unabhängig von der Ursache der epithelialen Schädigung zeigt sich bei der IPF ein charakteristischer gestörter Reparaturprozess, der durch vermehrte Myofibroblastenaktivität bei gleichzeitig verstärkter Aktivierung profibrotischer Signalwege im hyperplastischen Alveolarepithel gekennzeichnet ist [238].

In verletzten Geweben werden im Rahmen des normalen Heilungsprozesses Fibroblasten aktiviert. Sie differenzieren sich zu Myofibroblasten, die vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM) wie Kollagen I ablagern und zusätzlich durch ihre Kontraktionsfähigkeit dazu beitragen, die Wunde zu verkleinern [144, 241]. Während die Myofibroblasten nach Abschluss der physiologischen Wundheilung kontrolliert in die Apoptose gehen, zeichnen sich IPF-Myofibroblasten durch eine ausgeprägte Apoptoseresistenz aus [113, 291].

Der Ursprung dieser pathogenetisch bedeutsamen Zellen in der IPF ist erst unvollständig aufgeklärt. Momentan geht man davon aus, dass die Myofibroblasten teilweise durch

Differenzierung aus ortsständigen Fibroblasten und teilweise aus zirkulierenden Fibrozyten entstehen [19, 311, 499]. Es wird kontrovers diskutiert, ob und in welchem Ausmaß auch epithelial-mesenchymale Transition von Typ-II-Zellen zur Population der Myofibroblasten beiträgt [232, 389]. Im Folgenden soll auf die erwähnten Mechanismen genauer eingegangen werden.

Die epithelial-mesenchymale Transition ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre Polarität und ihre Tight Junctions verlieren, zunehmend mobil werden und vermehrt mesenchymale Proteine wie Alpha Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) synthetisieren, während die Syntheserate epithelialer Proteine wie E-Cadherin abnimmt [499]. In IPF-Lungen lassen sich Zellen nachweisen, die sowohl das für Typ-II-Zellen typische SP-C als auch mesenchymale Proteine wie  $\alpha$ -SMA und Calponin produzieren [298]. Inwieweit diese Zellen durch EMT entstehen, ist jedoch unklar. Die hierzu vorliegenden Daten aus *Lineage Tracing*-Experimenten in murinen Fibrosemodellen sind widersprüchlich. Sie reichen vom Nachweis einer robusten EMT im Rahmen der TGF- $\beta$ -induzierten Fibrose bis hin zur völlig fehlenden Umwandlung epithelialer in mesenchymale Zellen im Bleomycin-Fibrosemodell [232, 389].

Die zweite Möglichkeit zur Vermehrung der IPF-Fibroblasten besteht in der Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten durch alveoläre Epithelzellen. Das Alveolarepithel von IPF-Patienten exprimiert die Chemokin-Liganden C-C Motiv Chemokin 2 (CCL2) und C-X-C Motiv Chemokin 12 (CXCL12), deren Rezeptoren sich auf zirkulierenden Fibrozyten finden. Fibrozyten sind mesenchymale Vorläuferzellen, die selbst EZM produzieren oder sich weiter zu Fibroblasten und Myofibroblasten differenzieren können [19, 311].

Einen dritten Ursprungsort für die IPF-Myofibroblasten stellen ortsständige Fibroblasten der Lunge dar. Diese können sich beispielsweise unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  zu Myofibroblasten differenzieren und dann weitaus größere Mengen EZM sezernieren als gewöhnliche Fibroblasten [499].

IPF-Fibroblasten sind sehr beständige Zellen, die *in vitro* stark proliferieren [336]. Zudem sind sie gegenüber der im Rahmen der physiologischen Wundheilung stattfindenden Fas-Liganden-vermittelten Apoptose deutlich resistenter als Kontrollfibroblasten. Diese Apoptoseresistenz bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate des Alveolarepithels wird als Apoptoseparadox der IPF bezeichnet [291, 499].

Während (Myo-) Fibroblasten die Fibrosierung durch Matrixproduktion vorantreiben, geht die aktuelle Theorie davon aus, dass der Anstoß des Fibroseprozesses durch geschädigtes Alveolarepithel erfolgt [412]. Aktivierte IPF-Epithelzellen sind die

Hauptquelle für Mediatoren, die Fibroblastenmigration, -proliferation und -aktivierung sowie verstärkte EZM-Produktion bewirken können. Hierzu gehören beispielsweise PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und Endothelin 1 [412].

Weitere profibrotische Wirkung übt das Alveolarepithel durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade aus, die auf verletztem Epithel durch den Komplex aus Faktor III und Tissue Factor ausgelöst wird [238]. Die sich im Zuge der Gerinnung bildende provisorische Matrix aus Fibronectin und Fibrin ist *in vitro* in der Lage, die EMT zu stimulieren [232]. Weiterhin lässt sich in IPF-Lungen eine lokal verstärkte Expression von Faktor-X-mRNA (*F10*) im Alveolarepithel nachweisen [409]. *In vitro* sind sowohl F10 als auch Thrombin in der Lage, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten auszulösen [61, 409]. Zudem sezerniert das Alveolarepithel von IPF-Lungen im Gegensatz zu gesunden Probanden Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI1), einen Inhibitor der Fibrinolyse und des Matrixabbaus, sodass insgesamt ein profibrotisches Mikromilieu entsteht [249].

Abbildung 9 gibt einen Überblick über die beschriebenen Pathomechanismen, die nach aktuellem Wissensstand einen Einfluss auf die Entstehung der IPF haben. Die Zusammenhänge zwischen verkürzten Telomeren und ER-Stress sowie zwischen durch *SFTPC*-Mutationen verursachte erhöhte Oberflächenspannung und Fibroseentwicklung werden in den Kapiteln 5.1 und 5.2 im Rahmen der Diskussion beleuchtet und sind hier der Vollständigkeit halber bereits mit aufgeführt.

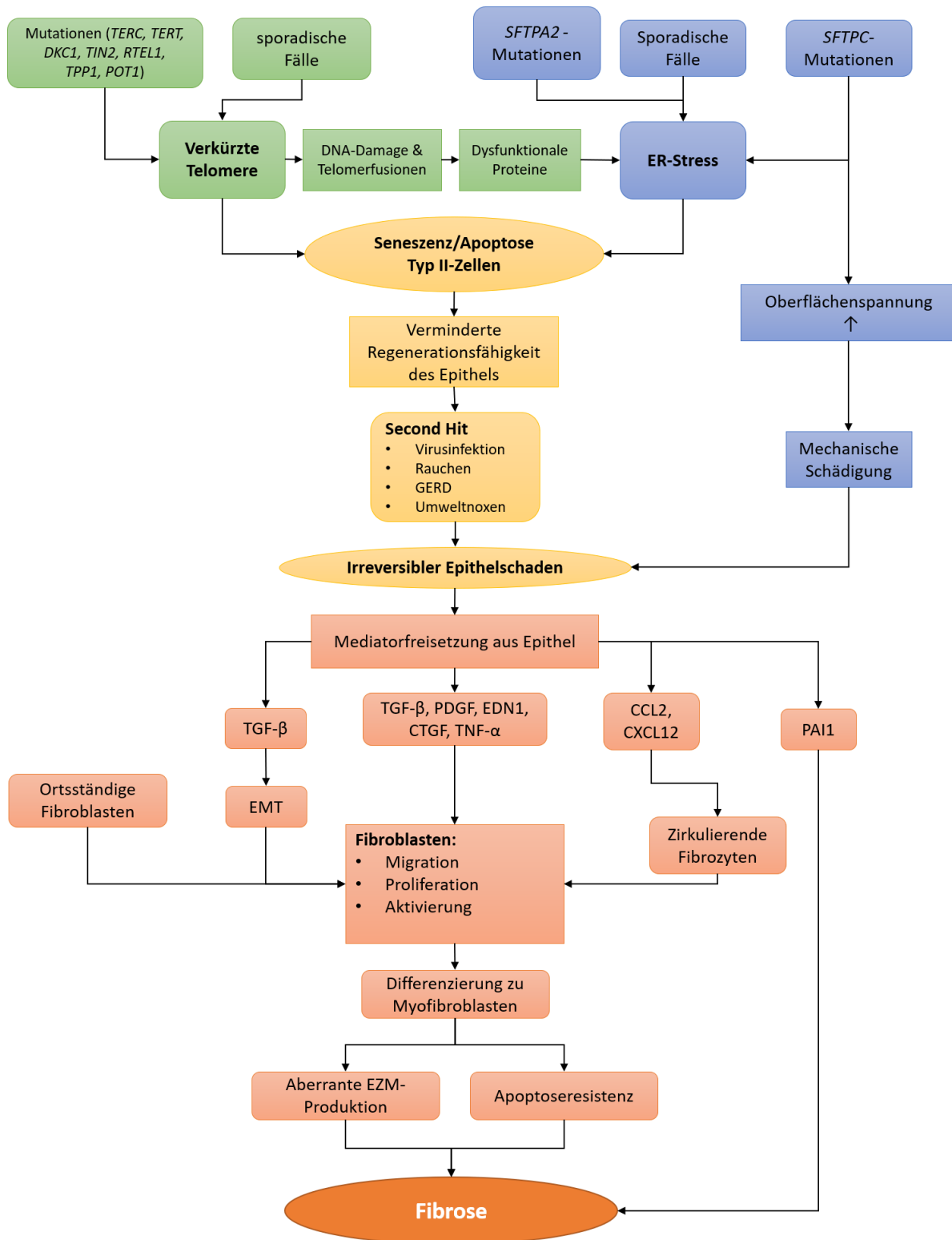


Abbildung 9 (eigene Abbildung): IPF-Pathogenese

**Abkürzungen:** CCL2= C-C Motiv Chemokin 2, CTGF= Connective Tissue Growth Factor, CXCL12= C-X-C Motiv Chemokin 12, DKC1= Dyskerin, EDN1= Endothelin 1, EMT= epithelial-mesenchymale Transition, ER= endoplasmatisches Retikulum, EZM= extrazelluläre Matrix, GERD= gastroösophagealer Reflux, PAI1= Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ I, PDGF= Platelet-Derived Growth Factor, *POT1*= Protection of Telomeres Protein 1, *RTEL1*= Regulator of Telomere Elongation Helicase 1, *SFTPA2*= Surfactant Protein A2, *SFTPC*= Surfactantprotein C, *TERC*= Telomere RNA Component, *TERT*= Telomerase Reverse Transkriptase, TGF-β= Transforming Growth Factor beta, *TIN2*= TRF1-Interacting Nuclear Protein 2, TNF-α= Tumornekrosefaktor alpha, *TPP1*= TIN2-Interacting Protein

## 1.5 Ziel der Arbeit

Verkürzte Telomere aufgrund von Mutationen in Shelterin- oder Telomerasekomplexkomponenten werden in 8-15% der familiären und 1-3% der sporadischen IPF-Fälle beobachtet [24]. Am häufigsten betroffen sind hierbei *TERC* oder *TERT*, seltener *DKC1*, *TIN2*, *RTEL1*, *TPP1* und *POT1* [24]. Gleichzeitig finden sich in den peripheren Leukozyten von sowie im Alveolarepithel von IPF-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant verkürzte Telomere, unabhängig vom Mutationsstatus von Telomerase- und Shelterinkomplex [12, 193, 222, 228, 252].

Weiterhin ist die familiäre IPF in einigen Fällen mit Mutationen in den für Surfactantproteine kodierenden Genen *SFTPA2* und *SFTPC* assoziiert [454, 484]. Bei *in vitro*-Expression der Surfactantproteinvarianten wird die Induktion von ER-Stress beobachtet [292, 324]. Dieser ist jedoch auch im Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF ohne zugrundeliegende Mutation nachweisbar [246]. Proapoptotischer ER-Stress, wie er in alveolären Typ-II-Zellen aus Lungengewebe von IPF-Patienten auffällt, bietet hier einen möglichen Erklärungsansatz für den im Krankheitsverlauf auftretenden Verlust an Typ-II-Zellen und deren Ersatz durch fibrotisches Gewebe [246]. Aus diesen Beobachtungen folgt die These, dass verkürzte Telomere generell eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der IPF spielen. Daraus ergeben sich die Fragen, ob allein durch die Telomerverkürzung schon (proapoptotischer) ER-Stress induzierbar ist, mit welchen weiteren Veränderungen im Gen- und Proteinexpressionsmuster diese einhergeht und ob verkürzte Telomere allein bereits zur Fibroseentwicklung führen.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden ein *in vivo* und ein *in vitro* – Modell mit verkürzten Telomeren entwickelt: Es wurden A549-Zellen für 19 Wochen kultiviert, wobei die Hälfte der Zellen mit dem Telomeraseinhibitor BIBR1532 (Boehringer Ingelheim) in einer Konzentration von 20  $\mu$ M behandelt wurde. Aus den Zellhomogenaten erfolgte eine Genexpressionsanalyse. Für das *in vivo*-Modell wurden *Telomerase RNA Component-Knockout* - Mäusen der dritten Generation mit und ohne Fusionsprotein aus SP-C und Green Fluorescent Protein (F3 *Terc*<sup>-/-</sup>- Mäuse sowie F3 *Terc*<sup>-/-</sup>/*SPC-GFP*-Mäuse) des C57Bl/6J-Stammes mit wt- C57Bl/6J-Mäusen verglichen. In den Mausproben wurden sowohl die Gen-, als auch die Proteinexpressionsebene untersucht.

Untersucht wurden außer ER-Stressmarkern auch der Einfluss der Telomerverkürzung auf den Lungenphänotyp, die Surfactantproteinproduktion, Marker des Zellzyklusarrestes und der Seneszenz und Marker von Inflammation, Fibrose und oxidativem Stress.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Labortechnische Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Chemilumineszenz-Imager Intas Chemo Star	Intas, Göttingen
ELISA Reader Tecan Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Gel Doc XR +	Bio-Rad, München
Gießstände für SDS-Gele	Bio-Rad, München
Glasplatten für SDS-Gelelektrophorese Mini PROTEAN-3-System	Bio-Rad, München
Short Plates	
Spacer Plates mit 1,5 mm Spacer	
Heizblock	Ditabis, Pforzheim
Histo-Scanner Nano Zoom	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu (Japan)
Inkubatoren	
CO2-Inkubator Heracell Vios 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Schüttelinkubator	Infors HT, Bottmingen (CH)
Inverses Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Laufkammer für SDS-Gele Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
Magnetrührer	
Heidolph MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
IK RH basic 2	IKA-Werke, Staufen
Maxi-M1	Vogel, Gießen
Nanodrop 2000c	Peqlab, Erlangen
Netzteile	
Electrophoresis Power Supply EV231	Consort, Turnhout (Belgien)
Electrophoresis Power Supply EV2310	Consort, Turnhout (Belgien)
pH-Meter Seven Compact	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Pipetten 1000 -200 -100- 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Semitrockenblot-Apparatur Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad, München
Vortexer	
Lab Dancer	VWR, Radnor (Pennsylvania, USA)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
VWR VV3	VWR, Radnor (Pennsylvania, USA)
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	
Heraeus PICO 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mini Star	VWR, Radnor (USA)

Abbildung 10: Labortechnische Geräte

## 2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

<b>Chemikalie/ Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
1× HALT™ Protease and Phosphatase-Inhibitor Cocktail #78440	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
96-Well Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
Abdeckfolie für 96-Well-Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessich Oldendorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Citronensäuremonohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Deckgläser Automat Star	Engelbrecht, Edermünde
Deoxycholsäure-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig/Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	
100% (v/v), unvergällt	Chemsolute, Renningen
100% (v/v), vergällt	Otto Fischar, Saarbrücken
96% (v/v)	Otto Fischar, Saarbrücken
70% (v/v)	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn
Ethidiumbromid-Lösung 0,025%	Carl Roth, Karlsruhe
Gel Blot Paper Whatman	GE, Boston (Massachusetts, USA)
Glycergel Mounting Medium	Dako, Hamburg
Glycerin	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
Glycin Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Haemalaun sauer nach Mayer	Waldeck, Münster
Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica (Massachusetts, USA)
KCl-Pulver	Merck Millipore, Burlington (Massachusetts, USA)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pulver	Merck Millipore, Burlington (Massachusetts, USA)
Methanol	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroreaktionsgefäße 2 ml, 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym, Hessich Oldendorf
NaCl-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH-Pulver	Merck Millipore, Burlington (Massachusetts, USA)
Nukleotide (dNTP-Mix)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Objektträger Super Frost Plus	Langenbrinck, Emmendingen
Oligo dT-Primer	Invitrogen, Carlsbad (Kalifornien, USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipettenspitzen 1000-100-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 1000-100-10 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Precellys Bulk Beads (1,4 & 2,8 mm)	Peqlab, Erlangen
Precellys Micro Packaging Vials	Peqlab, Erlangen
PVDF-Membran Immobilon-P	Merck Millipore, Burlington (Massachusetts, USA)
RNase-Inhibitor	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure rauchend 37%	Carl Roth, Karlsruhe
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Smart Ladder	Eurogentec, Köln
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat Dihydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
TRIS Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS Hydrochlorid PUFFERAN	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich, St.Louis (Missouri, USA)
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Xylol	VWR, Radnor (Pennsylvania, USA)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster

Abbildung 11: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.3. Zellkultur: Reagenzien, Medien und Zusätze

Reagenz	Hersteller
BIBR1532, 20 µM	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
DMEM/ F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Fetal Calf Serum (FCS), 10%	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamine 200 mM, 100×	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MEM Non Essential Amino Acids, 100×	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
MEM Vitamins, 100×	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Penicillin-Streptomycin, 100×	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Trypsin/EDTA-Stammlösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Abbildung 12: Zellkulturreagenzien

## 2.4. Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengewebe

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus murinem Lungengewebe wurde dieses im gefrorenen Zustand mit jeweils 1 ml Lysepuffer pro 0,75 cm<sup>3</sup> versetzt und mit dem Precellys Homogenisator nach Herstellerangaben zu einem Homogenisat verarbeitet. Anschließend wurden die Proben 2h auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 14000 rpm und 4°C von dem die zu untersuchenden Proteine enthaltenden Überstand getrennt. Letzterer wurde vorsichtig abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Mit dieser Methode konnten Proteinextrakte in der Konzentration von 5 – 15 µg/µl gewonnen werden.

### Lysepuffer:

- 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 (TRIS= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
- 150 mM NaCl
- 1% (w/v) Triton X-100
- 0.5% (w/v) Deoxycholsäure-Natriumsalz
- 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- 1× Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific, #78440), 1:100 Verdünnung

## 2.5. Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate	Merck-Millipore, Burlington (MA, USA)
Nucleo Spin RNA Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Merck-Millipore, Burlington (MA, USA)

Phire Hot Start II DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
ZytoChem HRP-DAB Kit Broad Spectrum	Zytomed Systems, Berlin
ZytoChem Plus (AP) Broad Spectrum (Permanent Red) Kit	Zytomed Systems, Berlin
ZytoChem Plus AP-Fast Red Kit Broad Spectrum	Zytomed Systems, Berlin

Abbildung 13: Verwendete Kits

## 2.6. Antikörper

Für die Durchführung von Protein-Analysen (Westernblot, Immunhistochemie) wurden folgende Antikörper verwendet:

### Primärantikörper auf Mausproben:

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Arginase-1, rabbit polyclonal	Abcam (ab91279)	1:750 (WB) 1:100 (IHC)
Anti-Chop, rabbit polyclonal	Cell Signalling Technology (#5554S)	1:300
Anti-F4/80, rat monoclonal	Bio-Rad (MCA497GA)	1:50
Anti-Grp78, rabbit polyclonal	Abcam (ab21685)	1:20.000 (WB) 1:2000 (IHC)
Anti-Integrin-β6, rabbit polyclonal	Novus Biologicals (NBP2-14136)	1:1000
Anti-mature SP-B, rabbit polyclonal	Seven Hills (WRAB-48604)	1:500
Anti-mature SP-C, rabbit polyclonal	Seven Hills (WRAB-76694)	1:500
Anti-p21, rabbit monoclonal	Abcam (ab109520)	1:500
Anti-phospho-p53 (pSer <sup>15</sup> ), rabbit polyclonal	Merck (PC461)	1:200
Anti-proSP-B, rabbit polyclonal	Seven Hills (WRAB-55522)	1:500
Anti-proSP-C, rabbit polyclonal	Millipore (AB3786)	1:800 (IHC) 1:2000 (WB)
Anti-Sirtuin 1, rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-15404)	1:500 (WB) 1:50 (IHC)
Anti-SP-A, rabbit polyclonal	Abcam (ab115791)	1:1000
Anti-TGF-β, rat monoclonal	BD Biosciences (555052)	1:75
Anti-Ttf1, rabbit monoclonal	Abcam (ab76013)	1:100
Anti-Xbp-1, rabbit monoclonal	Cell Signalling Technology (#12782)	1:300
Anti-Xbp-1, rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-7160)	1:50

Anti- $\beta$ -Actin, rabbit polclonal	Abcam (ab8227)	1:1500
--	----------------	--------

Abbildung 14: Verwendete Primärantikörper

### Sekundärantikörper auf Mausproben:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Rabbit anti-rat IgG, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg (P0450)	1:1000
Swine anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg (P0217)	1:1000

Abbildung 15: Verwendete Sekundärantikörper

## 2.7. Verwendete Proben

### 2.7.1. Zelllinie und deren Kultivierung

Für die Untersuchung des Einflusses der Telomerverkürzung auf das Genexpressionsmuster wurden A549/ CCL-185<sup>TM</sup>-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC)) in Anwesenheit des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 (Boehringer Ingelheim) in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M für 19 Wochen kultiviert. A549-Zellen wurden erstmals 1973 aus einem pulmonalen Adenokarzinom isoliert und gelten als Modell für Typ II-Alveolarepithelzellen [95]. BIBR1532 ist ein nichtnukleosidischer Telomerase-Inhibitor, der die katalytische Aktivität von TERT nichtkompetitiv hemmt [356].

Für die Untersuchung wurde eine Stammlösung des Inhibitors in einer Konzentration von 50 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und anschließend durch einen 0,22  $\mu$ m-Sterilfilter filtriert. Für das Experiment wurden jeweils 4  $\mu$ l dieser Stammlösung pro 10 ml Kultur-Medium frisch zugesetzt. Als Kontrolle wurden Vehikel-behandelte A549-Zellen in dem gleichen Zeitraum mitgeführt (4  $\mu$ l steriles DMSO/10 ml Kultur-Medium). Die A549-Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf Standard-Zellkulturschalen (Durchmesser: 10 cm) in einem Kultur-Volumen von 10 ml kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche in einem Verhältnis von 1:10 passagiert ("gesplittet"). Hierbei wurden während jeder Passagierung 20  $\mu$ M BIBR1532 bzw. reines DMSO dem Kultiviermedium zugesetzt.

Die Passagenzahl der A549-Zellen zu Beginn des Experimentes (Tag 0) war Passage 9 (P9), nach einer Woche P11, nach fünf Wochen P19 und nach 19 Wochen P46.

Da BIBR1532 die Zellproliferation inhibiert, konnten die BIBR1532-behandelten Zellen ab P19 nur noch in einem Verhältnis von 1:5 (2 $\times$ /Woche) gesplittet werden. Ab Passage 42 (nach 15 Wochen) konnten die BIBR1532-behandelten A549-Zellen aufgrund der Wachstumshemmung nur noch 1 $\times$  pro Woche passagiert werden. Um die Vergleichbarkeit aufrechtzuerhalten, wurde dieselbe Prozedur auch mit den

vehikelbehandelten A549-Zellen durchgeführt, obwohl diese normal und reichlich wuchsen.

Während jeder Passagierung wurden sowohl von Vehikel- als auch von BIBR1532-behandelten A549-Zellen Kryokulturen hergestellt. Ebenso wurden von jeder Passage A549-Zellen beider Zustände für die Isolation von DNA, RNA und Protein bei -80°C eingefroren.

Im Folgenden wird die Zusammensetzung des Kultiviermediums und der Vorgang der Passagierung durch "Trypsinierung" beschrieben.

Das Kulturmedium (Vollmedium) für A549-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

- 500 ml DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific)
- 5 ml Penicillin/ Streptomycin Stammlösung (Thermo Fisher Scientific, Endkonzentration: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
- 50 ml fetales Kälberserum (PAA Laboratories, 10% v/v Endkonzentration)
- 5 ml MEM nichtessentielle Aminosäuren, Stammlösung (Thermo Fisher Scientific, 1% v/v Endkonzentration)
- 5ml MEM Vitamine (Stammlösung Thermo Fisher Scientific, 1% v/v Endkonzentration)
- 5 ml Glutamin-Stammlösung (Thermo Fisher Scientific, Endkonzentration: 2 mM)

Zur Herstellung des Kulturmediums wurden die Komponenten unter einer Sterilbank gemischt und anschließend zusätzlich durch einen 0,22 µm-Sterilfilter filtriert. Das Medium wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 1× Trypsin/EDTA-Stammlösung (PAA) versetzt und für 1-3 min bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch Klopfen von der Platte gelöst und die Trypsinierung durch Zugabe von 7 ml Vollmedium abgestoppt. Die Zellen wurden in einem Falcon-Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend für 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur herabzentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 10 ml Kulturmedium gelöst. Anschließend wurde 1 ml dieser Zellsuspension auf eine Zellkulturplatte (Fläche 10 cm<sup>2</sup>), welche vorher mit 10 ml Kulturmedium versetzt wurde, ausplattiert (entspricht einer 1:10 Passagierung). Im Falle einer 1:5 Passagierung wurden 2 ml dieser Zellsuspension ausplattiert. Alle verwendeten Lösungen wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf

37°C erwärmt. Die restlichen Zellen wurden ebenfalls durch Abtrypsinieren und Zentrifugation geerntet und die Zellpellets bei -80°C gelagert.

### 2.7.2. Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *Terc*-Knockout-Mäuse basieren auf dem Hintergrundstamm C57Bl/6J. Es wurden jeweils 20 Tiere des Genotyps B6-Cg-*Terc*<sup>tm1Rdp</sup>(*terc*-/-) und 20 des Genotyps B6-Cg-*Terc*<sup>tm1Rdp</sup>(*terc*-/-); *SPC-GFP* bis zur Generation F3 gezüchtet. Die Zucht erfolgte durch Prof. Barbara Driscoll (Los Angeles, USA). Als Kontrollgruppe wurden 20 C57Bl/6J Wildtyp-Mäuse (gewöhnlich sind normale Wildtyp-Mäuse mit einer höheren Generation als F3 gezüchtet) eingesetzt, die von Charles River Laboratories (D-97633 Sulzfeld) bezogen wurden. Nach Transport nach Giessen und Haltung unter Specific Pathogen-Free (SPF)- Bedingungen wurden alle o.g. Mäuse im Alter von 16 Wochen durch Dr. med. vet. Ingrid Henneke mittels cervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss wurden die Lavagen und Lungen gewonnen. Die Tötungsanzeige lief für 3 Jahre unter der JLU-Nummer 636\_M (Phänotypisierung von *Telomerase*-Knockout-Mäusen).

Die in Abbildung 22 gezeigten Lungenschnitte stammen aus dem Folgeexperiment (ebenfalls JLU-Nummer 636\_M), in dem die Zucht bis Generation F5 fortgeführt wurde. Auch hier wurden wieder 20 Tiere jedes Stammes gezüchtet, sie wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und durch Dr. med. vet. Ingrid Henneke im Alter von 16 Wochen getötet.

### 2.8. Oligonukleotid-Primer

Folgende Primer für die semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurden genspezifisch abgeleitet und von der Firma metabion international AG (Martinsried) synthetisiert:

#### **Mausspezifische Primer:**

<b>Gen</b>	<b>forward</b>	<b>reverse</b>
<i>Actb</i>	5'-CTA-CAG-CTT-CAC-CAC-CAC-3'	5'-CTC-GTT-GCC-AAT-AGT-GAT-3'
<i>Atf6</i>	5'-GTC-CAC-AGA-CTC-GTG-TTC-TTC-3'	5'-GGC-TGA-ACT-GAA-GGT-TTT-GAA-C-3'
<i>Canx</i>	5'-CTA-AGA-GGC-CAG-ATG-CAG-ATC-3'	5'-GCG-TCT-TCA-TCC-CAG-TCA-TC-3'
<i>Casp11</i>	5'-ACT-GTC-CAG-GTC-TAC-GAG-AC-3'	5'-CCG-GAA-GCA-GGA-AAT-GAG-TC-3'

<i>Cdkn2a</i>	5'-CGG-GGA-CAT-CAA-GAC-ATC-GT-3'	5'-GCC-GGA-TTT-AGC-TCT-GCT-CT-3'
<i>Chop</i>	5'-CCT-AGC-TTG-GCT-GAC-AGA-G-3'	5'-GTC-AGG-CGG-TCG-ATT-TCC-3'
<i>Cip1</i>	5'-GTG-GAA-CTT-TGA-CTT-CGT-CAC-3'	5'-CTC-AGA-CAC-CAG-AGT-GCA-AG-3'
<i>Dr5</i>	5-CTA GGC CTC TGG ATA GGA-CTC-3	5-GGA GTC AAA GGG CAC TAT GTC-3
<i>Edem1</i>	5'-GCA-ATG-TTG-TGA-ACA-TCC-AGA-C-3'	5'-CAT-CTT-CCA-CAT-CCC-CTA-TCA-G-3'
<i>Grp78</i>	5'-GAA-GTG-GTG-GCC-ACT-AAT-GG-3'	5'-CAG-AGT-CTT-CCA-ACA-CTT-TCT-G-3'
<i>Il1b</i>	5'-GGA-CCC-ATA-TGA-GCT-GAA-AGC-3'	5'-ACT-CCA-CTT-TGC-TCT-TGA-CTT-C-3'
<i>Nlrp3</i>	5'-TGG-ATC-TTT-GCT-GCG-ATC-AAC-3'	5'-GAG-GTC-CAC-ACT-CTC-ACC-TAG-3'
<i>Nox2</i>	5'-TCG-CTG-GAA-ACC-CTC-CTA-TG-3'	5'-GGA-TAC-CTT-GGG-GCA-CTT-GA-3'
<i>Nox4</i>	5'-GCA-TCT-GCA-TCT-GTC-CTG-AA-3'	5'-ACC-ACC-TGA-AAC-ATG-CAA-CA-3'
<i>Noxa1</i>	5'-CAT-TCC-TGA-TGA-CCA-CAA-CG-3'	5'-AGT-CCA-AAT-CCT-CCG-GTC-TT-3'
<i>Pai1</i>	5'-AGG-TCA-GGA-TCG-AGG-TAA-ACG-AG-3'	5'-GGA-TCG-GTC-TAT-AAC-CAT-CTC-CGT-3'
<i>Prdx1</i>	5'-CAC-GGA-GAT-CAT-TGC-TTTCAG-3'	5'-CGC-TTG-GGA-TCT-GAT-ATT-AAG-G-3'
<i>Prdx6</i>	5'-GAT-CAT-CTT-GCC-TGG-AGC-AAG-3'	5'-AGG-GTA-GAG-GAT-AGA-CAG-CTT-C-3'
<i>R18S</i>	5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3'	5'-GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3'
<i>Sftpa</i>	5'-TCC-AGG-GTT-TCC-AGC-TTA-CCT-3'	5'-GAC-AGC-ATG-GAT-CCT-TGC-AAG-3'
<i>Sftpb</i>	5'-GGA-AGA-TGC-TTT-CCA-GGA-AGC-3'	5'-TGC-TCA-GAG-AAG-TCC-TGA-GTG-3'
<i>Sftpc</i>	5'-TAC-TGA-GAT-GGT-CCT-TGA-GAT-G-3'	5'-GGA-AGA-ATC-GGA-CTC-GGA-AC-3'
<i>Sirt1</i>	5'-AGA-GGC-AGA-GAT-GGA-CTT-CC-3'	5'-GGT-TTG-CAT-AGA-GGC-CAG-TG-3'
<i>Trb3</i>	5'-AAG-CTG-GTG-CTG-GAG-AAC-C-3'	5'-GAG-CAG-GAC-TGG-CTC-AGA-G-3'
<i>Xbp1(s)</i>	5'-GCT-TTT-ACG-GGA-GAA-AAC-TC-3'	5'-GCC-TGC-ACC-TGC-TGC-G-3'

Abbildung 16: Mausspezifische Primer

### Humanspezifische Primer

Gen	forward	reverse
<i>ABCA3</i>	5'-CTT-CAT-CAT-GCC-CTC-CTA-TTG-G-3'	5'-TGA-TGT-ATG-CCC-GTC-CAC-TG-3'

<i>ASK1</i>	5'-CTG-GTC-TCT-GGG-CTG-TAC-AA-3'	5'-CAC-AGG-CTC-TCT-TGT-CAG-GA-3'
<i>ATF4</i>	5'-GAT-AGG-AAG-CCA-GAC-TAC-ACT-G-3'	5'-GAG-ACC-CCA-GAT-AGG-ACT-CTG-3'
<i>ATF6</i>	5'-ACT-CAG-GGA-GTG-AGC-TAC-AAG-3'	5'-GGA-GGA-TCC-TGG-TGT-CCA-TC-3'
<i>CDKN1A</i>	5'-GAT-GGA-ACT-TCG-ACT-TTG-TCA-C-3'	5'-GGC-ACA-AGG-GTA-CAA-GAC-AG-3'
<i>CHOP</i>	5'-ACT-CTC-CAG-ATT-CCA-GTC-AGA-G-3'	5'-GCC-TCT-ACT-TCC-CTG-GTC-AG-3'
<i>CTGF</i>	5'-GCG-GGC-ATC-TGG-TAG-ATG-AAG-C-3'	5'-GAC-AGT-CAC-AGT-TCG-CCT-GTT-CG-3'
<i>CTSH</i>	5'-CCA-TCG-CAA-CCG-GAA-GAG-3'	5'-ACA-TCA-TGA-AGT-CCT-GAG-TCA-C-3'
<i>DKC1</i>	5'-TGG CTG TAT GAT AAC CAC AAG G-3'	5'-AGG GTA AGT GTC TCT CTC CAT G-3'
<i>DR5</i>	5'-AAG-ACG-GTA-GAG-ATT-GCA-TCT-C-3'	5'-CTA-CGG-CTG-CAA-CTG-TGA-C-3'
<i>EDN1</i>	5'-CCA-AGG-AGC-TCC-AGA-AAC-AG-3'	5'-GAT-GTC-CAG-GTG-GCA-GAA-GT-3'
<i>GAR1</i>	5'-GAC-CTC-CAG-AAC-GTG-TAG-TC-3'	5'-CTC-TTG-GAG-GTC-CTT-TCT-CAC-3'
<i>GRP78</i>	5'-GAG-AAC-ACG-GTC-TTT-GAC-GC-3'	5'-TCC-AGC-GTC-TTT-GGT-TGC-TT-3'
<i>HSP90B1</i>	5'-GTC-TCA-GCG-CCT-GAC-AGA-AT-3'	5'-GTC-TCT-GAT-CAG-CGG-GTG-TC-3'
<i>IL6</i>	5'-AAC-CTG-AAC-CTT-CCA-AAG-ATG-G-3'	5'-ATC-TGG-ACA-GCT-CTG-GCT-TG-3'
<i>NAPSA</i>	5'-TCA-CCT-TCG-TGC-CAG-TCA-C-3'	5'-TCG-AAG-ACG-GCC-ACA-TAC-G-3'
<i>NOP10</i>	5'-TCA-ACG-AGC-AGG-GAG-ATC-G-3'	5'-CAC-CTT-GAA-GCG-TTT-CTT-GAT-G-3'
<i>NOX2</i>	5'-GCC-AGA-TGC-AGG-AAA-GGA-AC-3'	5'-TCA-TGG-TGC-ACA-GCA-AAG-TG-3'
<i>NOXO1</i>	5'-TGC-AGA-TCA-AGA-GGC-TCC-AA-3'	5'-GAG-AAC-GCG-GTC-AGA-TCT-CC-3'
<i>P53</i>	5'-CCT-CAG-CAT-CTT-ATC-CGA-GTG-3'	5'-GTA-GAT-TAC-CAC-TGG-AGT-CTT-CC-3'
<i>PAI1</i>	5'-GCT-GGT-GCT-GGT-GAA-TGC-3'	5'-CCT-GGT-CAT-GTT-GCC-TTT-CC-3'
<i>PGC</i>	5'-TAC-ACG-GGG-CAG-ATC-TAC-TG-3'	5'-CCA-TTG-ATG-ATG-AAG-GTC-AAG-C-3'
<i>PLAT</i>	5'-CCA-CCC-TGT-TTT-CAG-CTA-AAG-3'	5'-TGC-TGG-GCT-CTT-GTG-ACT-A-3'
<i>PLAU</i>	5'-TAG-GCT-CTG-CAC-AGA-TGG-AT-3'	5'-GTG-AGG-ATT-GGA-TGA-ACT-AGG-C-3'
<i>POT1</i>	5'-TTA-AGT-CAC-ATC-CAT-CGG-CTA-C-3'	5'-TCG-TCA-GGT-TCT-GAT-TGA-CAG-3'
<i>PRDX1</i>	5'-ACA-GCC-GTT-GTC-AAT-GGA-GAG-3'	5'-ACG-TCG-TGA-AAT-TCG-TTA-GCT-T-3'

<i>PRDX2</i>	5'-GGA-CTC-TCA-GTT-CAC-CCA-CCT-3'	5'-GCC-CTC-ATC-TGT-TTT-CAG-CA-3'
<i>PRDX6</i>	5'-GGA-CGT-GGC-TCC-CAA-CTT-T-3'	5'-CGA-GGG-TGG-GAG-AAG-AGA-AT-3'
<i>PUMA</i>	5'-ATG-GCG-GAC-GAC-CTC-AAC-3'	5'-CTG-GGT-AAG-GGC-AGG-AGT-C-3'
<i>R18S</i> Primer 1	5'-CCT-CGA-TGC-TCT-TAG-CTG-AG-3'	5'-TCG-GAA-CTA-CGA-CGG-TAT-CTG-3'
<i>R18S</i> Primer 2	5'-GAC-TCA-ACA-CGG-GAA-ACC-TC-3'	5'-ATG-CCA-GAG-TCT-CGT-TCG-TT-3'
<i>SIRT1</i>	5'-CAA-GCT-CTA-GTG-ACT-GGA-CTC-3'	5'-CAT-CCC-TTG-ACC-TGA-AGT-CAG-3'
<i>SIRT2</i>	5'-CGG-TAC-ATG-CAG-AGC-GAA-C-3'	5'-TGC-CCA-GGA-TAG-AGT-TCC-TTG-3'
<i>TERC</i>	5'-CCT-TCC-ACC-GTT-CAT-TCT-AGA-G-3'	5'-TGA-CAG-AGC-CCA-ACT-CTT-CG-3'
<i>TERT</i>	5'-GAG-TGA-CCG-TGG-TTT-CTG-TG-3'	5'-CCT-GGA-ACC-CAG-AAA-GAT-GG-3'
<i>TGFBI</i>	5'-GCG-TGC-TAA-TGG-TGG-AAA-C-3'	5'-CGG-TGA-CAT-CAA-AAG-ATA-ACC-AC-3'
<i>TGFBR2</i>	5'-TGG-AGA-ATG-CTG-AGT-CCT-TCA-AGC-3'	5'-TAG-GGA-GCC-GTC-TTC-AGG-AAT-CTT-3'
<i>TIN2</i>	5'-TCC TCA GGG ACC ATC TTC AAG-3'	5'-CAA GTC AAC TGG GTT CTC CTT C-3'
<i>TPP1</i>	5'-GCC-CAG-AAG-TGC-CAT-TCT-G-3'	5'-CTT-GTG-AGG-TCA-AGT-TGT-ATC-G-3'
<i>TRB3</i>	5'-CTG-GTA-CCC-AGC-TCC-TCT-AC-3'	5'-GAA-TCA-TCT-GGC-CCA-GTC-AG-3'
<i>TRF1</i>	5'-TGT-GCG-GAT-GGT-AGG-GAT-G-3'	5'-TCA-ACT-GGC-AAG-CTG-TTA-GAC-3'
<i>TRF2</i>	5'-CCA-GAA-GGA-TCT-GGT-TCT-TCC-3'	5'-CAT-TAG-AGC-TGT-TCC-ACT-TGC-3'
<i>VEGFA</i>	5'-CAG-CGC-AGC-TAC-TGC-CAT-CCA-ATC-GAG-A-3'	5'-GCT-TGT-CAC-ATC-TGC-AAG-TAC-GTT-CGT-TTA-3'
<i>XBPI</i>	5'-GTT-GAG-AAC-CAG-GAG-TTA-AGA-C-3'	5'-CAG-ACT-CTG-AAT-CTG-AAG-AGT-C-3'

Abbildung 17: Humanspezifische Primer

## 2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um eine einheitliche Menge Protein in der SDS-Gelelektrophorese einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration in den aus murinen Lungen gewonnenen Proteinextrakten sowie den murinen Lavageproben bestimmt. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific eingesetzt. Dieses basiert auf der Biuret-Reaktion: In einer Lösung enthaltene Proteine reduzieren  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , welches wiederum hochspezifisch von Bicinchoninsäure gebunden wird. Der Komplex aus zwei Bicinchoninsäure- und einem  $\text{Cu}^+$ -Molekül zeigt ein typisches

Absorptionsmaximum bei 562 nm, dessen Ausprägung linear zur Proteinkonzentration ist. Durch Vergleich mit einer Rinderserum-Albumin (BSA)-Standardreihe lässt sich somit die Proteinkonzentration in einer Probe bestimmen [431].

Die Eichreihe wurde, ausgehend von einer Standardkonzentration von 2000 µg/ml in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Dabei wurden jeweils 50 µl BSA-Lösung mit den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1500µg/ml, 1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,25µg/ml, 15,625µg/ml und 7,81µg/ml. In dieselbe 96-Well-Platte wurden, ebenfalls in Duplikaten, jeweils 50 µl der zu bestimmenden Proben pipettiert. Lavageproben wurden hierbei unverdünnt eingesetzt, die Proteinextrakte aus Mauslungen in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Pro Probe wurden anschließend 200 µl Arbeitslösung hinzupipettiert. Diese bestand nach Herstellerangaben aus Lösung A (Bicinchoninsäure) und Lösung B (Kupferionen) in einem Verhältnis von 50:1 (A:B). Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die anschließende Absorptionsmessung erfolgte mit einem ELISA-Mikrotiter-Platten-Reader (TECAN infinitepro200M).

## 2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Konzentrationsbestimmung und zur Vorbereitung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteinproben aus murinem Lungengewebe bzw. murinen Bronchiallavagen mit reduzierendem 4×-Probenpuffer versetzt, um Disulfidbrücken aufzubrechen.

Der Probenpuffer setzte sich wie folgt zusammen:

### **4× 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)

### **4× SDS-Probenpuffer (reduzierend):**

- 90% (v/v) 4× SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend)
- 10% (v/v) β-Mercaptoethanol

Im Anschluss wurden die Proben bei 99°C für 15 Minuten im Heizblock gekocht und somit denaturiert.

Bei der von Laemmli 1970 erstmals beschriebenen SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt [257]. Ermöglicht wird dies durch Zugabe von SDS, das in einem konstanten Verhältnis von 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein an die Proteine bindet und hierdurch deren Eigenladung überdeckt. Durch die resultierende negative Ladung der Proteine wandern diese in einem über ein Polyacrylamid-Gel angelegten elektrischen Feld zum Pluspol (Anode). Die Laufgeschwindigkeit wird dabei durch das Molekulargewicht bestimmt, da größere Moleküle durch das Gel stärker zurückgehalten werden. Das Acrylamidgel besteht aus zwei Komponenten, wobei die Proteine im Sammelgel fokussiert und im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Je geringer die molekulare Masse der aufzutrennenden Proteine ist, desto höher muss die Acrylamidkonzentration des Gels gewählt werden. Für die in dieser Arbeit analysierten Proben wurden Acrylamidkonzentrationen von 8-15% eingesetzt.

Es folgt das Pipettierschema für Sammel- und Trenngel.

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

Abbildung 18: SDS-PAGE Pipettierschema

**Trenngelpuffer:**

- 1,125 M TRIS/HCl pH 8,8
- 30% (w/v) D(+)-Saccharose

**Sammelgelpuffer:**

- 0,625M TRIS/HCl pH 6,8

Die auspolymerisierten Gele wurden schließlich in eine Laufkammer (Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad) eingespannt und die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt. Nach Beladen der Taschen mit der jeweils gleichen Proteinmenge pro Probe sowie einem Proteingrößenstandard wurden die Proteine mit konstant 15mA pro Gel aufgetrennt.

#### Laufpuffer:

- 25 mM TRIS
- 192 mM Glycin
- 0,1% (w/v) SDS

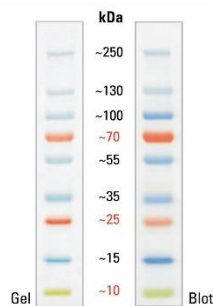


Abbildung 19 (Fisher Scientific): Proteingrößenstandard

Abkürzung: kDa= Kilodalton

#### Verwendete Gele

Untersuchtes Protein	Trenngel und Proteingehalt pro Tasche
Arginase-1	- 12%-Gel - 50 µg pro Probe
Chop	- 15%-Gel - 50 µg pro Probe
Dinitrophenylhydrazon	- 10%-Gel - 15 µg pro Probe
Grp78	- 8%-Gel - 50 µg pro Probe
Integrin-β6	- 8%-Gel - 50 µg pro Probe
p21	- 15%-Gel - 50 µg pro Probe
proSP-B	- 12%-Gel - 50 µg pro Probe
proSP-B (Murine BAL)	- 12%-Gel - 3 µg pro Probe
pro-SP-C	- 12%-Gel - 50 µg pro Probe

Sirt1	- 8%-Gel - 50 µg pro Probe
SP-A	- 10%-Gel - 50 µg pro Probe
SP-B	- 15%-Gel - 50 µg pro Probe
SP-C	- 15%-Gel - 50 µg pro Probe
Xbp-1	- 10%-Gel - 50 µg pro Probe

## 2.11. Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

In der vorliegenden Arbeit wurden Western Blots aus murinen Lungen angefertigt. Es wurden dabei jeweils n=6 Proben aus den Wildtypmäusen sowie aus den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen untersucht. Die Mäuse waren alle zum Tötungszeitpunkt 16 Wochen alt gewesen.

Das Western-Blot-Verfahren wurde in Anlehnung an Kyhse-Andersen als Halbtrockenblot durchgeführt [255]. Die im Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden hierbei auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert, wodurch die Detektion bestimmter Proteine per Primär- und Sekundärantikörper möglich wurde. Die Primärantikörper binden an das gesuchte Protein, die Sekundärantikörper, im vorliegenden Fall mit dem Reporterenzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, binden wiederum an die Erstantikörper. Durch Zugabe einer Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung (Immobilon/Millipore) und Entwicklung im Chemilumineszenz-Imager (Intas-Imager) wurden die so markierten Proteine als Banden sichtbar gemacht. Grundlage hierfür ist das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol, das durch die HRP in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem angeregten Produkt (3-Amino-Phthalat) oxidiert wird. 3-Amino-Phthalat emittiert bis zur Rückkehr in den Grundzustand Licht, das durch empfindliche Kameras oder einen Röntgenfilm aufgenommen werden kann.

Für die Durchführung des Western Blots wurde die PVDF-Membran zuerst für eine Minute in Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer wippend gelagert. Auch die zugeschnittenen Blotpapiere und das mit destilliertem Wasser abgespülte Trenngel wurden in Transferpuffer equilibriert, im Falle des Gels für 10 Minuten. Anschließend wurden zwei Lagen Blotpapier auf die Graphitanode gelegt und mit der Membran bedeckt. Oben auf die Membran folgte das Gel, abgeschlossen wurde mit weiteren zwei Lagen Blotpapier und der Graphitkathode (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad). Der Transfer

erfolgte mit 70mA pro Gel bei 8-12%-igen Gelen und 75 mA/Gel bei 15%-igen Gelen. Die Transferdauer betrug bei Proteinen mit geringer Molekülmasse eine, bei größeren Proteinen zwei Stunden bei einer Leistung von 150 Watt.

#### **Transferpuffer:**

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

Nach Abschluss des Blotvorganges wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen mit einer Lösung aus 5% Milchpulver in „Tris-Buffered Saline with Tween20“ (TBS/T) für eine Stunde bei schaukelnder Lagerung geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der ebenfalls in einer Milch-TBS/T-Mischung verdünnt wurde. Dies erfolgte unter ständiger Drehung in Falcon-Röhrchen bei 4°C über Nacht.

#### **1× TBS/T**

- 20mM TRIS/HCl pH 7,5
- 50 mM NaCl
- 0,5% (w/v) Tween 20

Am darauffolgenden Tag wurden die Blots vier Mal mit 1× TBS/T für jeweils 10 Minuten auf einer Rollapparatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem im Verhältnis von 1:1000 in Milchlösung gelösten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Rat bzw. Anti-Rabbit IgG) für 2 Stunden, woraufhin die Blots erneut für 4× 10 min in TBS/T gewaschen wurden. Abschließend erfolgte die Detektion nach Herstellerangaben mit dem Reagenz "Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate" (Millipore) in einem Chemilumineszenz-Imager (Intas Chemostar, Intas).

Die Ladungskontrolle der Blots erfolgte im Falle der Lavageproben mittels Coomassie-Färbung der PVDF-Membran, bei den mit deutlich mehr Protein beladenen Proben aus murinem Lungengewebe dagegen durch Stripping der Membran und erneute Inkubation mit gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) bzw.  $\beta$ -Aktin gerichteten Antikörpern.

Für die Coomassie-Färbung wurden die Blots einige Minuten in Coomassie-Färber gewippt und danach für 2× 10 min in Coomassie-Entfärber gelegt, um den Hintergrund

freizuwaschen. Anschließend wurden die Membranen mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült und zur Dokumentation noch feucht eingescannt.

#### **Coomassie-Färber**

- 50% (v/v) Methanol
- 5% (v/v) Eisessig
- 0,25% (w/v)  
Coomassie Brilliant  
Blue R-250

#### **Coomassie-Entfärber**

- 28% (v/v) 2-Propanol
- 5% (v/v) Eisessig

Zum Strippen der Geweblots wurden diese für 25 min bei 65°C und 40 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, wodurch sich die gebundenen Antikörper lösten. Der Strippingpuffer wurde dann durch zwei fünfminütige Waschschriffe mit destilliertem Wasser und 3× 3 min Waschen in TBS/T auf der Rollapparatur abgespült. Nach Abblocken der unspezifischen Bindestellen mit der oben beschriebenen Milchlösung wurden die Blots erneut über Nacht mit einem gegen  $\beta$ -Aktin oder Gapdh gerichteten Antikörper inkubiert und wie oben beschrieben entwickelt.

#### **Stripping-Puffer:**

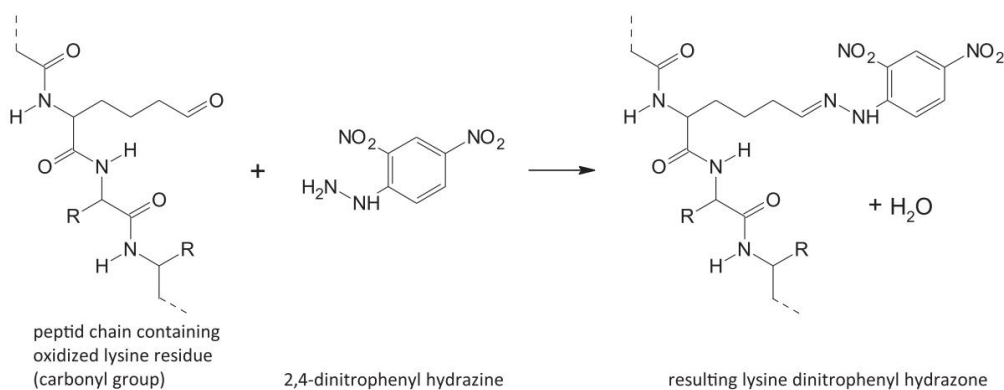
- 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 2% (w/v) SDS
- In 1× TBS/T

## 2.12. Immunologischer Nachweis der Proteincarbonylierung

Proteincarbonyle entstehen durch Oxidation von Proteinen, wenn diese oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die charakteristische Carbonylgruppe kann sowohl durch Oxidation einer Seitenkette als auch durch oxidative Spaltung einer Peptidbindung entstehen. Das Ausmaß der Carbonylierung von Proteinen gilt als direktes Maß des oxidativen Stresses [50]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von Proteincarbonylen in Anlehnung an Levine et al. mit Hilfe des kommerziell erhältlichen OxyBlot Detection Kit (Merck Millipore) folgendermaßen durchgeführt [272]:

Es wurden pro Mauslunge jeweils 20  $\mu$ g Protein (Proteinextrakt wie in Kapitel 2.8 beschrieben hergestellt, Proteinkonzentrationsbestimmung wie in Kapitel 2.9 beschrieben) eingesetzt. Jede Probe wurde mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 5  $\mu$ l aufgefüllt und vortexiert. Die Proben wurden nun nach jedem weiteren Pipettierschritt vortexiert.

Anschließend wurden jeweils 5 µl 12% SDS hinzupipettiert (Endkonzentration 6% SDS), um die Denaturierung der in den Proben enthaltenen Proteine zu erreichen. Zur Derivatisierung der oxidierten Proteine wurden pro Probe 10 µl 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)- Lösung aus dem Kit hinzupipettiert. DNPH reagiert unter Abspaltung von Wasser mit oxidierten Proteinseitenketten zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP) (Abb. 20) [272]. Außerdem wurde eine Negativkontrolle angelegt, in die anstelle von DNPH 10 µl der Derivatization Control Solution aus dem Kit hinzugefügt wurde. Die Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die Reaktion mit 7,5 µl Neutralizing Solution aus dem Kit abgestoppt. Zu jeder Probe wurde 10 µl reduzierender Probenpuffer (Herstellung siehe Kapitel 2.10.) hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben per SDS-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.10) aufgetrennt und im Halbtrockenblotverfahren, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, auf eine PVDF-Membran transferiert. Zusätzlich zum Proteingrößenstandard wurde der im Kit mitgelieferte DNP-Standard für oxidierte Proteine benutzt. Für den Western Blot wurde der im Kit enthaltene Anti-DNP-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:150 eingesetzt, der ebenfalls im Kit enthaltene Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit, HRP-gekoppelt) in einer Verdünnung von 1:300. Im Unterschied zum in Kapitel 2.11 beschriebenen Vorgehen erfolgte sowohl die Inkubation mit dem Erst- als auch mit dem Zweitantikörper nur für jeweils eine Stunde. Auf diese Weise ließen sich die oxidierten Seitenketten in den untersuchten Proben als Banden im Western Blot darstellen und – wie in Kapitel 2.18 beschrieben – densitometrisch auswerten.



**Abbildung 20** ([490]): Reaktion einer Proteincarbonyl-Gruppe mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin am Beispiel einer Lysinseitenkette

### 2.13. Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden jeweils n=6 Proben aus den Wildtypmäusen sowie aus den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen untersucht. Die Mäuse waren alle zum Tötungszeitpunkt 16 Wochen alt gewesen.

Die für die immunhistochemischen Untersuchungen benötigten Mauslungen wurden für 16- 24h in 4% (w/v) phosphatgepuffertem para-Formaldehyd fixiert, und im Anschluss in 1× PBS bei 4°C inkubiert. Nach ein bis sieben Tagen wurden die fixierten Lungengewebe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Durch die technische Assistentin Ann-Christin Beitel erfolgte die Anfertigung serieller 3µm-Schnitte mit einem vollautomatischen Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica) und die Aufbringung derselben auf Objektträger.

Der Proteinnachweis mittels IHC erfolgte mithilfe der Streptavidin-Biotin-Technik. Hierbei bindet zuerst ein Primärantikörper spezifisch an das zu untersuchende Protein. An den Primärantikörper bindet nun ein biotinylierter Sekundärantikörper, der wiederum durch einen Komplex aus Streptavidin und einem Enzym gebunden wird. Dieses Enzym ist entweder alkalische Phosphatase (AP) oder HRP und setzt ein Substrat zu einem Farbstoff um. In der vorliegenden Arbeit wurden das einen braunen Farbstoff bildende HRP-Diaminobenzidin (DAB)-Kit (Zytomed Systems) und das einen roten Farbstoff bildende AP-Fast Red-Kit (Zytomed Systems) eingesetzt.

Im Rahmen der IHC wurden die Paraffinschnitte zuerst für 2 h bei 60°C inkubiert, um die folgende Entparaffinisierung zu erleichtern. Anschließend wurden die Schnitte in eine Küvette gesteckt, 10 min in 100% Xylol entparaffinisiert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%, 50%) für jeweils 3 min rehydriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte in Aqua dest. gelagert.

Zur sogenannten Antigendemaskierung, d.h. um das Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen, wurde die Küvette in Zitratpuffer gestellt, dieser in der Mikrowelle bei 900 Watt zum Kochen gebracht und anschließend für weitere 5 min gekocht. Es folgte eine Abkühlphase von 25 min. Diese beiden Schritte (Kochen und Abkühlen) wurden insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei verkochter Puffer mit destilliertem H<sub>2</sub>O aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Schnitte unter Schütteln für 2 min in 1× PBS gewaschen.

#### **Zitratpuffer:**

- 18 ml Lösung A (100mM Zitronensäure-Monohydrat)
- 82 ml Lösung B (100mM Natrium-Zitrat-Dihydrat)
- Auffüllen mit Aqua dest. auf 1l

### **10 × PBS**

- 160,2g NaCl
- 4g KCl
- 28,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
- 5,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)
- mit 2M NaOH auf pH 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 2l auffüllen

Beim HRP-DAB-Kit erfolgte ein Zwischenschritt zur Blockade der endogenen Peroxidasen mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 min. Anschließend wurden die Schnitte erneut für 2 min in 1× PBS gewaschen.

Bei beiden verwendeten Kits (HRP-DAB-Kit und AP-Fast Red-Kit, Zytomed Systems) folgte eine 5-minütige Inkubation mit der im Kit enthaltenen Blocking Solution zur Blockade unspezifischer Antikörperbindestellen und 3 Waschschrte mit 1× PBS für jeweils 2 min. Als Nächstes wurden die spezifischen Primärantikörper in einer je nach Antikörper unterschiedlichen Verdünnung in 2% (w/v) BSA in PBS gelöst. In einer Feuchtekammer wurden die Schnitte mit jeweils 75- 100 µl der Antikörperlösung bedeckt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei weitere 2-minütige Waschschrte unter Schütteln. Hierfür wurde nun 1× PBS mit 0,1% (w/v) BSA verwendet.

Die in den Kits enthaltenen biotinylierten Sekundärantikörper wurden für eine Inkubationszeit von 20 min auf die Schnitte gegeben, es folgte 3× 2min Waschen in 2% BSA/PBS. Abschließend wurden die Schnitte für 20 min mit dem im Kit enthaltenen Streptavidin-HRP- bzw. Streptavidin-AP-Konjugat inkubiert und dann für 3× 2min in 1× PBS ohne BSA gewaschen.

Die eigentliche Färbung erfolgte durch Zugabe der Entwicklerlösung aus dem entsprechenden Kit. Hierbei führte die Enzymreaktion der AP mit Naphthol-AS-bisphosphat und dem Chromogen Fast Red zu einem roten Reaktionsprodukt, während die HRP-katalysierte Reaktion durch Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) einen braunen Farbstoff ergab. Die Dauer der Färbung unterschied sich je nach untersuchtem

Protein, weswegen die sich ergebende Farbtintensität unter dem Lichtmikroskop verfolgt und die Reaktion schließlich durch Überführung der Schnitte in Aqua dest. abgestoppt wurde.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun (sauer, nach Mayer) für 90 sec und anschließender Bläuung der Färbung durch Waschen mit Leitungswasser für 3-4 min. Nachdem die Schnitte mit Glycergel Mounting Medium (Dako) eingedeckelt und anschließend getrocknet worden waren, wurden sie mit dem Nano-Zoomer Scanner (Hamamatsu) eingescannt und digital archiviert. Die histomorphologische Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogrammes NDP.view2.

Zur Lokalisationsbestimmung der Proteinexpression erfolgte jeweils die Färbung zweier Parallelschnitte pro Maus. Auf einem Schnitt wurde das zu untersuchende Protein gefärbt, auf dem Parallelschnitt ein Zellmarker wie Ttf-1, proSP-C und F4/80. Untersucht wurde die Koloalokalisation der Proteine mit den Zellmarkern.

Die Quantifizierung von IHC-Färbungen erfolgte per manuellem Auszählen der gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld in der 2-Bilder-Ansicht in NDP.view2. Je nach Zahl der gefärbten Zellen wurden dabei eine 40- bzw. 20-fache Vergrößerung gewählt. Pro Mausschnitt (1 Schnitt/ Maus) wurden drei Gesichtsfelder ausgezählt. Die Zahl der untersuchten Mäuse betrug n=6 pro Stamm für die F3-Mäuse und n=8 pro Stamm für die F5-Mäuse. Im Fall der proSP-C-Quantifizierung konnten von den *Terc*<sup>(-/-)</sup> und Wildtypmäusen jeweils nur n=5 ausgezählt werden, da die anderen beiden Schnitte durch Erythrozyten verunreinigt und somit nicht auswertbar waren.

## 2.14. RNA-Isolation

### 2.14.1. RNA-Isolation aus murinem Lungengewebe

Für die Extraktion von RNA aus murinem Lungengewebe wurde das RNeasy Plus Mini-Kit von Qiagen verwendet. Zur Zellaufspaltung wurden jeweils 1,5 ml RLT+- Puffer (im Kit enthalten) und, zur Inhibition gewebeeigener RNAsen, 15 µl β-Mercaptoethanol zu einer halben in Flüssigstickstoff gefrorenen Mauslunge (ca. 50 mg Gewebe) pipettiert. Anschließend erfolgte der mechanistische Aufschluss der Lungengewebe im Precellys-Homogenisator, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm/RT. Das dabei entstehende Pellet wurde verworfen und mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

Zur Elimination genomischer DNA wurden pro Probe 600 µl Lysat auf eine im Kit enthaltene DNA-bindende Eliminationssäule pipettiert. Die Säule wurde bei 13000 rpm

für eine Minute zentrifugiert, anschließend wurde die Säule verworfen. Zum Durchlauf wurden 600 µl 70%-iges Ethanol pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Zur RNA-Isolation wurden zwei Mal jeweils 600 µl Lysat auf eine im Kit enthaltene Trennsäule pipettiert und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die zu isolierende RNA blieb dabei in der Trennsäule zurück, der Durchlauf wurde verworfen.

Als Nächstes erfolgten mehrere Waschschrte, wobei der Durchlauf nach Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm jeweils verworfen wurde:

1. 700 µl RW1-Puffer (im Kit enthalten) pro Probe
2. 500 µl RPE-Puffer (im Kit enthalten) pro Probe
3. 500 µl RPE-Puffer (im Kit enthalten) pro Probe

Zuletzt folgte der Wechsel der Sammel-Eppendorfgefäße und eine 2-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm, um unnötige RPE-Puffer-Reste loszuwerden.

Anschließend wurde die RNA durch Hinzupipettieren von 40 µl RNase-freien Wassers pro Säule und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute in vorbereitete Eppendorfgefäße eluiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Mit dieser Methode konnten 200 - 1000 ng RNA/µl in einem Volumen von 40 µl gewonnen werden.

#### 2.14.2. RNA-Isolation aus A549-Zellen

Für die RNA-Isolation aus A549-Zellen wurde das NucleoSpin RNA Plus-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte mit dem mitgelieferten LBP-Lysepuffer, indem nach Absaugen des Zellkulturmediums 2 ml LBP-Puffer auf eine Zellkultur-Schale (Durchmesser: 10 cm) mit adhärenen A549-Zellen pipettiert wurden und die Zellen so abgelöst und lysiert wurden. Daraufhin wurden 300 µl Lysat (der Rest wurde bei -80°C eingefroren) auf die mitgelieferte Eliminationssäule pipettiert, um genomische DNA zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute wurde die Säule verworfen. Zum Durchlauf wurden pro Probe 100 µl Binding Solution BS hinzupipettiert und durch Vortexen gemischt, um die Bindung der RNA an die Trennsäule zu verbessern. Das Lysat wurde schließlich auf die mitgelieferte NucleoSpin® RNA Plus Column pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm wurde die RNA an die Trennsäule gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgten drei Waschschrte, an die sich jeweils eine Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm anschloss:

1. 200 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers WB1

2. 600 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers WB2
3. 250 µl des im Kit enthaltenen Waschpuffers WB2

Nach dem dritten Waschschrift wurde die Membran der Trennsäule bei 13000 rpm für zwei Minuten trocken zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte schließlich durch zweimaliges Hinzupipettieren von 30 µl RNase-freien Wassers (Bestandteil des Kits) pro Säulchen mit sich jeweils anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute. Bis zur weiteren Verwendung wurde die eluierte RNA bei -80°C gelagert.

Mit dieser Methode konnten 200 - 1000ng RNA/ µl in einem Volumen von 60 µl gewonnen werden.

## 2.15. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (NanoDrop, Peqlab). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei jeweils 2 µl der Probe eingesetzt wurden.

## 2.16. Reverse Transkription der RNA

Die Umschrift der in den RNA-Proben enthaltenen mRNA in cDNA erfolgte mithilfe des Omniscript-RT-Kits (Qiagen). Pro Probe wurden folgende Reagenzien eingesetzt (20 µl-Ansatz):

- 500 ng - 2 µg RNA in 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O (aus dem Kit)
- 2 µl 10× Puffer RT (aus dem Kit)
- 2 µl Nukleotide-Mix (5 mM) (aus dem Kit, Endkonzentration 500 µM von jedem Desoxy-Nukleotid (dNTP) im 20µl-Ansatz)
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (Invitrogen, Endkonzentration 1 µM)
- 0,5 µl Oligo-dT-Primer (Oligonukleotid aus Thymin)
- 4 µl RNase freies H<sub>2</sub>O (aus dem Kit)
- 1 µl Reverse Transkriptase (aus dem Kit, Endkonzentration 4 Units)

Die Ansätze wurden zusammenpipettiert, vortexiert, kurz zentrifugiert und dann eine Stunde bei 37,3°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Eppendorfgefäß mit einem Ansatz ohne reverse Transkriptase mitinkubiert.

## 2.17. Genexpressionsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion können bestimmte Nukleotidsequenzen schnell, einfach und spezifisch *in vitro* vermehrt werden. Ihr Vorteil liegt darin, dass man nur sehr wenig Ausgangsmaterial braucht, um eine Analyse durchführen zu können.

Der für die PCR angesetzte 20 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 4 µl 5× Puffer (Puffer für die Phire II-Polymerase, Thermo Scientific)
- 2 µl genspezifischer Primer forward (Metabion, Endkonzentration 1 µM)
- 2 µl genspezifischer Primer reverse (Metabion, Endkonzentration 1 µM)
- 0,4 µl dNTPs (#R0192, Thermo Scientific, 200 µM pro dNTP)
- 0,4 µl Phire Hot Start II DNA-Polymerase (#F-122L, Thermo Scientific)
- 10,2 µl H<sub>2</sub>O dest.
- 1 µl cDNA (100 ng) in H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde zusammenpipettiert, vortexiert, kurz zentrifugiert und dann in den PCR-Cycler gegeben. Dieser führte vollautomatisch für 25-35 Zyklen (stark exprimierte Gene benötigen weniger, gering exprimierte Gene mehr Zyklen) folgende Schritte durch:

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	Funktion
Hot Start	30 sec	98°C	Durch die hohe Starttemperatur wird sichergestellt, dass die Polymerase erst nach vollständiger Aufschmelzung der DNA bindet, wodurch weniger unspezifische Nebenprodukte entstehen.
Denaturierung	5 sec	98°C	Aufschmelzung der DNA in Einzelstränge
Primer Annealing	5 sec	Primerabhängig 55-65°C	Anlagern des Primers an seine spezifische Bindestelle
Elongation	20 sec	72°C	Verlängerung des komplementären Stranges ausgehend vom Primer. 72°C sind die ideale Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase.
Finale Elongation	60 sec	72°C	Verlängerung des komplementären Stranges ausgehend vom Primer. 72°C sind die ideale Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase.

Abbildung 21: Schritte der PCR

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der Primer. Bei Primern mit einer Länge von über 20 Nukleotiden wurde die Annealing-Temperatur um 2°C gegenüber den Herstellerangaben erhöht.

### 2.17.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Je größer die Moleküle, desto stärker werden sie vom Gel zurückgehalten. Durch Vergleich mit einem Größenstandard kann die Zahl der Basenpaare eines PCR-Produktes abgeschätzt werden. Sichtbar gemacht werden die bei der Elektrophorese entstehenden DNA-Banden durch Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert.

Zur Herstellung von 2%igen Agarosegelen wurden für zwei große Gele 350 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer mit 7g Agarose (Byozym) in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach kurzer Abkühlzeit wurden 8 Tropfen einer 0,025%-igen Ethidiumbromidlösung hinzugefügt, die Masse in einen Gelträger gegossen und Kämmе hineingestellt. Letztere wurden nach dem Abkühlen und Festwerden des Agarosegels gezogen. Für die Elektrophorese wurden die Gele in einer Laufkammer mit 1× TAE-Puffer überschichtet.

#### **50× TAE-Puffer**

- 242 g TRIS
- 57,1 ml Eisessig (99%-ige Essigsäure)
- 100 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8
- mit H<sub>2</sub>O dest. auf 1 l auffüllen

Die PCR-Produkte (20 µl-Ansatz) wurden mit 5 µl 5× Probenpuffer gemischt, vortexiert, kurz zentrifugiert und dann in Duplikaten zu jeweils 10 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Zum Größenvergleich dienten 5 µl SmartLadder (Eurogentec). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 V (10 V pro cm Gellänge) durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit einem UV-Imager (Gel-Doc XR+, Bio-Rad) aufgenommen und dokumentiert.

#### **5× Probenpuffer**

- 5 ml Glycerin
- 200 µl 50 × TAE
- 400 µl Bromphenolblau

- 4,4 ml H<sub>2</sub>O dest.

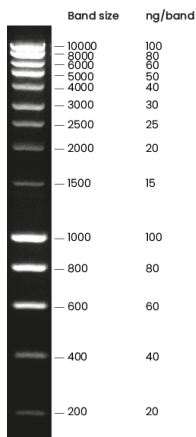


Abbildung 22 (Eurogentec): Größenstandard SmartLadder

Für die untersuchten Mausproben wurde pro Mauslunge eine Probe aufgetragen (d.h. n=6 für wt, n=6 für *Terc*<sup>-/-</sup> und n=6 für *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP). In den A549-Proben wurden pro Passage n=4 Proben aufgetragen.

## 2.18. Densitometrische Auswertung und statistische Methoden

Die densitometrische Auswertung der Banden der Western Blots wurde mittels der Software Image J (Version 1.53a, NIH), die Auswertung der Agarosegele mit der Software Image Lab (BioRad) durchgeführt. Nach Standardisierung der erhaltenen Intensitätswerte auf die entsprechende Ladungskontrolle ( $\beta$ -Aktin bzw. Gapdh für die Western-Blots, 18S-rRNA für die Agarosegele) wurde ein statistischer Vergleich der einzelnen Gruppen mithilfe ungepaarter t-Tests durchgeführt. Unterschiedliche Varianzen wurden durch die Welch-Korrektur ausgeglichen.

Im Falle des Lavageblots war eine Normierung aufgrund der hier nur sehr geringen Gesamtproteinmenge nicht möglich. Hier erfolgte zur Ladungskontrolle lediglich eine Coomassie-Färbung der Blotmembran.

Für die A549-Genexpression wurde der Vergleich unterschiedlicher Zeitpunkte (Passage 11 und 46) derselben Zellen mit gepaarten, der Vergleich zwischen telomeraseinhibierten und vehikelbehandelten Zellen mittels ungepaarten T-Tests ausgeführt. Da hier auf dem gleichen Datensatz mehrere T-Tests durchgeführt wurden, wurden die erhaltenen p-Werte mit der Bonferroni-Korrektur korrigiert [186].

Auch bei der Genexpressionsanalyse der Mäuse wurden die Ergebnisse bei multiplen Tests auf dem selben Datensatz nach Benjamini-Hochberg korrigiert. Die in dieser Arbeit

angegebenen p-Werte sind bereits korrigiert. Für die statistische Auswertung wurde die Computersoftware GraphPad Prism 5 verwendet. Signifikanz wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse: Telomerase-Knockout in genetisch veränderten Mäusen *in vivo*

#### 3.1. Vergleich des Lungenphänotyps der $Terc^{(-/-)}$ KO-Mäuse mit Wildtyp-C57BL/6J-Mäusen

Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Lungenschnitte der  $Terc^{(-/-)}$ -KO- und  $Terc^{(-/-)}$ /SPC-GFP- (nur F3) aus Generation F3 und F5 und von Wildtyp-Mäusen (alle 16 Wochen alt) mit einem Antikörper gegen den spezifischen Typ-II-Zellmarker proSP-C (Millipore, AB 3786, Verdünnung 1:800) gefärbt. Die Auszählung der proSP-C positiven Zellen erfolgte bei 20-facher Vergrößerung.

Dabei zeigte sich, dass histologisch in keiner der o.g.  $Terc^{(-/-)}$ - bzw.  $Terc^{(-/-)}$ /SPC-GFP-Mäuse die Entwicklung einer Lungenfibrose festgestellt werden konnte. Im Gegenteil, mit zunehmender Generationenzahl war eine Rarefizierung der Alveolarepten erkennbar, wodurch der Durchmesser der verbleibenden Alveolarsacculi zunahm und sich ein emphysemartiges Bild ergab (Abb. 23 A). Die Anzahl proSP-C-positiver Typ-II-Zellen war in Knockout-Mäusen der dritten und fünften Generation gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert ( $p$  (F3,  $Terc^{(-/-)}$ )= 0,0002;  $p$  (F3,  $Terc^{(-/-)}$ /SPC-GFP)=0,0004;  $p$ (F5,  $Terc^{(-/-)}$ )= 0,024) (Abb. 23 B).

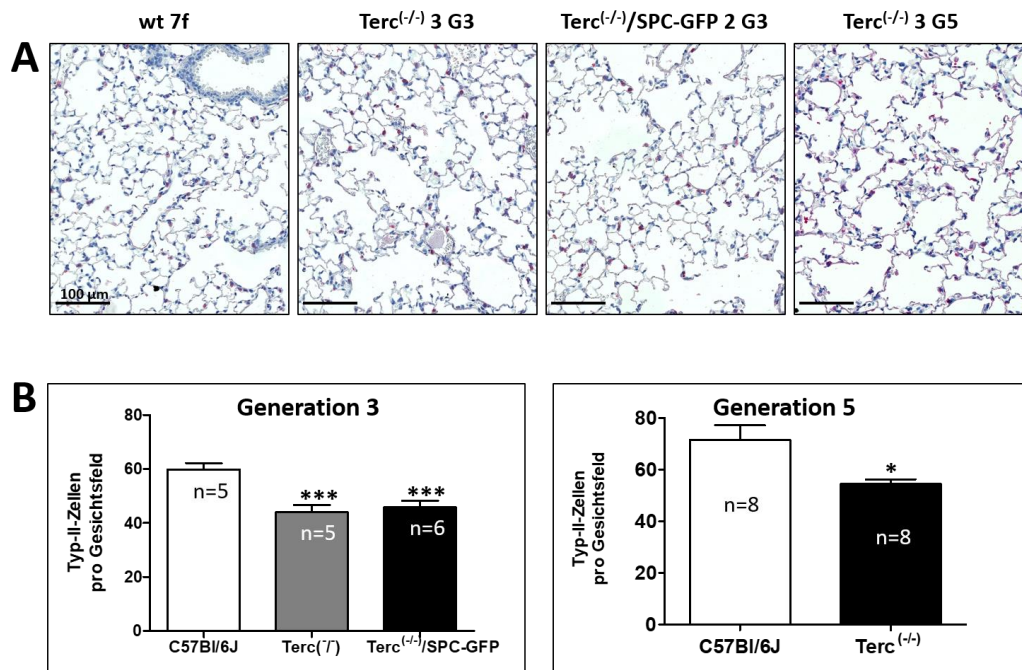


Abbildung 23: Lungenphänotyp von F3 und F5  $Terc^{(-/-)}$ -Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.

Grafik A zeigt repräsentativ den Lungenphänotyp von wt- sowie  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen der dritten und fünften Generation im Vergleich. Auffällig ist die Rarefizierung der Alveolarsepten in den  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen. Rot angefärbt sieht man die proSP-C-positiven Typ-II-Zellen, deren Anzahl mit zunehmender Generationenzahl abnimmt.

Grafik B zeigt das Ergebnis der Auszählung der Typ II-Zellzahl im Vergleich zwischen wt- und Knockout-Mäusen. Signifikante Unterschiede im ungepaarten T-Test sind durch \* verdeutlicht (\*\*\*) $p \leq 0.001$ , \*) $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:** GFP= Green Fluorescent Protein, SPC= Surfactantprotein C, Terc= Telomerase RNA Component, Wt= Wildtyp

### 3.2. Proteinexpressionsanalyse von p53 und p21 in Lungengewebe von $Terc^{(-/-)}$ - und $Terc^{(-/-)}/SPC-GFP$ -Mäusen versus Wildtyp-Mäuse

P53 ist ein Transkriptionsfaktor und wichtiger Tumorsuppressor, der unter Normalbedingungen kaum exprimiert wird bzw. funktionsunfähig vorliegt. Unter zellulären Stressbedingungen, z.B durch DNA-Schäden oder dysfunktionale Telomere, wird p53 durch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung stabilisiert [546]. Stabilisiertes p53 kann durch Induktion der *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 (Cip1)*- Transkription den Zellzyklus anhalten und/oder die Zelle seneszent werden lassen. Außerdem kann p53 durch vermehrte Transkription proapoptotischer Gene oder Translokation in die Mitochondrienmembran den programmierten Zelltod auslösen [132, 546]. Darüber hinaus sind Zielgene des Transkriptionsfaktors p53 an DNA-Reparatur und Autophagie beteiligt [103, 447].

P21 ist ein potenter Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen (CDK's), dessen Transkription p53-abhängig und -unabhängig induziert werden kann [1]. Vorrangig bewirkt p21 einen Zellzyklusarrest durch CDK2-Inhibition in der G1-Phase und durch CDK1-Inhibition in der G2-Phase [74, 110]. Dieser Zellzyklusarrest kann einen ersten Schritt in die zelluläre

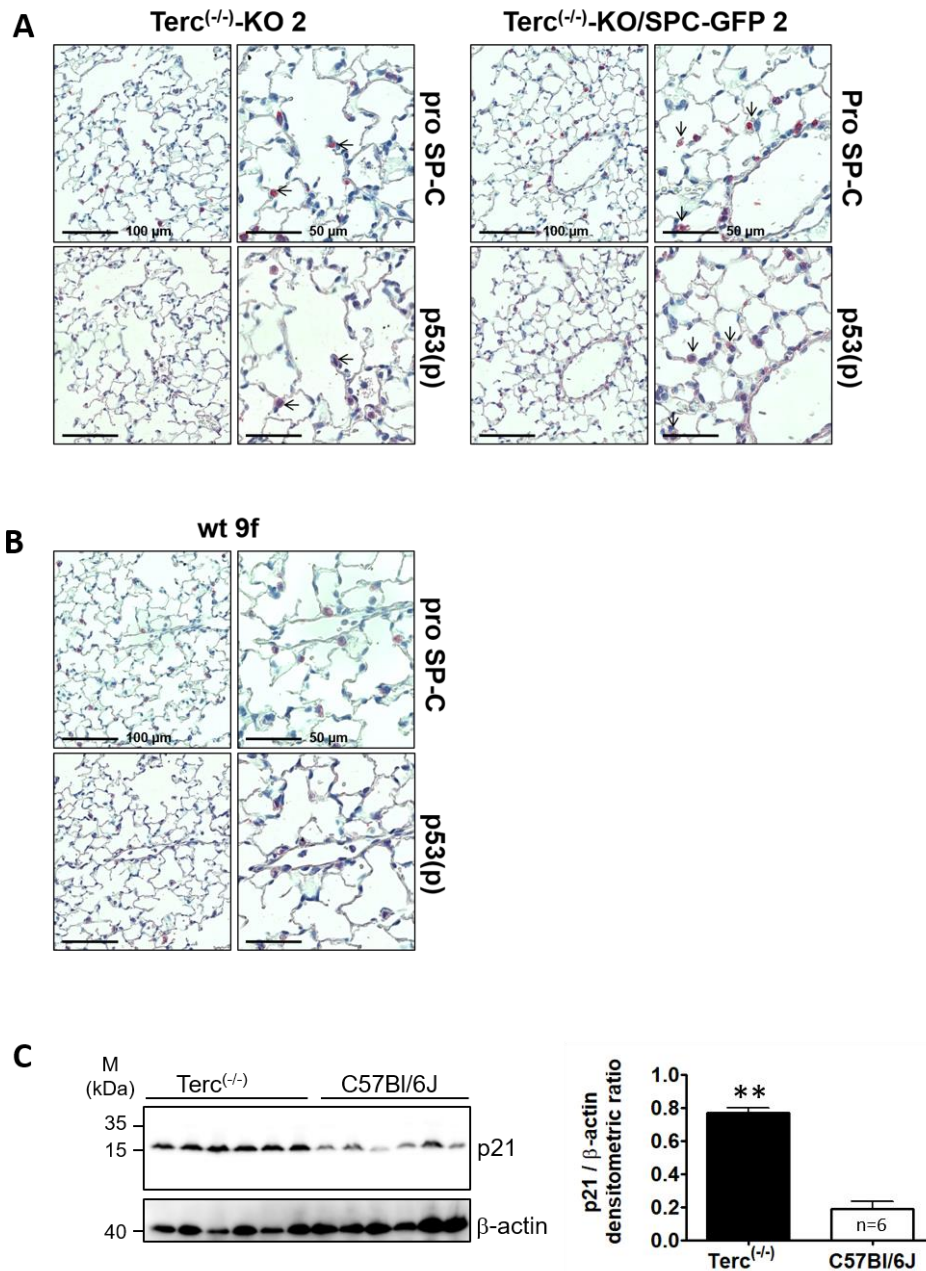
Seneszenz darstellen, weswegen p21 auch als Seneszenzmarker gilt [1]. Weiterhin blockiert p21 durch Bindung an Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) direkt die DNA-Synthese [394].

Für die immunhistochemische Charakterisierung der Lokalisation von phosphoryliertem p53 (pSer<sup>15</sup>) wurden formalinfixierte und paraffineingebettete Lungenparallelschnitte von jeweils sechs gleich alten F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>, F3 *Terc*<sup>(-/-)/SPC-GFP</sup>- und wt-Mäusen untersucht (Abb.24 A und B).

Phospho-p53-positive Zellen kamen sowohl in wt- als auch in Knockout-Mäusen vor. In allen untersuchten Schnitten waren phospho-p53-positive Zellen mit und ohne Kolokalisation mit dem Typ-II-Zellmarker proSP-C zu beobachten, wobei die Immunanfärbung für p-p53 in den Lungenschnitten von Wildtyp-Mäusen wesentlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 24 B). Auffällig war auch, dass die Zahl der Zellen mit Kolokalisation beider Marker in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)/SPC-GFP</sup>-Lungenschnitten höher war als in den Schnitten aus wt-Mauslungen (Abb. 24 A, Kolokalisation beider Marker durch Pfeile verdeutlicht).

Die Proteinexpressionsanalyse für p21 wurde mittels Westernblot aus Lungengewebe von 4 Monate alten F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) und gleichaltrigen wt-C57Bl/6J-Mäusen (n=6) durchgeführt.

Der sich im Western Blot als Banden darstellende Gehalt an p21 in den Proben wurde densitometrisch ausgewertet und auf  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle genormt (Abb. 24, Grafik C). Im ungepaarten T-Test zeigte sich eine im Vergleich zum Wildtyp hochsignifikant höhere (p=0,0022) p21-Proteinexpression in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen.



**Abbildung 24:** Proteinexpressionsanalyse von p53 und p21 in F3 Terc<sup>-/-</sup>- und F3 Terc<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen versus Wildtypmäuse.

Grafik A und B zeigen repräsentative Färbungen von seriellen Lungenschnitten aus 4 Monate alten F3 Terc<sup>-/-</sup>-, F3 Terc<sup>-/-</sup>/SPC-GFP- und gleichaltrigen wt-Mäusen mit Antikörpern gegen den Typ-II-Zellmarker proSP-C und phospho-p53 (pSer<sup>15</sup>). Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation der beiden Marker, die insbesondere in den Knockout-Mäusen zu beobachten ist.

Grafik C zeigt eine quantitative Western Blot-Analyse einschließlich densitometrischer Auswertung für p21 aus Lungengewebe von F3 Terc<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu gleich alten C57Bl/6J-Mäusen. Die Expression von β-Aktin diente als Ladungskontrolle. \*\*p ≤ 0,01, durch t-Test.

**Abkürzungen:** GFP= Green Fluorescent Protein, kDa= Kilodalton, p21= Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1, p-p53= an Serin 15 phosphoryliertes p53, SP-C= Surfactant Protein C, Terc= Telomerase RNA Component

### 3.3. Genexpressionsanalysen in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse

Aus Lungengewebe von sechs *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen sowie sechs *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen der dritten Generation wurden Marker für ER-Stress, Inflammation, zelluläre Seneszenz und oxidativen Stress mittels semiquantitativer RT-PCR auf Transkriptionsebene untersucht und mit dem Genexpressionsmuster von sechs Wildtypmäusen verglichen. Die PCR-Produkte wurden auf ethidiumbromidhaltigen, 2-prozentigen Agarosegelen aufgetrennt und mit dem Gel Doc XR+ - Imager von BioRad dokumentiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Image Lab. Durch Normierung der sich auf dem Agarosegel ergebenden Bandenintensitäten auf  $\beta$ -Aktin- beziehungsweise Gapdh-Banden derselben Proben wurde ein statistischer Vergleich der relativen Expressionsstärke der jeweiligen Gene mittels T-Test ermöglicht. Hierfür wurde die Software GraphPad Prism 5 verwendet.

#### 3.3.1. Genexpressionsanalysen in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse

Abb. 25 zeigt die komparative Genexpressions-Analyse o.g. zellulärer Stressmarker in F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) versus gleichaltriger C57Bl/6J-Wildtypmäuse (n=6).

Die *Sftpc*-Expression war zwischen den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und Wildtypmäusen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 25 A und B).

Auch die Expression der untersuchten ER-Stressmarker gespleißtes *Xbp1* und *Chop* unterschied sich zwischen Wildtyp und *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen nicht signifikant. (Abb. 25, A,D und E). Lediglich die Expression von *Atf6* war in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen mit  $p=0,0088$  signifikant höher als in den Kontrollen (Abb. 25, A und C).

Die Expression der für proinflammatorische Proteine kodierenden Gene *Casp11* ( $p=0,0286$ ), *Nlrp3* ( $p=0,0286$ ) und *Il1b* ( $p=0,049$ ) und des für ein an der Apoptose beteiligtes Protein kodierenden Gens *Dr5* ( $p=0,0048$ ) war in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren deutlich erhöht (Abb. 25 A und F-I).

Auch die Seneszenz- beziehungsweise Zellzyklusarrestmarker *Cip1/p21* ( $p=0,0013$ ) und *Cdkn2a/p16* ( $p=0,0048$ ) wurden in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen signifikant stärker exprimiert (Abb. 25 A, J und K).

Im Folgenden werden einige Grundlagen zu den untersuchten Genen erläutert.

NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3) ist die Sensorkomponente des kanonischen NLRP3-Inflammasoms. Dieses aktiviert Caspase 1, die wiederum IL-1 $\beta$ , Interleukin 18 und Gasdermin in ihre aktiven Formen spaltet, wodurch die Pyroptose ausgelöst wird [294]. ER-Stress ist ein potenter Aktivator des NLRP3-Inflammasoms [235, 310].

IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Entstehung von Fieber, Vasodilatation, Hypotension und gesenkter Schmerzschwelle vermittelt. Zudem fördert es die Migration von Immunzellen und ist an der Stimulation von T-Zellen sowie an Proliferation und Differenzierung der B-Zellen beteiligt [115]. Im Rattenmodell der Lungenfibrose hat IL-1 $\beta$  jedoch auch eine deutliche profibrotische Wirkung [243].

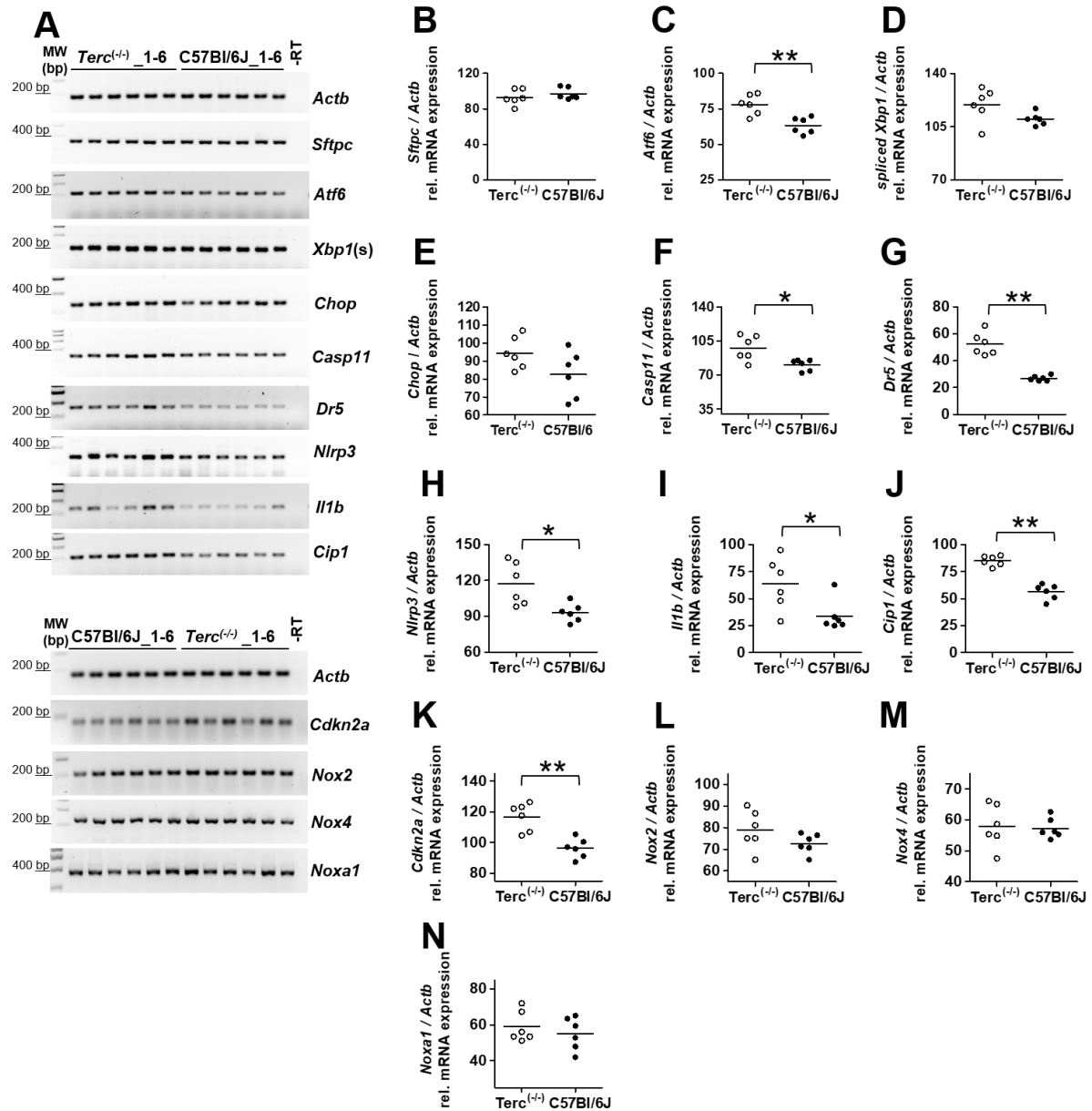
Death Receptor 5 (Dr5) ist in Mäusen der einzige pro-apoptotisch wirkende TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Rezeptor, in humanen Zellen gibt es mit DR4 und DR5 zwei dieser Rezeptoren [308]. Nach TRAIL-Bindung entsteht an DR5 ein als Death-Inducing Signaling Complex (DISC) bezeichneter Komplex, der die Procaspase 8 (in humanen Zellen auch Procaspase 10) und infolgedessen die Effektorcaspasen 3,6 und 7 aktiviert. Diese spalten entweder auf direktem Weg Struktur- und Regulatorproteine wie caspaseaktivierte DNAsen oder lösen durch BID-Spaltung den intrinsischen Apoptoseweg aus [308, 439].

Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A/p16) ist ein Tumorsuppressorprotein, das als Marker der zellulären Seneszenz gilt. Aktiviert wird CDKN2A beispielsweise durch DNA-Schäden, oxidativen Stress, Onkogene oder verkürzte Telomere [382]. CDKN2A bindet die zyklinabhängigen Kinasen 4 und 6, wodurch deren Kinasefunktion gehemmt wird [305]. Infolgedessen wird das Retinoblastoma-Associated Protein (RB) nicht phosphoryliert und inhibiert weiter den Transkriptionsfaktor E2F1, wodurch der Zellzyklus am G1-S-Übergang arretiert wird [134].

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Genen fanden sich in der Expression der für NADPH-Oxidasen kodierenden Gene *Nox2* und *Nox4* sowie in der Expression von *Noxa1* keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen (Abb. 25 A und L-N).

NADPH-Oxidase Isoform 2 und 4 (NOX2 und NOX 4) sind die katalytischen Untereinheiten von Enzymen, die zur Familie der ROS-produzierenden NADPH-Oxidasen gehören. Die zelluläre ROS-Produktion dient der Pathogenabwehr, weiterhin

sind ROS als Signalmoleküle an diversen zellulären Signalwegen beteiligt [70, 276, 342, 529]. Ein Übermaß an ROS führt jedoch zu schädlichem oxidativen Stress [76]. NOX Activator 1 (NOXA1) ist ein cytosolisches Protein, das zur Aktivierung von NOX1-NOX3 beiträgt [35, 36, 227].



**Abbildung 25:** Genexpression von zellulären Stressmarkern in Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen versus Wildtypmäuse.

Dargestellt sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR für Marker von ER-Stress, Surfactantprozessierung, Inflammation, Seneszenz, Apoptose und oxidativen Stress in Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) und C57Bl/6J-Mäusen (n=6). Grafik A zeigt Agarosegele mit den per Gelelektrophorese aufgetrennten und durch ethidiumbromidvermittelte Fluoreszenz sichtbar gemachten PCR-Produkten der jeweiligen Gene. Grafiken B bis N stellen die Quantifizierungen der jeweiligen mRNA-Transkripte dar, welche auf die Genexpression von *Actb* normiert wurden. \*\*p < 0.01, \*p < 0.05, durch t-Test. P-Werte korrigiert nach Benjamini-Hochberg, angegebene p-Werte sind bereits korrigiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

### 3.3.2. Genexpressionsanalysen in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse

Abb. 26 zeigt die komparative Genexpressionsanalyse zellulärer Stressmarker in 16 Wochen alten F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-SPC-GFP-Mäusen (n=6) versus gleichaltrigen C57Bl/6J-Wildtypmäusen. Im Folgenden werden die Ergebnisse genauer beleuchtet. Zudem werden Grundlagen zu einigen der untersuchten Gene, die in der Einleitung noch nicht erwähnt worden waren, erläutert.

Die Expression der für Surfactantproteine kodierenden Gene war in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen insgesamt vermindert. Der Unterschied zum Wildtyp war für *Sftpb* (p= 0,001) und *Sftbc* (p= 0,0052) signifikant, verpasste für *Sftpa* jedoch das Signifikanzniveau (p= 0,097) (Abb. 26 A-D). Surfactantprotein B (SP-B) ist ein von Typ-II-Pneumozyten sekretiertes stark hydrophobes Surfactantprotein, das für die Reduktion der alveolären Oberflächenspannung essentiell ist. Ein ausgeprägter Mangel an SP-B führt bereits in der Neonatalperiode zum letalen Respiratory Distress Syndrome [34, 279, 341].

Die Expression der ER-Stressmarker *Atf6*, gespleißtes *Xbp1*, *Canx*, *Edem1*, *Grp78* und *Chop* in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen unterschied sich nicht signifikant von der in den Wildtypmäusen (Abb. 26 A, E-I & K). Die Expression von *Trb3* verpasste mit p=0,0788 knapp das Signifikanzniveau (Abb. 26, A und J).

Die Expression des proinflammatorischen *Casp11*- Gens war in den KO-Mäusen signifikant verstärkt (p= 0,001) (Abb. 26 A und L).

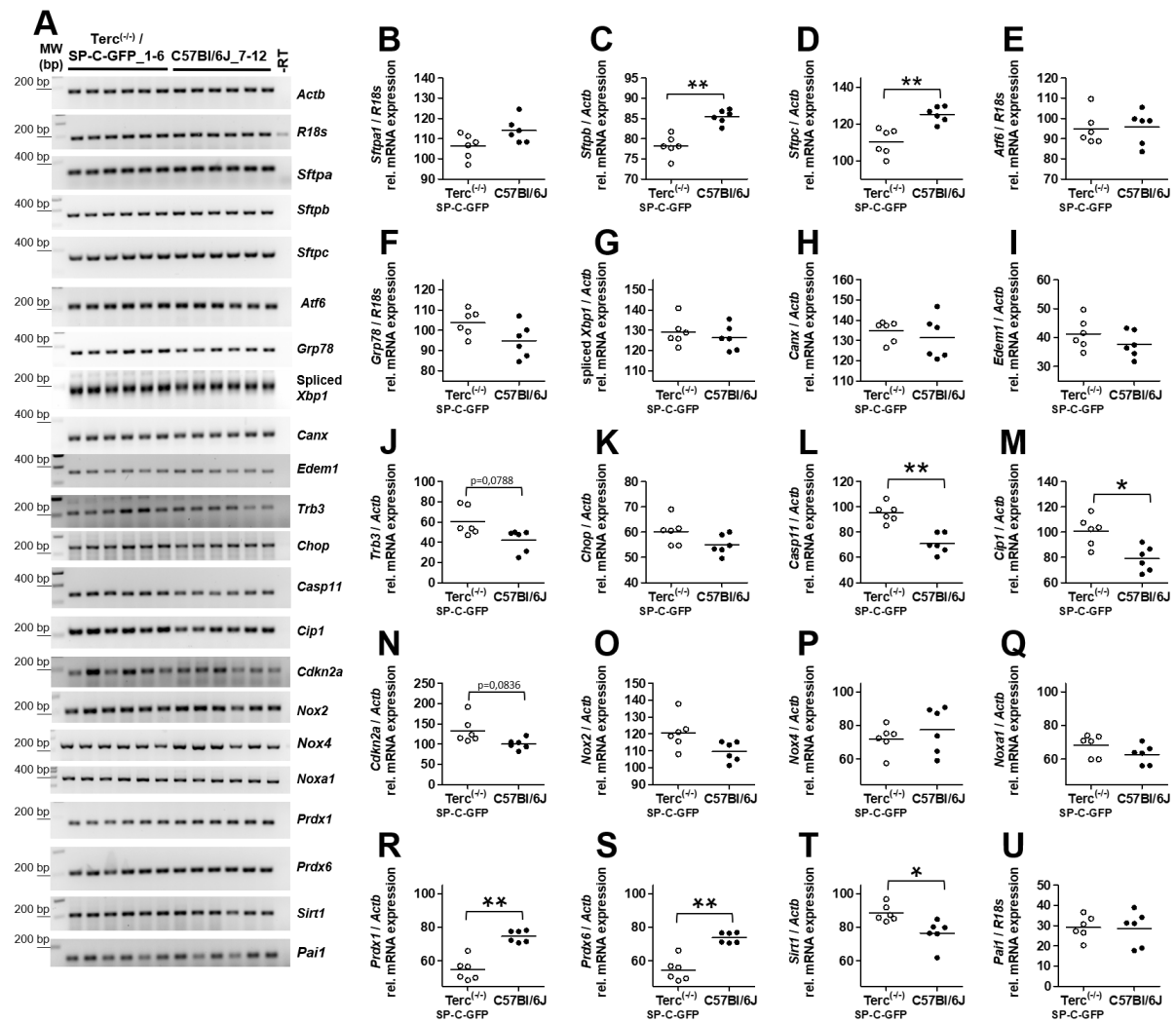
Dasselbe gilt für den Seneszenzmarker *Cip1* (p= 0,0183), dessen Expression in den Knockout-Tieren ebenfalls signifikant erhöht war (Abb. 26, A und M). Im Gegensatz hierzu war die Expression von *Cdkn2a* in den KO-Mäusen mit p=0,0836 zwar erhöht, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (Abb. 26 A und N).

Die Expression der für eine NADPH-Oxidasen bzw. einen NADPH-Oxidasen-Aktivator kodierenden Gene *Nox2*, *Nox4* sowie *Nox1* zeigte keine Unterschiede zwischen *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen und den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 26 A, O-Q).

Auffällig war die signifikant niedrigere Expression der für antioxidative Peroxireduktasen (Peroxiredoxine) kodierenden Gene *Prdx1* (p= 0,001) und *Prdx6* (p=0,001) in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen (Abb. 26 A, R,S). Peroxiredoxine sind Enzyme, die dem Abbau von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden dienen und die Zelle somit vor ROS schützen. Sie reduzieren Peroxide zu den entsprechenden Alkoholen und werden dabei selbst an Cysteinresten oxidiert. Säugerzellen exprimieren sechs Isoformen von Peroxiredoxinen (PRDX1- PRDX6) [375].

Weiterhin wurde die Expression von *Sirt1* untersucht. Sie war in den KO-Mäusen mit  $p=0,0311$  signifikant höher als in den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 26 A und T). Sirtuin1 (SIRT1) ist eine Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)- abhängige Deacetylase der Sirtuinfamilie, die sowohl Histone als auch Nichthistonproteine an Lysinresten deacetyliert [376]. SIRT1 ist an vielen unterschiedlichen Signalwegen beteiligt. Hierzu gehören epigenetisches Silencing bestimmter Gene durch Histondeacetylierung, die Regulation der Langlebigkeit unter Kalorienrestriktion in diversen Modellorganismen, Schutz vor oxidativem Stress, Inhibition der p53-induzierten Seneszenz und Regulation der Telomerlänge [260, 358, 376]. Im Mausmodell wirkt *Sirt1* darüber hinaus hemmend auf die bleomycininduzierte Lungenfibrose [91].

Abschließend wurde die *Pa1l*-Expression untersucht. Sie unterschied sich zwischen den KO-Mäusen und Wildtypmäusen nicht (Abb. 26 A und U). PAI1 ist ein Serinproteaseninhibitor aus der Familie der Serpine. PAI1 inhibiert verschiedene Proteasen, aber insbesondere die Serinproteasen Tissue-type Plasminogen Activator (tPA, PLAT) und Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA, PLAU). Durch tPA oder uPA zu aktivem Plasmin gespaltenes Plasminogen spaltet einerseits im Rahmen der Auflösung von Thromben Fibrin. Andererseits kann es auch Bestandteile der extrazellulären Matrix entweder direkt oder durch Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMP's) spalten [430]. Sowohl tPA als auch uPA sind darüber hinaus selbst in der Lage, MMP's durch Spaltung zu aktivieren [201, 543]. Eine Inhibition von tPA und uPA durch PAI1 bewirkt dementsprechend einen vermindertem EZM-Abbau [430]. Außerdem gilt PAI1 als Marker und Mediator der Seneszenz [381].



**Abbildung 26:** Genexpressionsanalyse von zellulären Stressmarkern in Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP- versus Wildtypmäusen

Dargestellt sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR für Marker von ER-Stress, Surfactantprozessierung, Inflammation, Seneszenz, Apoptose, Fibrose und oxidativen Stress in Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen (n=6) und C57Bl/6J-Mäusen (n=6). Grafik A zeigt Agarosegele mit den per Gelelektrophorese aufgetrennten und durch ethidiumbromidvermittelte Fluoreszenz sichtbar gemachten PCR-Produkten der jeweiligen Gene. Grafiken B bis U stellen die Quantifizierungen der jeweiligen mRNA-Transkripte dar, welche auf die Genexpression von *Actb* bzw. *R18S* normiert wurden. \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*p ≤ 0.01, \*p ≤ 0.05, durch t-Test. P-Werte korrigiert nach Benjamini-Hochberg, angegebene p-Werte sind bereits korrigiert.

### 3.4 Untersuchungen zur Surfactantprozessierung in *Terc*<sup>-/-</sup> und *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen mittels Western Blot-Methodik

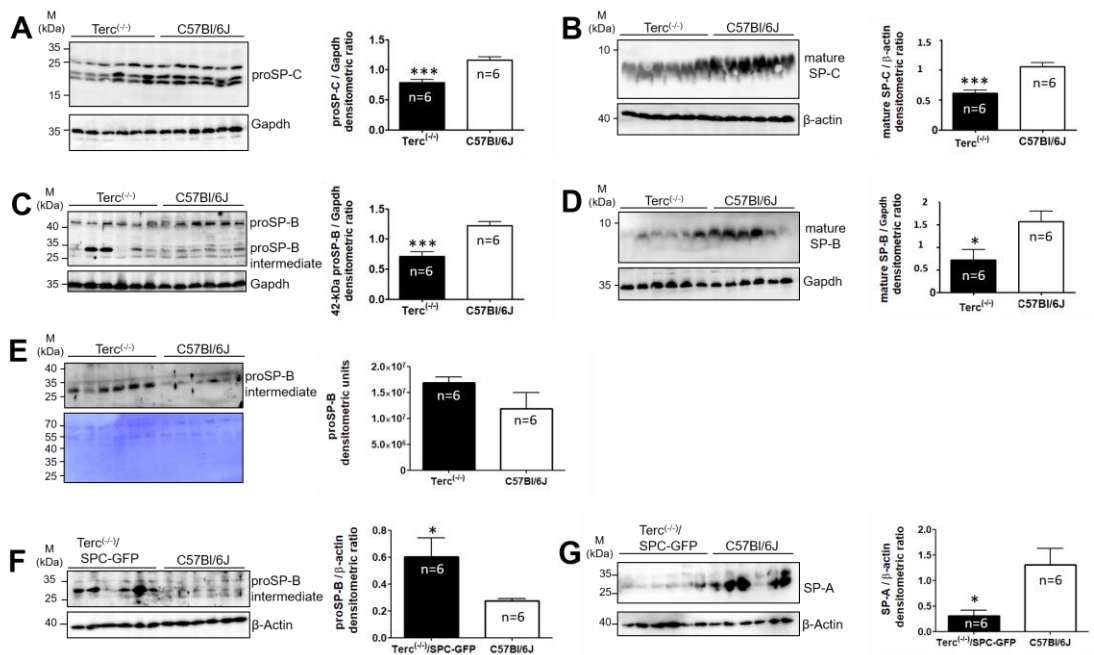
Die Proteinexpressionsanalyse für die Surfactantproteine SP-A, proSP-B, matures SP-B, proSP-C sowie für matures SP-C wurde mittels Westernblot aus Lungengewebe von F3-*Terc*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=6), F3-*Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen (n=6) sowie Wildtyp-Mäusen des C57Bl/6J-Stammes (n=6) durchgeführt (alle 16 Wochen alt). Zusätzlich wurden BAL-

Proben der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und wt-Mäuse (jeweils n=6) per Western Blot mit einem Antikörper gegen proSP-B untersucht (Abb.27).

Auf Proteinlevel war proSP-C in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit  $p < 0,0005$  hochsignifikant niedriger als in den C57Bl/6J-Mäusen (Abb. 27 A). Dies bestätigte sich bei der Analyse der Menge an maturem SP-C aus Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse, die im Vergleich zum Wildtyp mit  $p < 0,0005$  ebenfalls hochsignifikant verringert war (Abb. 27 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich für SP-B. Im Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse war das Proteinlevel an proSP-B im Vergleich zum Wildtyp mit  $p < 0,0005$  hochsignifikant, die Menge an maturem SP-B mit  $p = 0,0273$  signifikant verringert (Abb. 27 C und D).

Interessanterweise fanden sich trotz der reduzierten Gesamtmenge der Surfactantproteine deutlich höhere Level eines 25kDa SP-B-Intermediats in den Knockoutmäusen im Vergleich zum Wildtyp. Im Lavageblot der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse war diese Erhöhung mit  $p = 0,1383$  zwar sichtbar, jedoch nicht signifikant (Abb. 27 E). Im Western Blot aus Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse war die Menge an 25 kDa-SP-B-Intermediat mit  $p = 0,044$  dagegen signifikant erhöht (Abb. 27 F).

Der Mangel an reifem Surfactantprotein B in den Lungen der telomerasedefizienten Mäuse bei einem gleichzeitig sowohl in der BAL als auch im Lungengewebe der Knockoutmäuse im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhten Level an SP-B-Intermediat könnte auf eine durch die Telomerverkürzung verursachte SP-B-Prozessierungsstörung hinweisen. Hierauf wird im Rahmen der Diskussion in Kapitel 5.2 genauer eingegangen. Abschließend wurde das Proteinlevel von SP-A im Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse analysiert. Auch hier fand sich eine im Vergleich zum Wildtyp mit  $p = 0,014$  signifikant verringerte Proteinexpression in den KO-Mäusen (Abb. 27 G).



**Abbildung 27:** Analyse der Proteinexpression der Surfactantproteine in den  $F3-Terc^{-/-}$ - und  $F3-Terc^{-/-}/SPC-GFP$ -Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

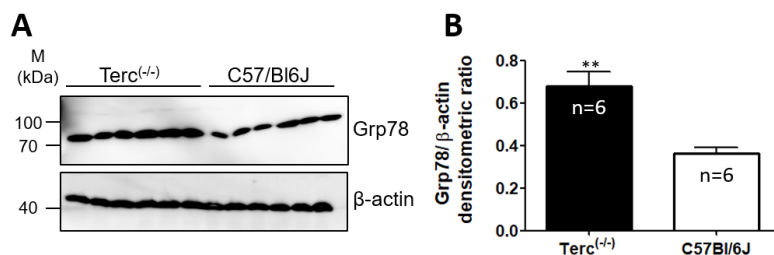
Die Grafiken A-D, F und G zeigen quantitative Western Blot-Analysen einschließlich densitometrischer Auswertungen für die Surfactantproteine SP-A, proSP-B, 25 kDa proSP-B-Intermediat, SP-B, proSP-C und SP-C aus Lungengewebe von  $F3 Terc^{-/-}$ -Mäusen (n=6, Grafiken A-D) sowie  $F3 Terc^{-/-}/SPC-GFP$ -Mäusen (n=6, Grafiken F&G) im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen (n=6). Die Expression von  $\beta$ -Aktin oder Gapdh diente als Ladungskontrolle. Grafik E zeigt einen quantitativen Western Blot des 25 kDa SP-B-Intermediates aus der BAL von  $Terc^{-/-}$ -Mäusen (n=6), die Coomassie-Färbung der Blotmembran diente als Ladungskontrolle. \*\*\* $p \leq 0.001$ , \* $p \leq 0.05$ , durch t-Test.

**Abkürzungen:** Gapdh= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GFP= Green Fluorescent Protein, kDa= Kilodalton, proSP-B= unprozessiertes Surfactantprotein B, proSP-C= unprozessiertes Surfactantprotein C, SP-A= Surfactantprotein A, SP-B= Surfactantprotein B, SP-C= Surfactant Protein C, Terc= Telomerase RNA Component, Wt= Wildtyp

### 3.5 Untersuchung der Grp78-Proteinexpression in Lungen von $Terc^{-/-}$ - und $Terc^{-/-}/SPC-GFP$ -Mäusen per Western Blot und Immunhistochemie

Grp78 ist ein Chaperon des ER, das unter ER-Stressbedingungen verstärkt exprimiert wird [264]. Um herauszufinden, ob Telomerverkürzung zu vermehrter Grp78-Synthese führt, wurden in der vorliegenden Arbeit Western Blots aus Lungengewebe von  $Terc^{-/-}$ - (n=6) und Wildtyp-C57Bl/6J-Mäusen (n=6) durchgeführt.

Im ungepaarten T-Test zeigte sich eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere ( $p=0,0018$ ) Grp78-Proteinexpression in den  $Terc^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 28). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass verkürzte Telomere zur Akkumulation un- oder fehlgefalteter Proteine führen.



**Abbildung 28:** Grp78-Proteinexpression im Lungengewebe von *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Grafik A zeigt den Western Blot für Grp78 aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu wt-C57Bl/6J-Mäusen (n=6) sowie die Ladungskontrolle als Blot von  $\beta$ -Aktin. Grafik B zeigt die densitometrische Auswertung des Western Blots.  $p \leq 0,01$ , durch t-Test.

**Abkürzungen:** GRP78= 78kDa Glucose Regulated Protein, kDa= Kilodalton, Terc= Telomerase RNA Component

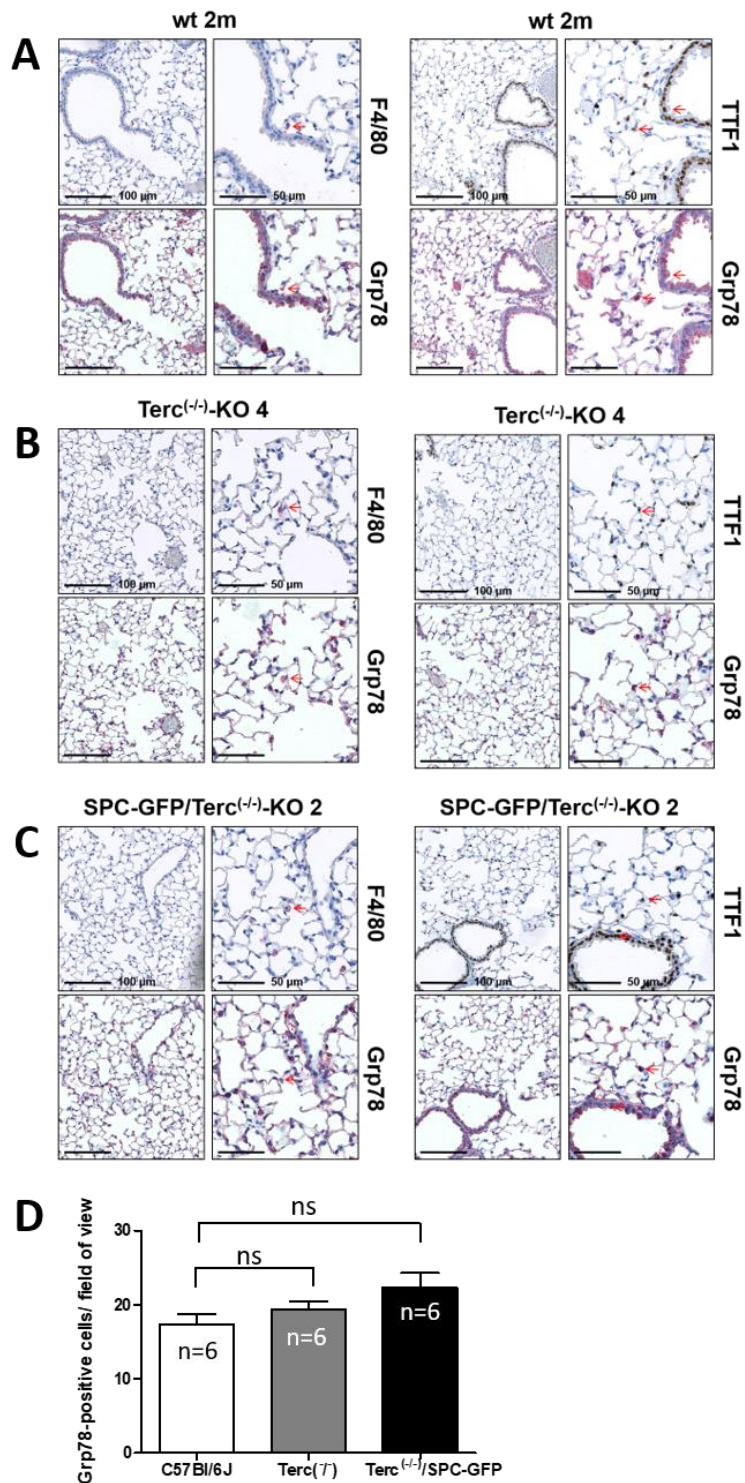
Um herauszufinden, in welchen Zellen muriner Lungen Grp78 exprimiert wird, wurden formalinfixierte, paraffineingebettete Lungenschnitte von jeweils sechs F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-, F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- und wt-Mäusen immunhistochemisch untersucht (Abb. 29). Es wurden pro Maus drei Parallelschnitte untersucht, wobei jeweils einer mit einem Antikörper gegen Grp78 gefärbt wurde. Die beiden Parallelschnitte wurden mit Antikörpern gegen die Zellmarker Thyroid Transcription Factor 1 (Ttf1) und F4/80 inkubiert (Abb. 29 A-C).

Ttf1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in den follikulären Zellen der Schilddrüse sowie in Typ-II-Zellen des Alveolarepithels exprimiert wird. Zudem ist Ttf1 in zilienlosen Bronchialzellen wie Club-Zellen nachweisbar [204]. In der Lunge reguliert Ttf1 die Transkription der Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-C sowie des Clara Cell Secretory Proteins (CCSP) [62]. F4/80 ist ein Glykoprotein, das auf murinen Makrophagen exprimiert wird und als Makrophagenmarker gilt [29].

Eine Kolokalisation von Grp78 mit Ttf1 bzw. F4/80 fand sich sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen. Die Ttf1-positiven Zellen waren morphologisch sowohl Typ-II- als auch in bronchiolären Clara-Zellen (Abb. 29 A-C, Kolokalisation durch rote Pfeile verdeutlicht). Dies spricht dafür, dass Grp78 einerseits in Typ-II- und Clubzellen, andererseits aber auch in Makrophagen von Wildtyp- und telomerasedefizienten Mäusen zu finden ist.

Um die Zahl der Grp78-positiven Zellen in den KO-Stämmen in Vergleich zum Wildtyp zu quantifizieren, wurden pro untersuchtem Schnitt (1 Schnitt/Maus, jeweils sechs F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-, F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- und wt-Mäuse) drei Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung manuell ausgezählt. Hier ergab sich im T-Test eine in den KO-Mäusen beider Stämme im Vergleich zum Wildtyp eine nichtsignifikant höhere durchschnittliche

Zahl von Grp78-positiven Zellen pro Gesichtsfeld (Abb. 29, Grafik D). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Western Blot (Abb. 28).



**Abbildung 29:** IHC-Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression von Grp78 in Lungengewebe von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Grafiken A-C zeigen repräsentative Färbungen von seriellen Lungenschnitten von F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-, F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- und wt-Mäusen. Die Lungenschnitte wurden mit Antikörpern einerseits gegen Grp78 und andererseits gegen den Typ II- und Club-Zellmarker Ttf1 sowie den Makrophagenmarker F4/80 immunhistochemisch gefärbt. Die Kolokalisation der Zellmarker mit Grp78 zeigte sich

sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen in Typ-II- und Clubzellen bzw. Makrophagen. Sie wurde in der Grafik durch rote Pfeile verdeutlicht.

In Grafik C wird die durchschnittliche Zahl der Grp78-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung und Auszählung von drei Gesichtsfeldern pro Schnitt im Vergleich zwischen *Terc*<sup>(-/-)</sup>- (n=6), *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- (n=6) und wt-Mäusen (n=6) veranschaulicht. Es zeigt sich eine in den KO-Mäusen nichtsignifikant höhere Zahl an positiven Zellen pro Gesichtsfeld.

**Abkürzungen:** GFP= Green Fluorescent Protein, GRP78= 78kDa Glucose Regulated Protein, SPC= Surfactantprotein C, *Terc*= Telomerase RNA Component, TTF1= Thyroid Transcription Factor 1, Wt= Wildtyp.

### 3.6 Untersuchung der Xbp1- sowie Chop-Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen per Western Blot und Immunhistochemie

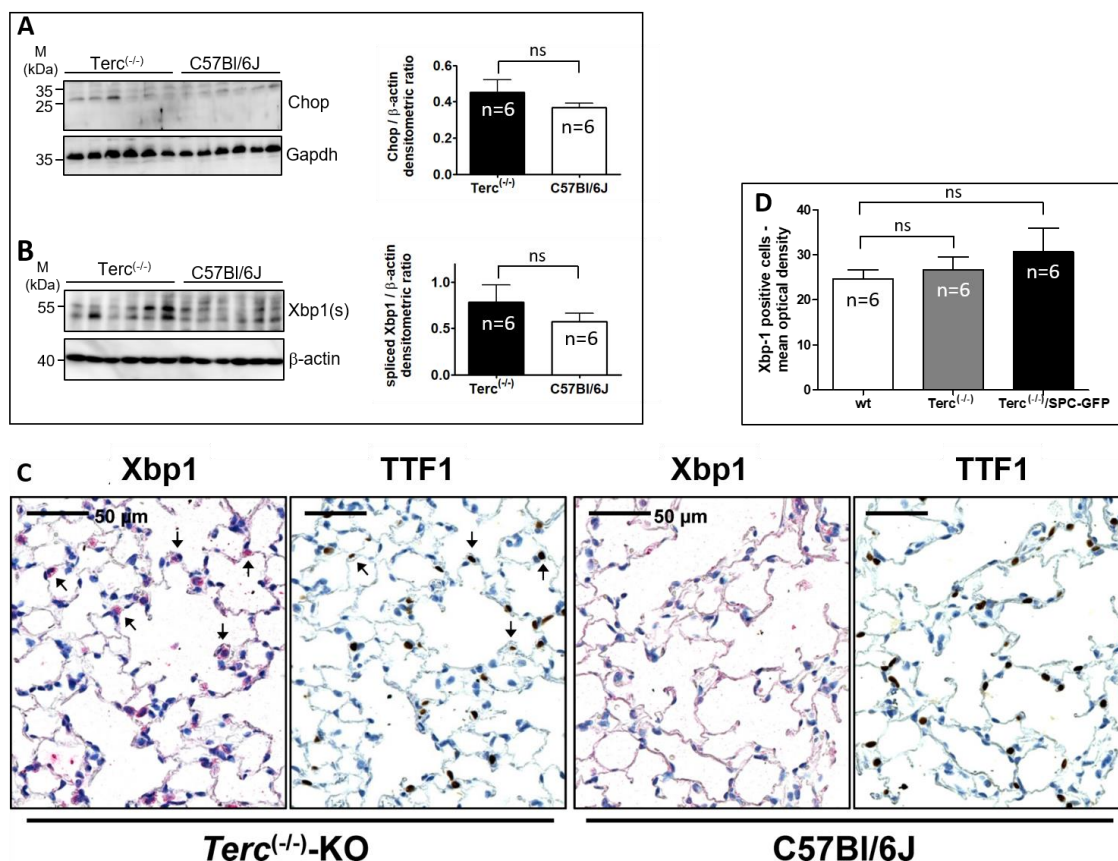
Die Bestimmung des Proteinlevels der Transkriptionsfaktoren Xbp1 und Chop wurde mittels Westernblot aus Lungengewebe von F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) und Wildtyp-Mäusen des C57Bl/6J-Stammes (n=6) durchgeführt (Abb.30).

Es ergab sich im T-Test für beide Proteine in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine leicht, aber nicht signifikant erhöhte Expression.

Um herauszufinden, in welchem pulmonalen Zelltyp das Xbp1-Protein exprimiert wird, wurde eine immunhistochemische Färbung von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungenparallelschnitten aus F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>- (n=6), F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- (n=6) und Mäusen des Wildtyps (n=6) durchgeführt.

Es zeigte sich eine deutliche Kolo-kalisation von Ttf-1 mit Xbp-1. Auf der Proteinebene lässt sich Xbp1 folglich in Typ II- sowie Club-Zellen nachweisen (Abb. 30, Grafik C).

Die Quantifizierung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung. Hier bestätigte sich das Ergebnis aus dem Western Blot: Die Menge der Xbp1-positiven Zellen war in den Lungenschnitten aus Knockout-Mäusen zwar etwas höher als in den Wildtypmäusen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 30, Grafik D).



**Abbildung 30:** Untersuchung der Xbp1- sowie Chop-Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>-/-</sup>- und *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Grafiken A und B zeigen die Ergebnisse der quantitativen Western Blot-Analysen für Chop und Xbp1(s) aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen. Die Expression von β-Aktin bzw. Gapdh diene als Ladungskontrolle. \*\*\*p ≤ 0.001, \*p ≤ 0.05, durch t-Test. Die rechten Grafikbereiche stellen die densitometrische Auswertung der Western Blots dar: Die Proteinmenge von Chop und Xbp1(s) unterscheidet sich zwischen KO- und Wildtypmäusen nicht signifikant.

Grafik C zeigt repräsentative Färbungen von Parallelschnitten aus Lungen von F3-*Terc*<sup>-/-</sup>- und Wildtypmäusen. Die Lungenschnitte wurden mit Antikörpern einerseits gegen Xbp1(s) und andererseits gegen den Typ II- und Club-Zellmarker Ttf1 immunhistochemisch gefärbt, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Kolokalisation des Zellmarkers mit Xbp1(s) wird durch die schwarzen Pfeile verdeutlicht.

In Grafik D wird die durchschnittliche Zahl der Xbp1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung und Auszählung von drei Gesichtsfeldern pro Schnitt im Vergleich zwischen *Terc*<sup>-/-</sup>- (n=6), *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP- (n=6) und wt-Mäusen (n=6) veranschaulicht. Es zeigt sich eine in den KO-Mäusen nichtsignifikant höhere Zahl an positiven Zellen pro Gesichtsfeld.

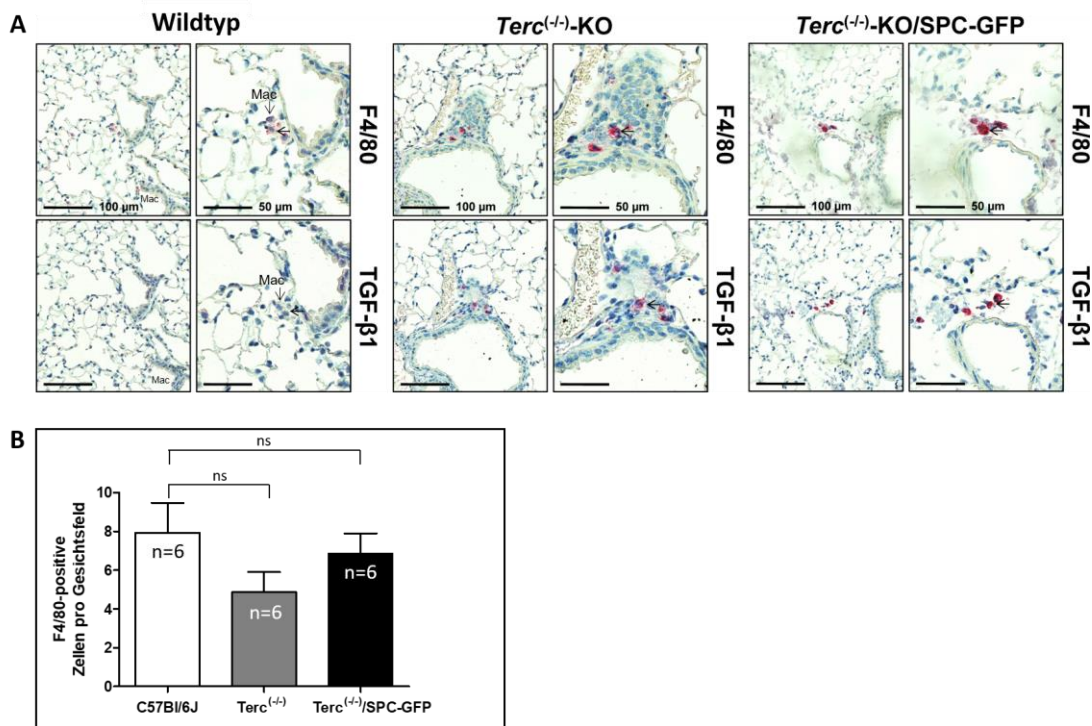
**Abkürzungen:** Chop= C/EBP Homologous Protein, Gapdh= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GFP= Green Fluorescent Protein, kDa= Kilodalton, SPC= Surfactantprotein C, *Terc*= Telomerase RNA Component, TTF1= Thyroid Transcription Factor 1, Xbp1(s)= gespleißte Form von X-Box Binding Protein 1

### 3.7 Untersuchung der TGF-β-Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>-/-</sup>- und *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen per Immunhistochemie

TGF-β ist ein Zytokin, das in praktisch allen Geweben exprimiert wird und seine Wirkung nach Rezeptorbindung über die Mothers Against Decapentaplegic Homolog (SMAD) – Transkriptionsfaktoren entfaltet [185]. TGF-β ist für die pulmonale Organogenese während der Embryonalentwicklung essentiell und übt in der adulten Lunge eine starke profibrotische Wirkung aus [65, 399].

Für die Untersuchung der Expression von TGF- $\beta$  auf Proteinebene wurden serielle Schnitte formalinfixierter und paraffineingebetteter Mauslungen (F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup> (n=6), F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP (n=6) und Wildtypmäuse (n=6)) per IHC gefärbt.

In den Wildtyp-Mäusen fanden sich keine TGF- $\beta$ -positiven Zellen. Im Gegensatz hierzu wurden in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen vereinzelte Zellen angefärbt. Dabei fiel eine deutliche Kolokalisation mit F4/80 auf, was darauf schließen lässt, dass die TGF- $\beta$ -Quelle im vorliegenden Modell Alveolarmakrophagen sind (Abb. 31 A). Um herauszufinden, ob sich die Makrophagenzahl insgesamt zwischen Wildtyp-C57Bl/6J- und KO-Mäusen unterscheidet, wurde die Zahl der F4/80-positiven Zellen pro Gesichtsfeld mit Hilfe des Programmes NDP.view2 bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Überraschenderweise war die gesamte Makrophagenzahl in den beiden KO-Stämmen im Vergleich zu den Wt-Mäusen verringert. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 31 B).



**Abbildung 31:** Untersuchung der TGF- $\beta$ -Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp per Immunohistochemie.

Grafik A zeigt repräsentative Färbungen von Parallelschnitten aus Lungen von F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-, F3-*Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- und Wildtypmäusen. Die Lungenschnitte wurden mit Antikörpern einerseits gegen TGF- $\beta$  und andererseits gegen den Makrophagenmarker F4/80 immunohistochemisch gefärbt, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Nur in den KO-Mäusen zeigen sich Kolokalisationen zwischen den beiden Markern (durch Pfeile verdeutlicht), in den Wildtypmäusen gibt es keine TGF- $\beta$ -positiven Zellen, obwohl die gesamte Makrophagenzahl in den wt-Lungen höher ist.

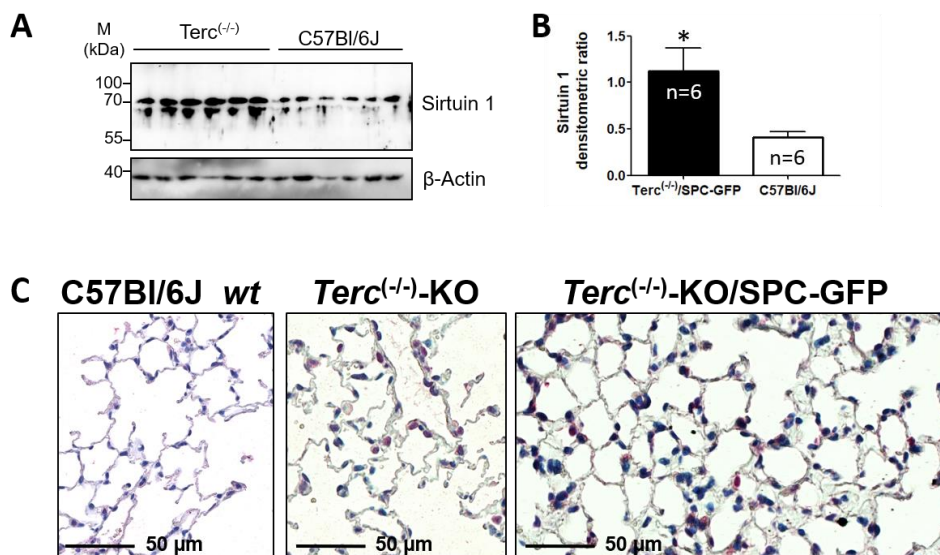
In Grafik B wird die durchschnittliche Zahl der F4/80-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung im Vergleich zwischen *Terc*<sup>(-/-)</sup>- (n=6), *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP- (n=6) und wt-Mäusen (n=6) veranschaulicht. Die Makrophagenzahl ist in den KO-Mäusen niedriger als im Wildtyp, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant

**Abkürzungen:** GFP= Green Fluorescent Protein, KO= Knockout, SPC= Surfactant Protein C, Terc= Telomerase RNA Component, TGF- $\beta$ 1= Transforming Growth Factor beta 1

### 3.8 Untersuchung der Sirt1-Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen per IHC und Western Blot

Die Bestimmung des Sirt1-Proteinlevels wurde mittels Westernblot aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) und Wildtyp-Mäusen des C57Bl/6J-Stammes (n=6) durchgeführt (Abb. 32, Grafik A und B). Hier zeigte sich im T-Test eine in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen signifikant höhere Sirt1-Proteinmenge (p= 0,0197).

Dieses erhöhte Proteinlevel spiegelte sich in der durchgeführten Immunhistochemie wider. Die Zahl der Sirt1-positiven Zellen (wahrscheinlich Typ-II-Zellen) war in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- sowie den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen größer als in den Wildtyp-Tieren. Sirt1 wurde dabei sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch angefärbt (Abb. 32, Grafik C).

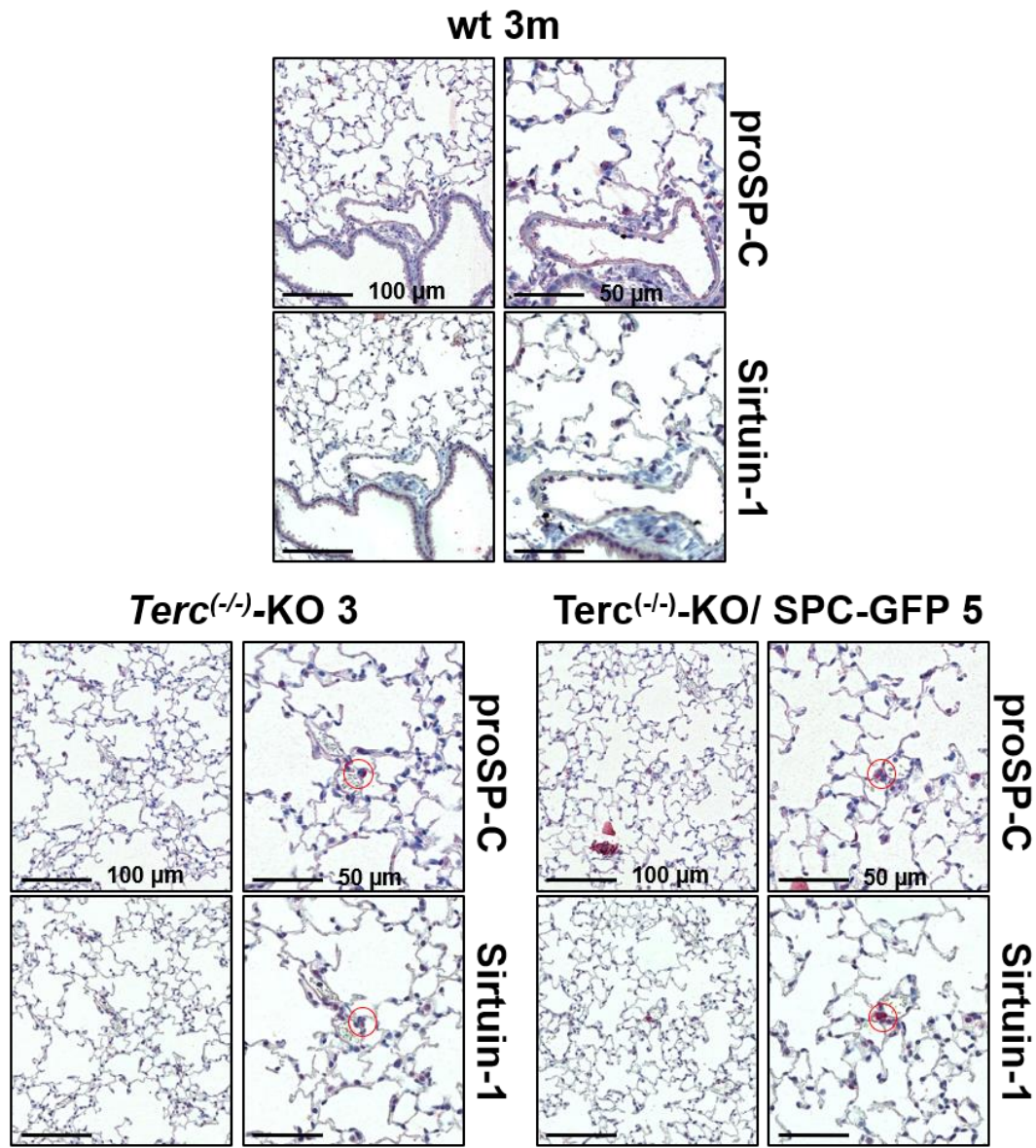


**Abbildung 32:** Untersuchung der Sirt1-Proteinexpression in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp per Western Blot und Immunhistochemie.

Grafik A zeigt den Western Blot für Sirt1 aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu wt-C57Bl/6J-Mäusen (n=6). Grafik B stellt die densitometrische Auswertung des Blots dar: \*p≤0,05, durch t-Test. Grafik C zeigt repräsentative IHC-Färbungen mit einem Sirt1-Antikörper. In den KO-Mäusen sind deutlich mehr Zellen angefärbt als in den Schnitten aus Wildtypmäusen. Sirt1 lässt sich zytoplasmatisch und nukleär nachweisen.

**Abkürzungen:** GFP= Green Fluorescent Protein, kDa= Kilodalton, KO= Knockout, SPC= Surfactantprotein C, Terc= Telomerase RNA Component, wt= Wildtyp

In den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen fiel in Parallelschnitten auf, dass viele der Sirt1-positiven Zellen auch proSP-C-positiv waren (Abb. 33). In den Wt-Mäusen waren diese Kollokalisierungen zwar auch vorhanden, aber seltener. Hier waren generell weniger Sirt1-positive Zellen zu sehen (Abb. 33). Dies spricht dafür, dass die Typ-II-Zellen der Knockoutmäuse die Hauptquelle von Sirt1 waren.



**Abbildung 33:** Lokalisation des Sirt1-Proteins in *Terc*<sup>(-/-)</sup>, *Terc*<sup>(-/-)</sup>-SPC/GFP- und Wildtypmäusen per Immunhistochemie.

Die Grafik zeigt repräsentative Parallelschnitte der drei Mausstämme. Es wurde jeweils ein Parallelschnitt pro untersuchter Mauslung mit einem Antikörper gegen den Typ-II-Zellmarker proSP-C und der folgende mit einem Sirt1-Antikörper gefärbt. Die roten Kreise verdeutlichen die Kolokalisation der Zellmarker mit Sirt1 in den KO-Mäusen.

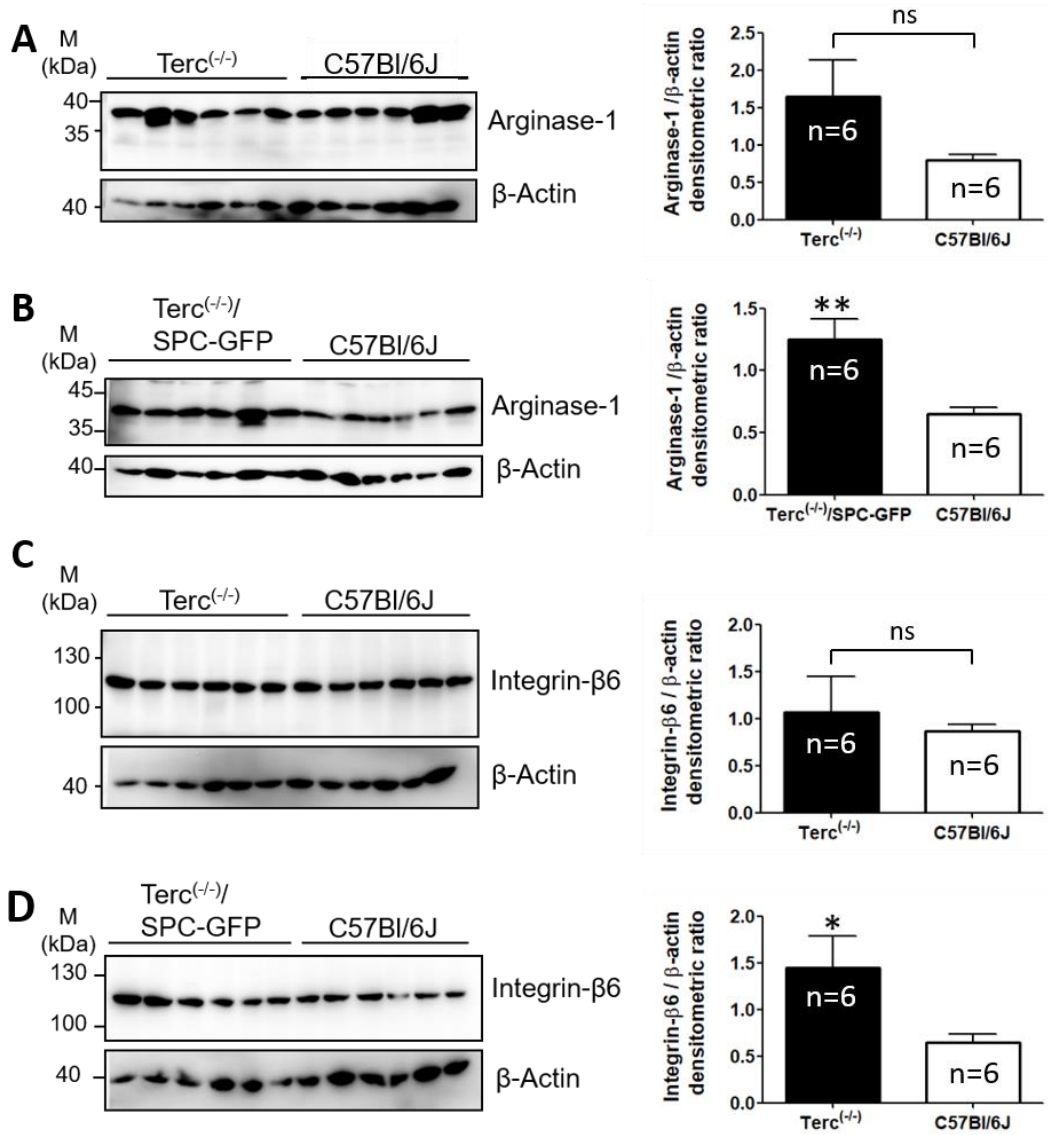
### 3.9 Untersuchung der Arginase-1- und Integrin-β6 – Expression in Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen durch Immunhistochemie und Western Blot-Methodik

Arginase-1 ist ein Enzym, das die Spaltung von Arginin in Harnstoff und Ornithin katalysiert und als Marker muriner M2-Makrophagen etabliert ist [453]. Während die klassisch aktivierten M1-Makrophagen der Abwehr von Pathogenen dienen, sind M2-Makrophagen an Wundheilung, Reparatur und Entfernung apoptotischer Zellen beteiligt

[64, 313]. Sie produzieren proliferations- bzw. wachstumsfördernde Cytokine wie TGF- $\beta$ , Epidermal Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und sind in der Lage, T<sub>H</sub>2-Zellen und regulatorische T-Zellen zu rekrutieren und aktivieren [313, 314].

Integrin- $\beta$ 6 ist die Beta-Untereinheit des Transmembranproteins Integrins  $\alpha$ v $\beta$ 6, welches in Epithelien exprimiert wird [491].  $\alpha$ v-Integrine sind für die Aktivierung von TGF- $\beta$  über die RGD-Sequenz des Latency-associated Peptide (LAP) essentiell [426]. Hierbei liegt TGF- $\beta$  im Komplex mit LAP und Latent Transforming Growth Factor beta-binding Protein (LTBP) in der extrazellulären Matrix vor und wird durch über das Integrin übertragenen mechanischen Scherstress aus dem Komplex freigesetzt [20, 496].

Die Analyse der Proteinexpression von Arginase-1 und Integrin- $\beta$ 6 erfolgte per Western Blot (WB) aus Lungengewebe von jeweils sechs Mäusen (Generation F3) der drei Stämme (Abb. 34). Die Proteinexpression von Integrin- $\beta$ 6 und Arginase-1 war in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen zwar höher als in den Wildtyp-Tieren, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 34, Grafiken A und C). Allerdings war die Menge der beiden Proteine in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht. Der Unterschied war hierbei mit p=0,0059 (Arginase-1) bzw. p=0,042 (Integrin- $\beta$ 6) deutlich signifikant (Abb. 34, Grafiken B und D). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die pulmonalen Makrophagen der KO-Mäuse vermehrt in M2-Richtung polarisiert werden.



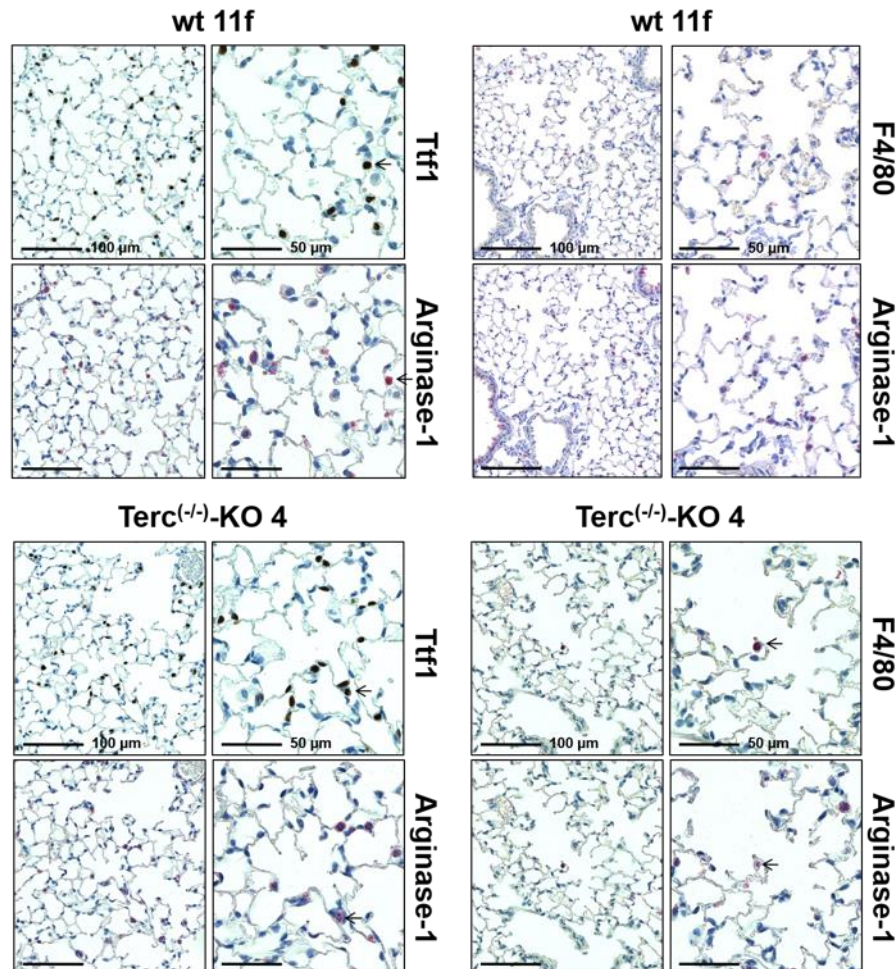
**Abbildung 34:** Proteinexpression (Western Blot) von Arginase-1 und Integrin-β6 in Lungen von Terc<sup>(-/-)</sup>- und Terc<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Grafiken A-D zeigen quantitative Western Blot-Analysen einschließlich densitometrischer Auswertungen für Arginase-1 und Integrin-β6 aus Lungengewebe von F3 Terc<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6, Grafiken A und C) sowie F3 Terc<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen (n=6, Grafiken B&D) im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen. Die Expression von β-Aktin diente als Ladungskontrolle. \*\*p ≤ 0.01, \*p ≤ 0.05, durch t-Test.

**Abkürzungen:** kDa= Kilodalton, KO= Knockout, SPC= Surfactantprotein C, Terc= Telomerase RNA Component,

Um herauszufinden, in welchen pulmonalen Zellen Arginase-1-Protein exprimiert wird, wurden formalinfixierte und paraffineingebettete Parallelschnitte per IHC auf Arginase-1-Expression untersucht. Sowohl in den Wildtyp-Mauslungen als auch in beiden Terc<sup>(-/-)</sup>-Stämmen fanden sich Kollokalisierungen zwischen F4/80 und Arginase-1. Allerdings waren in den C57Bl/6J-Mäusen mehr F4/80-positive Zellen Arginase-1-negativ als in den Terc<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (Abb. 35). F4/80 ist ein allgemeiner Makrophagenmarker, die Arginase-1-negativen Makrophagen könnten beispielsweise M1-Makrophagen sein. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass sich in den Lungen der KO-Mäuse im Vergleich zum Wt mehr M2- und weniger M1-Makrophagen befinden. Interessanterweise fanden

sich in allen Mäusen zudem Kolokalisationen zwischen Ttf1 und Arginase-1, was dafür spricht, dass sowohl in den Knockoutmäusen als auch in den Wildtyptieren auch Typ II-Zellen oder Club-Zellen Arginase-1 exprimieren. Hier war kein Unterschied zwischen den  $Terc^{(-/-)}$ ,  $Terc^{(-/-)}$ /SPC-GFP und Wildtypmäusen zu erkennen (Abb. 35).



**Abbildung 35:** Lokalisationsbestimmung des Arginase-1-Proteins in  $Terc^{(-/-)}$ -Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen per Immunhistochemie.

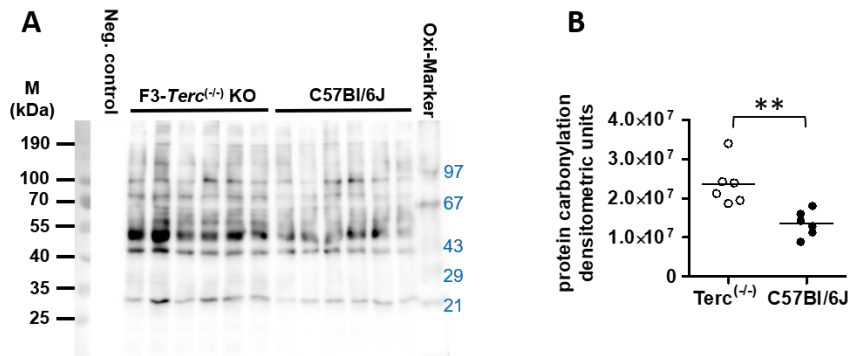
Die Grafik zeigt repräsentative Färbungen von Parallelschnitten aus Lungen von F3- $Terc^{(-/-)}$ - und Wildtypmäusen. Die Lungen wurden mit Antikörpern gegen Arginase-1 und in dazu parallelen Schnitten mit Antikörpern gegen F4/80 und Ttf1 gefärbt. Die schwarzen Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen beiden Zellmarkern und Arginase-1. Arginase-1 findet sich sowohl in den Wt- als auch in den  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen in Typ II- bzw. Club-Zellen und in Makrophagen. In den Wildtypmäusen sind jedoch mehr Makrophagen Arginase-1-negativ als in den  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen.

**Abkürzungen:** KO= Knockout, Terc= Telomerase RNA Component, Ttf1= Thyroid Transcription Factor 1, wt= Wildtyp

### 3.10 Untersuchung der Proteinoxidation in Lungen von F3 $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, zeigte sich in der RT-PCR aus Lungengewebe der  $Terc^{(-/-)}$ /SPC-GFP-Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp hochsignifikant verringerte Expression von *Prdx1* und *Prdx6* (Abb. 26). Dies weist auf eine verringerte antioxidative Abwehr hin und könnte die Mäuse anfälliger gegenüber oxidativem Stress machen. Da ROS den Faltungsprozess von Proteinen im ER stören und somit ER-Stress verursachen können, sind sie auch als möglicher Auslöser von ER-Stress denkbar. Aus diesem Grund

wurde in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß der Proteinoxidation in den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu C57Bl/6J-Wildtyptieren (n=6) untersucht. Im ungepaarten T-Test zeigte sich eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere (p≤ 0,01) Proteinoxidation in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Proteinoxidation in F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Die Grafiken zeigen die quantitative Western Blot-Analyse einschließlich densitometrischer Auswertung für die Menge oxidierten Proteins (nachgewiesen über anti-DNP-Antikörper, die an die derivatisierten „DNP-Carbonyle“ binden) aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (n=6) im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen (n=6). Die Expression von  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle. \*\*p ≤ 0.01, durch t-Test.

**Abkürzungen:** F3= 3. Generation, kDa= Kilodalton, KO= Knockout, M=Molmasse, neg.= negativ, Oxi-Marker= Größenstandard mit oxidierten Proteinen bekannter Molmasse, Terc= Telomerase RNA Component

#### 4. Zelluläre Konsequenzen der Telomeraseinhibition in A549-Zellen *in vitro*

Für die Untersuchung des Einflusses von Telomeraseinhibition und der damit verbundenen Telomerverkürzung auf die Genexpression von surfactantassoziierten Genen, zellulären Stressmarkern, Genen des antioxidativen Stoffwechsels, Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes, Sirtuinen sowie Fibrose- und Inflammationsmarkern wurden A549-Zellen für 19 Wochen in der Anwesenheit des Telomeraseinhibitors BIBR1532 (Boehringer Ingelheim) in einer Konzentration von 20  $\mu$ M kultiviert. Als Kontrolle wurden A549-Zellen für denselben Zeitraum mit Vehikel [0.04 % (v/v) DMSO] behandelt. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche passagiert, wobei bei jeder Passagierung BIBR1532 bzw. Vehikel frisch zugesetzt wurden.

Die RNA aus den Passagen 11 (eine Woche lang kultiviert), 19 (fünf Wochen kultiviert) und 46 (19 Wochen kultiviert) wurde jeweils für die Untersuchung der Genexpression, wie in Kapitel 2.16 und 2.17 beschrieben, aufgearbeitet.

#### 4.1 Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von surfactantassoziierten Genen

Zuerst wurde der Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression der für die surfactantprozessierenden Proteasen Napsin A (*NAPSA*), Cathepsin H (*CTSH*) und Pepsinogen C (*PGC*) kodierenden Gene untersucht. Weiterhin wurde die Expression von *ABCA3*, dem für den Surfactantlipidtransporter in der Lamellenkörperchenmembran kodierenden Gen, untersucht.

In Passage 11 war die *ABCA3*-Expression in den telomeraseinhibierten Zellen ( $T^-$ ) mit  $p=0,0005$  signifikant höher als in den vehikelbehandelten Zellen ( $T^+$ ). Auch in Passage 19 (P19) war dieser Unterschied mit  $p=0,004$  noch signifikant. Da jedoch die Expression von *ABCA3* in  $T^+$  zwischen Passage 11 (P11) und Passage 46 (P46) mit  $p=0,0395$  signifikant zunahm, während sie in  $T^-$  stabil blieb, waren in P46 keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen  $T^+$  und  $T^-$  mehr zu beobachten (Abb. 37, Grafik A).

Das Cathepsin H-Gen (*CTSH*) war in P11 nicht differentiell reguliert. Da die Genexpression von *CTSH* in  $T^+$  jedoch im Laufe der Zeit mit  $p=0,0345$  signifikant zunahm, während sie in  $T^-$  mit  $p=0,0005$  signifikant abnahm, war die Expression in  $T^-$  ab P19 mit  $p=0,001$  signifikant niedriger als in  $T^+$ . In P46 war dieser Unterschied mit  $p=0,0005$  sogar noch deutlicher (Abb. 37, Grafik B).

Auch beim Napsin A-Gen (*NAPSA*) war in P11 kein Unterschied zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu beobachten. In P19 war die Expression in  $T^-$  mit  $p=0,041$  signifikant höher als in  $T^+$ , während sich dieser Effekt in P46 umgekehrt hatte (*NAPSA*-Expression mit  $p=0,0005$  in  $T^-$  signifikant niedriger). Insgesamt nahm die *NAPSA*-Expression sowohl in  $T^+$  ( $p=0,0005$ ) als auch in  $T^-$  ( $p=0,001$ ) über die Zeit signifikant zu (Abb. 37, Grafik C).

Die Expression des Pepsinogen-C-Gens (*PGC*) war zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu keinem Zeitpunkt unterschiedlich. Jedoch nahm die *PGC*-Expression in  $T^-$  zwischen P11 und P46 signifikant zu ( $p=0,015$ ) (Abb. 37, Grafik D).

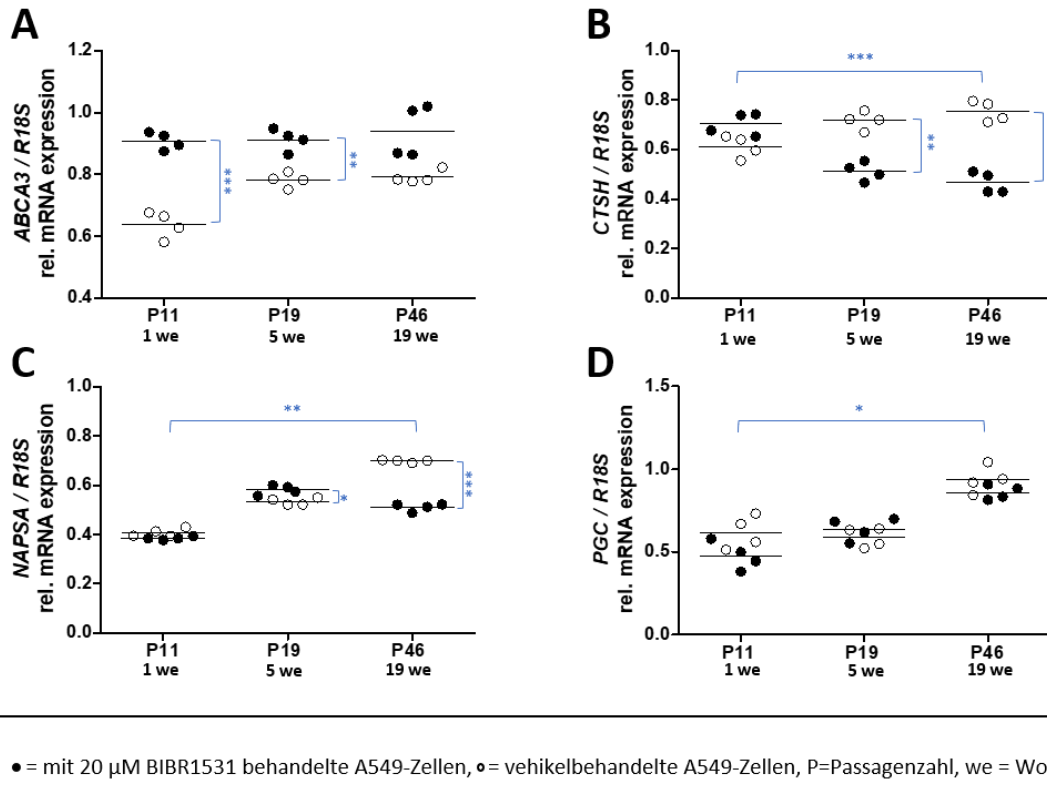


Abbildung 37: Expression von surfactantprozessierenden Proteasen in telomeraseinhibierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von *ABCA3*, *CTSH*, *NAPSA* und *PGC* in  $T^+$  bzw.  $T^-$  über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA (n=4 für  $T^+$  und  $T^-$ ). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:** *ABCA3*= Adenosine Triphosphate Binding Cassette Subfamily A Member 3, *CTSH*= Cathepsin H, mRNA= messenger RNA, *NAPSA*= Napsin A, P= Passagenzahl, *PGC*= Pepsinogen C, R18S= 18S rRNA, rel= relativ,  $T^+$ = mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen,  $T^-$ = unbehandelte A549-Zellen, we= Wochen.

## 4.2 Einfluss der Telomeraseinhibition auf Unfolded Protein Response, Zellzyklusarrest und Apoptose

Um die Folgen der verkürzten Telomere auf die zelluläre Stressantwort zu testen, wurden Gene der adaptiven und proapoptotischen UPR, der Apoptose sowie des Zellzyklusarrests untersucht.

Die Genexpression von *ATF6* blieb in  $T^+$  über die gesamte Zeit unverändert. In  $T^-$  zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der *ATF6*-Expression zwischen P11 und P46 ( $p=0,011$ ). Dadurch war das *ATF6*-Level in P19 mit  $p=0,0005$  in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$ . Dieser Unterschied war in P46 unverändert hoch ( $p=0,0005$ ) (Abb. 38, Grafik A). Die Expression von *ATF4* war in  $T^-$  zu jedem Zeitpunkt höher als in  $T^+$ . In P11 war dieser Unterschied mit  $p=0,009$  signifikant, in P19 mit  $p=0,0005$  und in P46 mit  $p=0,0025$ . Insgesamt nahm die *ATF4*-Genexpression über die 19 Wochen sowohl in  $T^+$  ( $p=0,0006$ ) als auch in  $T^-$  ( $p=0,0002$ ) signifikant zu (Abb. 38, Grafik B).

Die Expression des ungespleißten *XBPI* blieb in  $T^+$  über den gesamten Zeitraum unverändert, während sie in  $T^-$  signifikant ( $p=0,0005$ ) zunahm. Hierdurch ergab sich in P46 eine signifikant ( $p=0,0095$ ) höhere *XBPI*-Genexpression in  $T^-$  (Abb. 38, Grafik C). Die Genexpression von *GRP78* veränderte sich über den Beobachtungszeitraum weder in  $T^+$  noch in  $T^-$  signifikant. Allerdings war sie durch eine nichtsignifikante Expressionszunahme in  $T^-$  in Kombination mit einer nichtsignifikanten Abnahme in  $T^+$  in P46 in den telomeraseinhibierten Zellen signifikant höher als in  $T^+$  ( $p=0,0325$ ). In P11 und P19 fand sich dagegen kein Expressionsunterschied zwischen  $T^+$  und  $T^-$  (Abb. 38, Grafik D).

Die Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1 (*HSP90B1*)-Genexpression blieb sowohl in  $T^+$  als auch in  $T^-$  über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant und war zwischen den beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich (Abb. 38, Grafik E). *HSP90B1* ist das für das ER-Chaperon GRP94 kodierende Gen. GRP94 ist nicht nur ein ER-Chaperon, sondern auch ein Teil des Calciumpuffers im ER und an der ERAD beteiligt [90, 129].

Die Expression von *CHOP* nahm in  $T^+$  ( $p=0,0005$ ) und  $T^-$  ( $p=0,0005$ ) über die Zeit signifikant zu. Dabei war sie durchgehend in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$ : In P11 war der Unterschied mit  $p=0,0005$  signifikant, in P19 mit  $p=0,0015$  und in P46 mit  $p=0,0005$  (Abb. 38, Grafik F).

Ähnliches ließ sich für die *TRB3*-Expression beobachten: Auch hier war eine signifikante Expressionserhöhung von  $T^-$  im Vergleich zu  $T^+$  sowohl in P11 ( $p=0,0005$ ) als auch in P19 ( $p=0,0005$ ) und in P46 ( $p=0,033$ ) zu beobachten. Zusätzlich nahm die *TRB3*-Expression im Zeitverlauf signifikant zu, im Fall von  $T^+$  mit  $p=0,0015$  und im Fall von  $T^-$  mit  $p=0,0245$  (Abb. 38, Grafik G).

Die Expression von *ASK1* war über die Zeit konstant, wobei  $T^-$  sowohl in P11 ( $p=0,007$ ) als auch in P19 ( $p=0,0005$ ) und in P46 ( $p=0,005$ ) eine signifikante Erhöhung gegenüber  $T^+$  zeigte (Abb. 38, Grafik H). *ASK1* ist ein Mitglied der Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K) – Familie, das aufgrund diverser zellulärer Stresssignale wie beispielsweise ER- oder oxidativer Stress aktiviert wird [178]. *ASK1* phosphoryliert und aktiviert dadurch MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K), die wiederum die MAP-Kinasen JNK und p38 aktivieren [410]. JNK und p38 induzieren die Transkription proapoptotischer Gene, phosphorylieren und inaktivieren aber auch direkt antiapoptotische Proteine der BCL2-Familie [295, 303, 312].

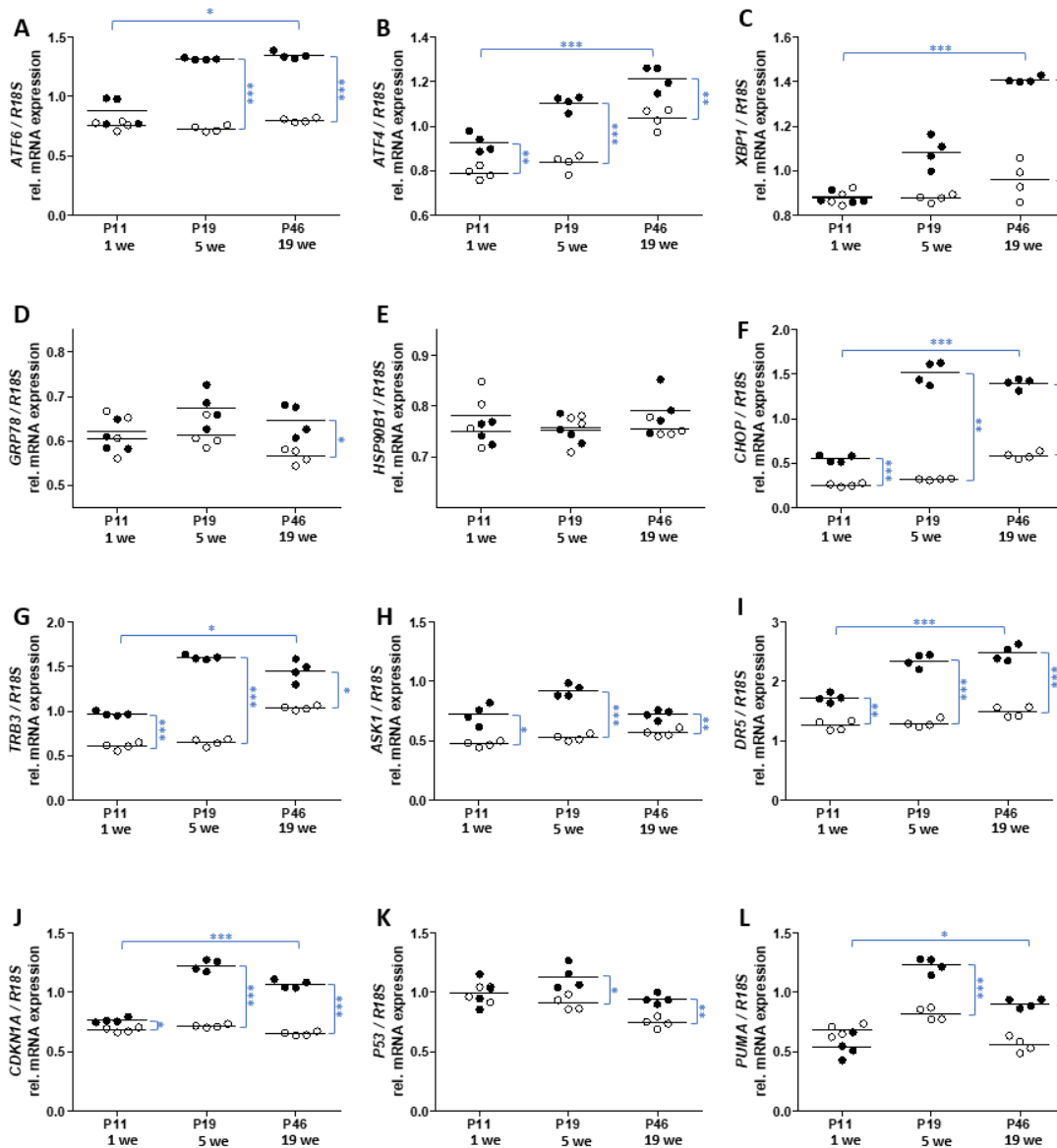
Die *DR5*-Expression nahm zwischen Passage 1 und Passage 46 in  $T^+$  mit  $p=0,043$ , in  $T^-$  mit  $p=0,0005$  signifikant zu. Dabei war sie zu jedem untersuchten Zeitpunkt in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$ : In Passage 11 mit  $p=0,001$ , in Passage 19 mit  $p=0,0005$  und in Passage 46 mit  $p=0,0005$  (Abb. 38, Grafik I).

Die Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (*CDKN1A*= *CIP1*)-Expression war bereits in P11 in  $T^-$  signifikant ( $p=0,0065$ ) höher als in  $T^+$ , in Passage 19 ( $p=0,0005$ ) und Passage 46 ( $p=0,0005$ ) wurde der Unterschied noch deutlicher. In  $T^+$  blieb die *CDKN1A*-Expression über die 19 Wochen konstant, während sie in  $T^-$  mit  $p=0,0005$  signifikant zunahm (Abb. 38, Grafik J).

Die *P53*-Expression war in P11 zwischen  $T^+$  und  $T^-$  nicht signifikant unterschiedlich. In Passage 19 ( $p=0,0485$ ) und Passage 46 ( $p=0,003$ ) fand sich jedoch signifikant mehr *p53* in  $T^-$  als in  $T^+$ . In  $T^-$  unterschied sich die *P53*-Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 nicht signifikant, während sie in  $T^+$  signifikant abnahm. Die *P53*-Expression hatte in  $T^-$  zwischen Passage 11 und Passage 19 zu-, dann jedoch wieder abgenommen, wodurch insgesamt keine signifikante Veränderung entstand (Abb. 38 Grafik K).

In der *PUMA*-Expression fand sich in P11 kein Unterschied zwischen den telomeraseinhibierten Zellen und den Kontrollen. In Passage 19 ( $p=0,0005$ ) und in Passage 46 ( $p=0,0005$ ) war sie dagegen in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$ . Insgesamt veränderte sich die *PUMA*-Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 in  $T^+$  nicht, während sie in  $T^-$  signifikant ( $p=0,011$ ) zunahm (Abb. 38, Grafik L). *PUMA* ist ein Mitglied der *BCL2*-Proteinfamilie, das alle antiapoptotischen *BCL2*-Proteine binden und dadurch inaktivieren kann. Hierdurch werden Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer (*BAK*) und *BAX* freigesetzt und der mitochondriale Apoptoseweg ausgelöst [81].

Die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Telomeraseinhibition *in vitro* proapoptotischen ER-Stress auslöst. Wie die verstärkte Transkription von *CDKN1A* (= *CIP1/p21*) zeigt, kommt es zusätzlich zu einem Zellzyklusarrest.



● = mit 20  $\mu$ M BIBR1531 behandelte A549-Zellen, ○ = vehikelbehandelte A549-Zellen, P=Passagenzahl, we= Wochen

Abbildung 38: Genexpression von ER-Stress-Markern in telomeraseinhibitierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von *ATF6*, *ATF4*, *XBP1* (ungespleißt), *GRP78*, *HSP90B1*, *CHOP*, *TRB3*, *ASK1*, *DR5*, *CDKN1A*, *P53* und *PUMA* in  $T^+$  bzw.  $T^-$  über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA (n=4 für  $T^+$  und  $T^-$ ). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:**  $T^+$ = mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen,  $T^-$  = unbehandelte A549-Zellen, we= Wochen, siehe Abkürzungsverzeichnis für Marker-Gene für ER-Stress.

### 4.3 Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Markern des oxidativen Stresses und Antioxidantien

Da in den vorangegangenen Mausexperimenten bei *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen mit verkürzten Telomeren eine vermehrte oxidative Belastung bei gleichzeitig verminderter Expression von Peroxiredoxinen beobachtet worden war (Abb. 26 und 36), wurden in den

telomeraseinhibitierten A549-Zellen ebenfalls Gene des oxidativen und antioxidativen Stoffwechsels untersucht.

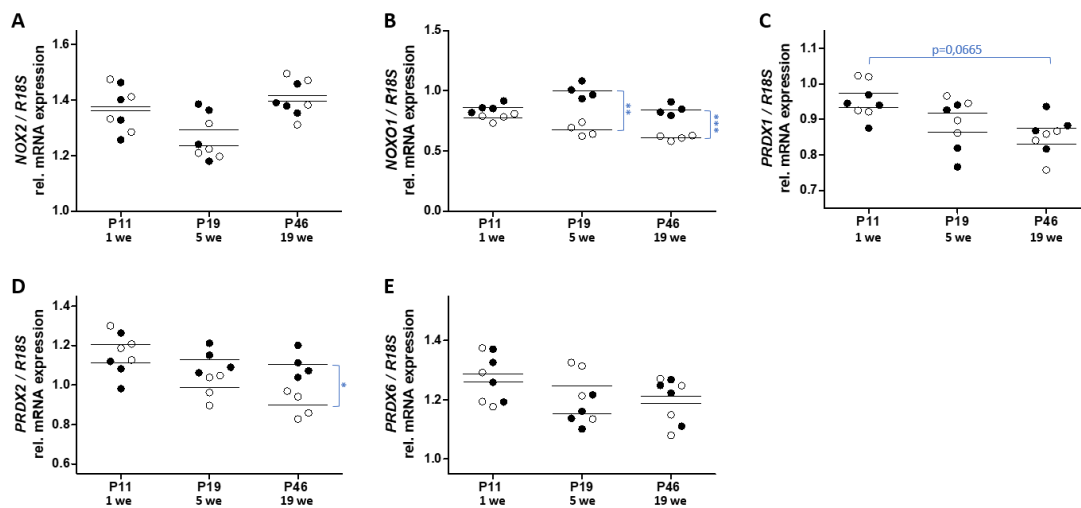
Die *NOX2*-Expression war zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. Zudem kam es im Verlauf der 19 Wochen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression (Abb. 39, Grafik A).

Bei *NOXO1* fanden sich in P11 keine Expressionsunterschiede zwischen  $T^+$  und  $T^-$ . Da die *NOXO1*-Expression jedoch in  $T^-$  zwischen Passage 11 und Passage 46 unverändert hoch blieb, während sie in  $T^+$  signifikant abnahm ( $p=0,0115$ ), ergab sich in Passage 19 ( $p=0,001$ ) und in Passage 46 ( $p=0,0005$ ) eine signifikant höhere *NOXO1*-Expression in den telomeraseinhibitierten Zellen (Abb. 39, Grafik B). Die NADPH-Oxidasen *NOX1-NOX4* sind nur im Komplex mit dem integralen Membranprotein Cytochrome B-245 Light Chain (P22phox) aktiv [18, 410]. *NOX1-NOX3* benötigen weiterhin einen Aktivator wie Neutrophil Cytosol Factor 2 (P67phox) oder *NOXA1* und/oder einen Organisator wie Neutrophil Cytosol Factor 1 (P47phox) oder NADPH Oxidase Organizer 1 (*NOXO1*) sowie ein kleines G-Protein [410]. Folglich kontrollieren *NOXO1* und *NOXA1*, ob und wie viel Superoxid in einer Zelle produziert wird [35].

Die *PRDX1*-Expression unterschied sich zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu keinem untersuchten Zeitpunkt. Allerdings nahm sie zwischen Passage 11 und Passage 46 sowohl in  $T^+$  (signifikant mit  $p=0,0415$ ) als auch in  $T^-$  (mit  $p=0,0665$  nicht signifikant) ab (Abb. 39, Grafik C).

Die *PRDX2*-Genexpression war in  $T^-$  über den Beobachtungszeitraum konstant hoch, während sie in  $T^+$  zwischen Passage 11 und Passage 46 mit  $p=0,0205$  signifikant abnahm. Dadurch war die *PRDX2*-Expression in Passage 46 mit  $p=0,026$  in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$  (Abb. 39, Grafik D).

Die *PRDX6*-Expression blieb über die Zeit unverändert und unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen  $T^+$  und  $T^-$  (Abb. 39, Grafik E).



● = mit 20  $\mu$ M BIBR1531 behandelte A549-Zellen, ○ = vehikelbehandelte A549-Zellen, P=Passagenzahl, we = Wochen

**Abbildung 39:** Expression von Genen des oxidativen und antioxidativen Stoffwechsels in telomeraseinhibierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von *NOX2*, *NOXO1*, *PRDX1*, *PRDX2* und *PRDX6* in  $T^+$  bzw.  $T^-$  über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA (n=4 für  $T^+$  und  $T^-$ ). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:** mRNA= messenger RNA, NOX2= NADPH-Oxidase Isoform 2, NOXO1= NADPH Oxidase Organizer 1, P= Passagenzahl, PRDX1- PRDX6 = Peroxiredoxin 1-6, R18S= 18S rRNA, rel= relativ,  $T^+$ = mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen,  $T^-$  = unbehandelte A549-Zellen, we= Wochen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Telomeraseinhibition in A549-Zellen, wenn überhaupt, eher zur vermehrten Expression prooxidativer Gene führt, während sie keinen Einfluss auf die Expression von für antioxidative Proteine kodierende Gene zu haben scheint. Die Veränderungen sind auch nur schwach ausgeprägt. Allerdings führt die Langzeitkultur von A549-Zellen unabhängig von der Telomerlänge zur Abnahme der Peroxiredoxin-Expression auf der Genebene.

#### 4.4 Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes

Die *TERC*-Expression war sowohl in Passage 11 (p=0,0195) als auch in Passage 19 (p=0,018) und in Passage 46 (p=0,008) in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$ . Die Dauer der Kultivierung hatte dabei keinen Einfluss auf die *TERC*-Expression (Abb. 40, Grafik A). Ähnlich verhielt sich die *TERT*-Expression, sie war zu jedem untersuchten Zeitpunkt in  $T^-$  höher als in  $T^+$ . In Passage 11 war dieser Unterschied mit p=0,002 signifikant, in P19 mit p=0,1075 nicht signifikant und in Passage 46 mit p=0,0165 wieder signifikant. Auch hier hatte die Kultivierungsdauer keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von *TERT* (Abb. 40, Grafik B).

Auch die Expression von *DKCI* war in Passage 11 ( $p=0,016$ ), Passage 19 ( $p=0,0005$ ) und Passage 46 ( $p=0,0005$ ) durchgehend in  $T^-$  höher als in  $T^+$ . Unabhängig vom Telomerasestatus veränderte sich die *DKCI*-Expression während der Dauer der Kultivierung nicht (Abb. 40, Grafik C).

Ebenso war die Expression von *GARI* in  $T^-$  in jeder untersuchten Passage höher als in  $T^+$ . Dieser Unterschied war in Passage 11 mit  $p=0,001$ , in Passage 19 mit  $p=0,0005$  und in Passage 46 mit  $p=0,0005$  immer signifikant. Zwischen Passage 11 und Passage 46 ergaben sich für *GARI* keine Expressionsunterschiede (Abb. 40, Grafik D).

Die *NOP10*-Expression blieb ebenfalls in  $T^+$  und in  $T^-$  über die 19 Wochen konstant. Sie war dabei sowohl in Passage 11 ( $p=0,001$ ) als auch in Passage 19 ( $p=0,0005$ ) und in Passage 46 ( $p=0,0205$ ) in  $T^-$  signifikant höher als in  $T^+$  (Abb. 40, Grafik E).

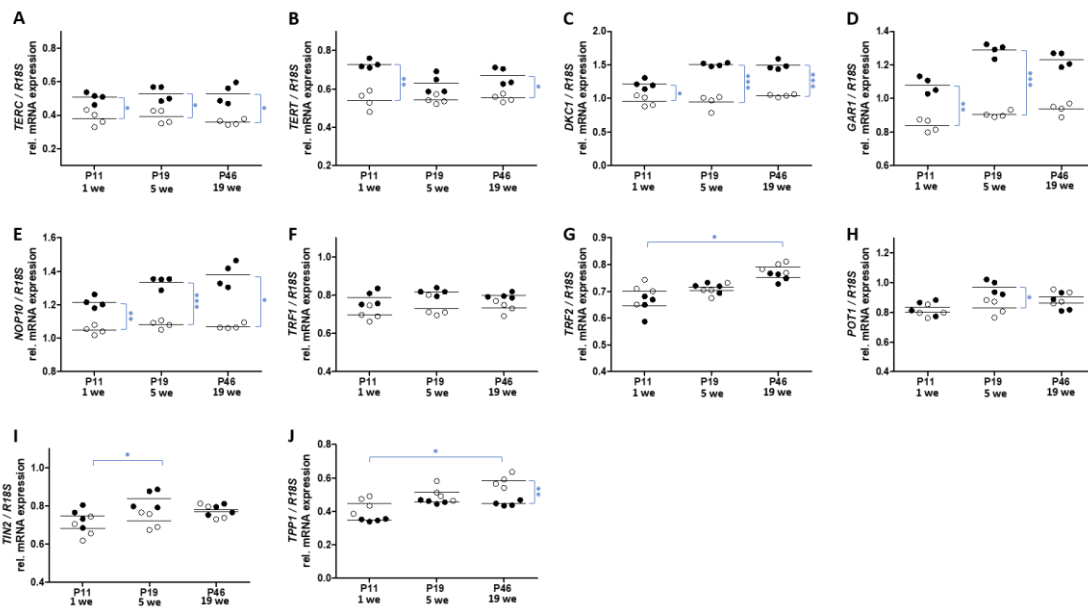
Die *TRF1*-Expression war dagegen zu keinem Zeitpunkt zwischen  $T^+$  und  $T^-$  signifikant unterschiedlich. Im zeitlichen Verlauf veränderte sich die Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 nicht signifikant (Abb. 40, Grafik F).

Auch für die *TRF2*-Expression ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen  $T^+$  und  $T^-$ . Allerdings nahm die Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 sowohl in  $T^+$  ( $p=0,0235$ ) als auch in  $T^-$  ( $p=0,0175$ ) signifikant zu (Abb. 40, Grafik G).

Die *POT1*-Expression war zwischen  $T^+$  und  $T^-$  weder in Passage 11 noch in Passage 46 unterschiedlich, in Passage 19 war sie in  $T^-$  jedoch knapp signifikant erhöht ( $p=0,049$ ). Zwischen Passage 11 und Passage 46 veränderte sich die Expression in  $T^-$  nicht, in  $T^+$  stieg sie signifikant an ( $p=0,023$ ) (Abb. 40, Grafik H).

Die Expression von *TIN2* war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zwischen  $T^+$  und  $T^-$  unterschiedlich. In der Zeit zwischen Passage 11 und Passage 46 nahm sie jedoch in  $T^+$  ( $p=0,01$ ) signifikant zu. In  $T^-$  ergab sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen P11 und P46, jedoch stieg die *TIN2*-Expression zwischen Passage 11 und Passage 19 mit  $p=0,044$  signifikant an (Abb. 40, Grafik I).

Die *TPPI*-Genexpression nahm zwischen Passage 11 und Passage 46 in  $T^+$  mit  $p=0,015$ , in  $T^-$  mit  $p=0,002$  signifikant zu. In Passage 11 und Passage 19 ergaben sich dabei keine Unterschiede zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , in Passage 46 war die Expression in  $T^+$  dagegen signifikant ( $p=0,0035$ ) höher als in  $T^-$  (Abb. 40, Grafik J).



● = mit 20  $\mu$ M BIBR1531 behandelte A549-Zellen, ○ = vehikelbehandelte A549-Zellen, P=Passagenzahl, we= Wochen

**Abbildung 40:** Genexpression von Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes in telomeraseinhibitierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von TERC, TERT, DKC1, GAR1, NOP10, TRF1, TRF2, POT1, TIN2 und TPP1 in T<sup>+</sup> bzw. T<sup>-</sup> über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA (n=4 für T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup>). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup>, gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\*p  $\leq$  0.001, \*\*p  $\leq$  0.01, \*p  $\leq$  0.05.

**Abkürzungen:** T<sup>-</sup>= mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen, T<sup>+</sup> = unbehandelte A549-Zellen, we= Wochen, siehe Abkürzungsverzeichnis für Gene des Shelterin- und Telomerasekomplexes.

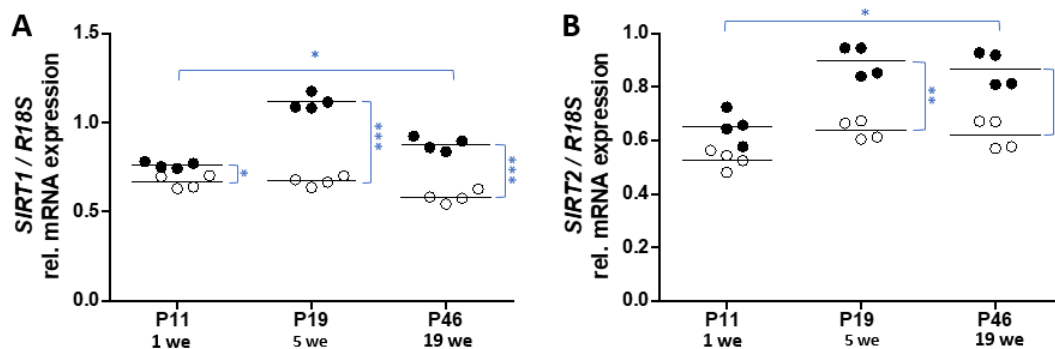
Diese Ergebnisse zeigen, dass Blockade von Telomerase-Aktivität zur Induktion von Komponenten des Telomerase-Multienzymkomplexes führt. Dies ist vermutlich als kompensatorischer Mechanismus anzusehen. Im Gegensatz hierzu bleibt die Expression von Komponenten des Shelterin-Komplexes durch die Telomerase-Inhibition unbeeinflusst, nimmt jedoch insgesamt bei Langzeitkultivierung zu.

#### 4.5 Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Sirtuin 1 und Sirtuin 2

Die Genexpression von *SIRT1* war sowohl in Passage 11 (p=0,019) als auch in Passage 19 (p=0,0005) und in Passage 46 (p=0,0005) in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>. In T<sup>+</sup> blieb die Expression über die 19 Wochen unverändert, während sie in T<sup>-</sup> zwischen Passage 11 und 46 mit p=0,0215 signifikant zunahm (Abb. 41, Grafik A).

Die Expression von *SIRT2* war in Passage 11 zwischen den telomeraseinhibitierten Zellen und den Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich. In Passage 19 war sie jedoch in T<sup>-</sup> mit p=0,0015 signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Dieser Unterschied blieb in Passage 46

( $p=0,0065$ ) bestehen. Zwischen Passage 11 und Passage 46 nahm die *SIRT2*-Expression sowohl in  $T^+$  ( $p=0,0475$ ) als auch in  $T^-$  ( $p=0,0095$ ) signifikant zu (Abb. 41, Grafik B). Sirtuin 2 (*SIRT2*) ist das einzige Mitglied der Sirtuin-Proteinfamilie, das primär im Cytoplasma und nur in geringerem Umfang nukleär exprimiert wird [469]. Im Nukleus wirkt es über Deacetylierung diverser Proteine als Mitoseregulator [486]. Die weiteren Funktionen der Deacetylase *SIRT2* sind sehr vielfältig: Beispielsweise sind Polymorphismen im *SIRT2*-Gen mit verringerter Lebenserwartung assoziiert, während *SIRT2*-Defizienz zur Beeinträchtigung der Autophagie führt [104, 280].



● = mit 20  $\mu$ M BIBR1531 behandelte A549-Zellen, ○ = vehikelbehandelte A549-Zellen, P=Passagenzahl, we = Wochen

Abbildung 41: Expression des *SIRT1*- und *SIRT2*-Gens in telomeraseinhibierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von *SIRT1* und *SIRT2* in  $T^+$  bzw.  $T^-$  über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA ( $n=4$  für  $T^+$  und  $T^-$ ). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:** mRNA= messenger RNA, P= Passagenzahl, R18S= 18S rRNA, *SIRT1*/*SIRT2*= Sirtuin 1/2, rel= relativ,  $T^+$ = mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen,  $T^-$  = unbehandelte A549-Zellen, we= Wochen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *SIRT1* und *SIRT2* durch Telomeraseinhibition vermehrt exprimiert werden. Insbesondere im Falle von *SIRT1* könnte dies einen Schutzmechanismus gegen die schädlichen Folgen der Telomerverkürzung darstellen. Hierauf wird in Kapitel 5.6 genauer eingegangen.

#### 4.6 Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Expression von Fibrose- und Inflammationsmarkern

In  $T^+$  war zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine *CTGF*-Expression zu beobachten, während in  $T^-$  zu jedem Zeitpunkt *CTGF* nachweisbar war. Zwischen Passage elf und Passage 19 stieg die *CTGF*-Expression in  $T^-$  signifikant an ( $p=0,0014$ ), um dann jedoch wieder auf die Ausgangswerte zurückzugehen, sodass sich zwischen Passage elf und

Passage 46 kein Expressionsunterschied mehr zeigte (Abb. 42, Grafik A). CTGF ist ein Nichtstrukturprotein der EZM. Es ist an der Regulation von Zelladhäsion, -migration und -proliferation sowie an der Angiogenese beteiligt [379]. CTGF ist einerseits für die Wundheilung essentiell, andererseits auch an der Fibroseentstehung in vielen Organen beteiligt [14, 379].

Die *Endothelin 1 (EDN1)*-Expression war in T<sup>-</sup> sowohl in Passage 11 (p=0,0005) als auch in Passage 19 (p=0,001) und in Passage 46 (p=0,027) signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Es zeigte sich zudem eine Expressionszunahme zwischen Passage 11 und Passage 46. Diese war in T<sup>+</sup> mit p=0,0285 signifikant, in T<sup>-</sup> mit p=0,545 knapp nichtsignifikant (Abb. 42, Grafik B). EDN1 ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor in Wirbeltieren und an der Regulation der Bronchokonstriktion beteiligt [188, 442]. Darüber hinaus hat es eine herausragende Bedeutung für die physiologische Wundheilung, aber auch für fibrotische Prozesse [442]. Auch die *PAII*-Expression war zu jedem untersuchten Zeitpunkt in T<sup>-</sup> höher als in T<sup>+</sup>. Dieser Unterschied war in Passage 11 mit p=0,0025, in Passage 19 mit p=0,0005 und in Passage 46 mit p=0,0005 signifikant. In T<sup>+</sup> veränderte sich die Expression über die Zeit nicht, in T<sup>-</sup> zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung zwischen Passage 11 und Passage 46 (p=0,03) (Abb. 42, Grafik C).

Die Expression von *TGF-β1* war in Passage 11 mit p=0,002, in Passage 19 mit p=0,001 und in Passage 46 mit p=0,013 zu jedem untersuchten Zeitpunkt in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Zudem zeigte sich für T<sup>-</sup> eine signifikante Expressionszunahme (p=0,032) zwischen Passage 11 und Passage 46, während die Expression in T<sup>+</sup> unverändert blieb (Abb. 42, Grafik D).

Die *Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (TGFBFR2)* -Expression war zu Beginn der Untersuchung in Passage 11 mit p=0,026 in T<sup>+</sup> signifikant höher als in T<sup>-</sup>. In Passage 19 war der Unterschied zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> nicht mehr signifikant und in Passage 46 hatte sich die Situation umgedreht: Nun war die Expression in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup> (p=0,001). Insgesamt nahm die *TGFBFR2*-Expression in T<sup>+</sup> zwischen Passage 11 und Passage 46 mit p=0,0186 signifikant ab, während sie in T<sup>-</sup> nach zwischenzeitlicher nichtsignifikanter Zunahme unverändert blieb (Abb. 42, Grafik E). Der TGF-β-Typ-II-Rezeptor (TGF-β-RII/*TGFBFR2*) ist einer der drei Rezeptoren, über die die Proteine der TGF-β-Superfamilie binden [468].

Die *VEGFA*-Expression war in Passage 11 und Passage 19 mit jeweils p=0,0005 in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Sowohl in T<sup>+</sup> (p=0,001) als auch in T<sup>-</sup> (p=0,001) nahm die Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 signifikant zu. Da diese Zunahme in T<sup>+</sup>

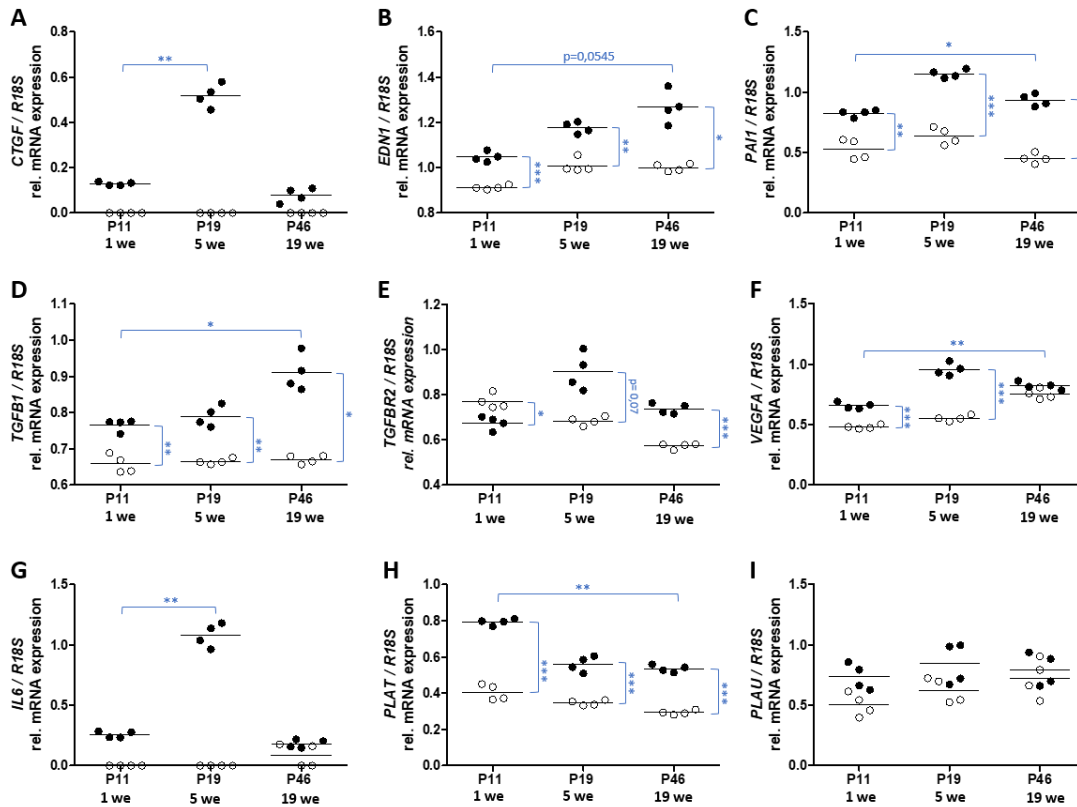
jedoch ausgeprägter war als in T<sup>-</sup>, waren die *VEGFA*-Level in Passage 46 zwischen den telomeraseinhibitierten Zellen und den Kontrollen nicht mehr signifikant unterschiedlich (Abb. 42, Grafik F). VEGF-A ist ein Zytokin, das in der Lunge während der Embryonalentwicklung für die Vaskulogenese, die korrekte Ausbildung der Alveolen und die Surfactantproduktion essentiell ist [95, 335]. In der ausgereiften Lunge findet sich eine ausgeprägte Expression von VEGF-A im Alveolarepithel [42].

In T<sup>+</sup> war in Passage 11 und Passage 19 keine *IL6*-Expression zu detektieren, während T<sup>-</sup> eine stabile Expression zeigte. In Passage 46 hatte dann die Expression von *IL6* in T<sup>-</sup> abgenommen, während in den T<sup>+</sup>-Proben eine geringe Expression nachzuweisen war. Hierdurch war in Passage 46 kein signifikanter Unterschied zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> zu beobachten. Insgesamt veränderte sich die Expression von *IL6* in T<sup>+</sup> nicht signifikant über die Zeit, während sich in T<sup>-</sup> zwischen Passage 11 und Passage 19 eine signifikante Expressionszunahme zeigte (p=0,001) (Abb. 42, Grafik G). IL-6 ist ein Zytokin, das primär von Makrophagen und Monozyten sezerniert wird und über unterschiedliche Signalwege die Transkription insbesondere von proinflammatorischen Genen induziert [463]. Hierzu gehören beispielsweise C-Reactive Protein (*CRP*) und Haptoglobin (*HP*) sowie Gene der Differenzierung verschiedener Immunzellen [53, 348, 448].

Die *PLAT*-Expression war in Passage 11 mit p=0,0005, in Passage 19 mit p=0,0005 und in Passage 46 mit p=0,0005 in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Jedoch zeigte sich sowohl in T<sup>+</sup> (p=0,032) als auch in T<sup>-</sup> eine signifikante Abnahme der Expression zwischen Passage 11 und Passage 46 (Abb. 42, Grafik H).

Bei der Untersuchung der *PLAU*-Expression zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup>. Zwischen Passage 11 und Passage 46 nahm die *PLAU*-Expression in T<sup>+</sup> mit p=0,0335 signifikant zu, während sie in T<sup>-</sup> unverändert blieb.

Insgesamt zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass eine Telomeraseinhibition in A549-Zellen zu einer verstärkten Transkription von profibrotischen und proinflammatorischen Genen führt.



●= mit 20  $\mu$ M BIBR1531 behandelte A549-Zellen, ○= vehikelbehandelte A549-Zellen, P=Passagenzahl, we= Wochen

**Abbildung 42:** Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen in telomeraseinhibierten A549-Zellen.

Die Grafik zeigt die Entwicklung der Genexpression von *CTGF*, *EDN1*, *PAI1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *VEGFA*, *IL6*, *PLAT* und *PLAU* in  $T^+$  bzw.  $T^-$  über einen Zeitraum von 19 Wochen auf Basis semiquantitativer RT-PCR's und nach Normierung der Genexpression auf 18S-rRNA (n=4 für  $T^+$  und  $T^-$ ). Mit blauen Klammern markiert sind signifikante Expressionsunterschiede über die Zeit (waagrecht) bzw. zwischen  $T^+$  und  $T^-$  zu einem bestimmten Zeitpunkt. Berechnungsgrundlage für die Signifikanz sind nach Bonferroni korrigierte T-Tests (ungepaart zwischen  $T^+$  und  $T^-$ , gepaart zwischen den Passagezeitpunkten). \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ .

**Abkürzungen:** CTGF= Connective Tissue Growth Factor, EDN1= Endothelin 1, IL6= Interleukin 6, mRNA= messenger RNA, P= Passagenzahl, PAI1= Plasminogen Activator Inhibitor 1, PLAT= Tissue-type Plasminogen Activator, PLAU= Urokinase-type Plasminogen Activator, R18S= 18S rRNA, rel= relativ,  $T^+$ = mit BIBR1532 behandelte A549-Zellen,  $T^-$ = unbehandelte A549-Zellen, TGFB1= Transforming Growth Factor beta 1, TGFB2= Transforming Growth Factor Receptor 2, VEGFA= Vascular Endothelial Growth Factor A, we= Wochen

## 5. Diskussion

### 5.1 ER-Stressauslösung durch beeinträchtigte Telomeraseaktivität und damit verbundener Telomerverkürzung

Verkürzte Telomere werden sowohl in sporadischen IPF-Fällen als auch in solchen mit Mutationen in für Komponenten des Telomerase- bzw. Shelterinkomplexes kodierenden Genen beobachtet [12, 23]. Zudem finden sich in 3% der adulten FIP-Fälle Mutationen in den Surfactantgenen *SFTPA2* oder *SFTPC* [145]. Werden diese mutierten Surfactantproteine *in vitro* exprimiert, aktivieren sie die UPR [292, 325]. ER-

Stressmarker lassen sich allerdings auch in Lungen aus Patienten ohne zugrundeliegende Surfactantproteinmutation nachweisen [246]. In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob eine Telomerverkürzung, ausgelöst durch Telomerase-defizienz bzw. Inhibierung der Telomeraseaktivität, als Einzelfaktor bereits zur Auslösung von ER-Stress ausreicht.

In den beiden telomerase-defizienten (*Terc*<sup>-/-</sup>)-Mausstämmen (jeweils: n=6) wurde die pulmonale Genexpression von *Grp78*, *Atf6*, *Xbp1(s)*, *Trb3* und *Chop* per RT-PCR aus Lungengewebe untersucht (Abb. 25, Abb. 26).

In der vorliegenden Arbeit war lediglich die Expression von *Atf6* in den Lungen der *Terc*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant erhöht. In den *Terc*<sup>-/-</sup>/SPC-GFP-Mäusen unterschied sich die pulmonale Genexpression von *Atf6* dagegen nicht von den Wt-Mäusen. Die Expression von *Trb3*, *Grp78*, *Chop* und *Xbp1(s)* unterschied sich zwischen Wt- und KO-Mäusen ebenfalls nicht signifikant. Dies lässt es möglich erscheinen, dass es sich bei der isoliert erhöhten *Atf6*-Expression in den *Terc*<sup>-/-</sup>-Mäusen um einen Zufallseffekt handelt.

Auf der Proteinebene wurden *Grp78*, *Xbp1(s)*, und *Chop* per Western Blot aus Lungengewebe von jeweils 6 Mäusen pro Stamm untersucht (Abb. 29, Abb. 30). Ein signifikant höheres Proteinlevel fand sich hierbei nur für *Grp78*, die Proteinexpression von *Xbp1(s)* und *Chop* waren im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant unterschiedlich.

Hieraus kann man schließen, dass die Inhibition der Telomerase im Mausmodell die UPR nicht, beziehungsweise nur in sehr geringem Ausmaß, auslöst. Dazu passt, dass die Mäuse keine spontane Lungenfibrose entwickelten (Abb. 23).

Im Gegensatz hierzu wurden fast alle in telomerase-inhibierten A549-Zellen per RT-PCR untersuchten Gene der UPR im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant stärker exprimiert.

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt (Passage 11, 19 und 46) in den telomerase-inhibierten A549-Zellen (T<sup>-</sup>) signifikant stärker exprimiert waren die folgenden Gene: *ATF4*, *CHOP*, *DR 5*, *ASK1*, und *TRB3* (Abb. 38). Die Expression von *PUMA* war ab Passage 19 in T<sup>-</sup> signifikant höher, die von *GRP78* und *XBPI* nur in Passage 46. Als einziges untersuchtes Gen zwischen den Kontrollen (T<sup>+</sup>) und T<sup>-</sup> nicht differenziell reguliert war *HSP90B1* (Abb. 38).

Die meisten UPR-Marker wurden bereits in Kapitel 1.2 erläutert, auf *DR5* soll im Folgenden genauer eingegangen werden: Lu et. al wiesen 2014 nach, dass die *DR5*-Transkription in humanen Zellen *in vitro* durch CHOP induzierbar ist. Infolgedessen

zeigte sich eine erhöhte Caspase-8-Aktivität mit vermehrter Apoptose [285]. Interessanterweise ist die Aktivierung von DR5 im Rahmen der proapoptotischen UPR unabhängig von TRAIL und erfolgt durch direkte Bindung ungefalteter Proteine an DR5 [258, 285].

ASK1 ist eine MAP-Kinase, die im Rahmen zellulären Stresses durch Phosphorylierung angeschaltet wird. Die UPR kann ASK1 durch Komplexbildung von IRE1 $\alpha$  und TRAF2 aktivieren [337]. Eine Erhöhung der *ASK1*-Transkription durch die UPR wurde bisher noch nicht beschrieben, ist aber prinzipiell vorstellbar. Auch wenn die ASK1-Aktivität/ASK1-Phosphorylierung primär über Oxidation oder Phosphorylierung des inhibitorisch wirkenden Thioredoxins reguliert wird, gibt es Berichte über eine transkriptionelle Regulation von *ASK1* über den Transkriptionsfaktor E2F1 [167, 401]. Allerdings ist hier zu bedenken, dass ASK1 nicht nur im Rahmen der UPR aktiviert wird, sondern auch durch eine Fülle anderer Stressoren wie beispielsweise oxidativen Stress [178]. In humanen Zellen *in vitro* wird ASK1 auch durch genotoxischen Stress aktiviert [83]. Kurze Telomere humaner Fibroblasten werden *in vitro* als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt, folglich ist eine ASK1-Aktivierung direkt durch kurze Telomere ebenfalls denkbar [114]. Es ist also nicht eindeutig zu beantworten, wodurch die in den telomeraseinhibierten A549-Zellen beobachtete verstärkte *ASK1*-Transkription verursacht wurde.

Die in T beobachtete vermehrte *PUMA*-Transkription stimmt mit den Ergebnissen von Ghosh et al. überein, die *in vitro* in humanen Neuroblastomzellen nachweisen konnten, dass *PUMA* ein Zielgen des im Rahmen der proapoptotischen UPR aktivierten Transkriptionsfaktors CHOP ist [152].

Wie lässt sich nun der Unterschied zwischen dem *in vitro*- und dem *in vivo*-Modell erklären? Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in den im Vergleich zu murinen Zellen wesentlich kürzeren Telomeren humaner Zellen. Dies könnte der Grund dafür sein, warum murine Zellen weniger empfindlich auf den Verlust der Telomerase reagieren und keinen/kaum ER-Stress entwickeln.

Die Ausgangslänge der Telomere von A549 Zellen wird bei Verwendung des Goldstandards (Telomer-Restriktionsfragmentanalyse) je nach Quelle mit 3,3- 5 kb angegeben, durchschnittlich kann man von einer Telomerlänge von ca. 4,4 kb ausgehen [217, 309, 440]. Synthego, ein kommerzieller Anbieter von A549-Zellen, gibt deren Teilungsrate mit einer Teilung pro 22-40 Stunden an [443]. Die

Wachstumsgeschwindigkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen nahm mit zunehmender Kultivierungszeit deutlich ab, sodass es wahrscheinlich sinnvoller ist, mit einer Verdopplungszeit von 48 Stunden zu rechnen. Counter et al. fanden heraus, dass menschliche Zellen pro Teilung ca. 65 telomerische Basenpaare verlieren [101]. In der vorliegenden Arbeit wurden die A549-Zellen 19 Wochen lang kultiviert, was etwa 67 Teilungen entspricht. Die Telomerlänge der A549-Zellen dürfte bei Annahme einer linearen Telomerverkürzung rein rechnerisch in Passage 11 (1 Woche) etwa 4,2 kb, in Passage 19 (5 Wochen) 3,3 kb und in Passage 46 (19 Wochen) nur noch ca. 78 bp betragen haben. Natürlich ist dies nur ein vereinfachtes Modell, in Wirklichkeit werden die Telomere nicht auf eine Länge von nur wenigen Basenpaaren zusammenschrumpfen, da kritisch kurze Telomere in humanen Zellen Seneszenz oder Apoptose und damit einen Replikationsstopp bewirken [59]. Man kann jedoch sicherlich davon ausgehen, dass die Telomerlänge der späteren A549-Passagen sehr kurz war, da diese nur noch gering proliferierten.

Im Gegensatz hierzu beträgt die Telomerlänge der Wildtyp-C57BL/6J-Mäuse normalerweise 40-50 kb [470]. Lee et al. geben für F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse dieses Stammes immer noch eine durchschnittliche Telomerlänge von 14,9 kb an [266]. Einzelne Chromosomen komplett ohne Telomere wurden von Blasco et al. erst ab der 6. Generation in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen beobachtet [58].

Eine weitere, wenn auch unwahrscheinlichere, mögliche Erklärung für die in den Mäusen kaum nachweisbare UPR könnte darin zu finden sein, dass für die Genexpressionsanalyse der Mäuse Ganzlungen-Homogenate untersucht wurden. Nicht alle pulmonale Zellen sind gleich anfällig für ER-Stress. Als sekretorisch aktive surfactantproduzierende Zellen sind die Typ-II-Alveolarzellen hierfür besonders vulnerabel. Korfei et al. konnten in Lungen von IPF-Patienten per IHC eine eindeutige Kolo-kalisation von ATF6 und CHOP mit dem Typ-II-Zellmarker proSP-C nachweisen [246]. Auch in Lungenschnitten aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit per IHC untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mausstämmen kolokalisierten die ER-Stressmarker Grp78 und Xbp1(s) mit Zellmarkern für Typ-II-Zellen (Abb. 28 & 30).

Typ-II-Alveolarzellen machen nur etwa 2,5 % der Alveolaroberfläche aus, die restlichen 97,5 % werden von Typ-I-Pneumozyten bedeckt [166]. In den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen nimmt die Anzahl der Typ-II-Zellen noch weiter ab, die Zahl der proSP-C-positiven Zellen pro Gesichtsfeld ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in der IHC signifikant geringer (Abb. 23). Zu erklären ist dies vermutlich durch Seneszenz

und Apoptose, hierauf wird in Kapitel 5.3 genauer eingegangen. Es ist theoretisch möglich, dass hierdurch Expressionsunterschiede von ER-Stressmarkern in Typ-II-Zellen bei der Analyse der Gen- beziehungsweise Proteinexpression aus dem Homogenat einer kompletten Lunge nicht mehr ausreichen, um einen statistisch signifikanten Unterschied zu bewirken. Folglich wäre es möglich, dass die Expression von Proteinen/Genen der UPR in einem rein aus murinen Typ-II-Zellen bestehenden Homogenat ähnlich stark heraufreguliert wäre wie in den untersuchten A549-Zellen, welche als Modell für humane Typ-II-Alveolarepithelzellen gelten [97].

Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausstämme keine bzw. eine nur sehr schwach ausgeprägte UPR zeigten, so fanden sich doch in den telomeraseinhibierten A549-Zellen heraufregulierte ER-Stressmarker. Wie lässt sich das erklären?

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten ER-Stress liefert eine Theorie aus einem Übersichtsartikel von Korfei et al., die den direkten Zusammenhang zwischen verkürzten Telomeren und der Aktivierung der UPR herstellt [245]: Kurze Telomere bieten keinen ausreichenden Schutz vor Chromosomenfusionen, sodass in Zellen mit verkürzten Telomeren vermehrt chromosomale Fusionen und daraus resultierend abnorme Karyotypen entstehen. Diese genomische Instabilität wurde von Rudolph et al. für gealterte (> 15 Monate) F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse und von Counter et al. für mehrere humane Zelllinien beschrieben [101, 395]. In B-Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, die ebenfalls sehr kurze Telomere aufweisen, konnten Escudero et al. nachweisen, dass solche chromosomalen Fusionen nicht nur zwischen Telomerregionen, sondern auch zwischen Telomeren und extratelomerischer DNA auftreten [133]. Mehr als die Hälfte der Fusionen befand sich dabei in kodierenden Abschnitten des Genoms. Infolgedessen wurden einige der betroffenen Gene deutlich überexprimiert [133]. Es ist vorstellbar, dass sich diese Überexpression auf der Genexpressionsebene auch auf der Proteinebene manifestiert, was zu einer erhöhten Proteinlast, ER-Stress und somit Aktivierung der UPR in den betroffenen Zellen führen würde. Derselbe Mechanismus ist für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte *in vitro*-Modell der Telomerverkürzung denkbar und könnte eine Ursache des beobachteten ER-Stresses sein. Die chromosomalen Fusionen in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen konnten Rudolph et al. hierbei nur bei älteren Tieren (>15 Monate) nachweisen. In jungen (2-3 Monate alt) *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen waren dagegen keine solcher Fusionen zu sehen [395]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse waren bereits im Alter von 16

Wochen getötet worden, was erklären könnte, weshalb sich hier kaum eine UPR nachweisen ließ. Interessant wäre an dieser Stelle die Untersuchung älterer telomerasedefizienter Mäuse .

Geht man davon aus, dass Chromosomenfusionen zumindest in den A549-Zellen (Mit-) Auslöser des beobachteten ER-Stresses waren, ist zusätzlich zu bedenken, dass Chromosomenfusionen im Rahmen der nächsten Zellteilung zur Aneuploidie führen können. Hierdurch erhöht sich die absolute Menge kodierender Regionen in einer Zelle. In Hefezellen führt dies zu einer vermehrten Ansammlung von Aggregaten ungefalteter Proteine und könnte somit die UPR aktivieren [356]. Auch dieser Mechanismus könnte in den für diese Arbeit untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen bzw. den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mausstämmen zum Tragen gekommen sein.

Weitere Erklärungen für die beobachtete UPR können die Proteotoxizität des SASP in seneszenten Zellen und Störungen der Surfactantprozessierung liefern. Hierauf wird in Kapitel 5.2 und 5.3 eingegangen.

Abbildung 43 gibt einen Überblick über die untersuchten ER-Stress-Marker.

Gen	<i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> -Mäuse	<i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup> /SPC-GFP-Mäuse	Proteinexpression <i>Terc</i> <sup>(-/-)</sup>	A549 Zellen		
				P11	P19	P46
<i>ATF4</i>				↑ (**)	↑ (***)	↑ (**)
<i>ATF6</i>	↑ (*)	ns		ns	↑ (***)	↑ (***)
<i>CANX</i>		ns				
<i>CHOP</i>	ns	ns	ns	↑ (***)	↑ (**)	↑ (***)
<i>DR5</i>	↑ (**)			↑ (**)	↑ (***)	↑ (***)
<i>EDEM1</i>		ns				
<i>GRP78</i>		ns	↑ (**)	ns	ns	↑ (*)
<i>HSP90B1</i>				ns	ns	ns
<i>PUMA</i>				ns	↑ (***)	↑ (***)
<i>TRB3</i>		ns		↑ (***)	↑ (**)	↑ (*)
<i>XBPI(s)</i>	ns	ns	ns	ns	ns	↑ (*)

Abbildung 43: Übersicht über die untersuchten ER-Stressmarker

Die Tabelle zeigt die in der vorliegenden Arbeit auf Gen- und Proteinexpressionsebene untersuchten ER-Stressmarker. Ausgegraute Felder signalisieren, dass das entsprechende Gen/ Protein in diesem Modell nicht untersucht wurde.

↑ = Gen/Protein signifikant hochreguliert. ns= nicht differentiell reguliert. \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*p ≤ 0.01, \*p ≤ 0.05, durch t-Test (A549-Zellen: korrigiert nach Bonferroni, KO-Mäuse: korrigiert nach Benjamini-Hochberg)

Weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

## 5.2 Gestörte Surfactantproteinprozessierung durch Telomerverkürzung

Die Expression von *Sftpb* und *Sftbc* war in per RT-PCR untersuchten Lungengewebe aus den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert,

gleiches galt für die per Western Blot bestimmte Proteinexpression von SP-A. Die Verringerung der Genexpression von *Sftpal* verpasste mit  $p=0,0533$  knapp das Signifikanzniveau (Abb. 26, Abb. 27). Aus Lungengewebe der F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden die Proteinlevel an proSP-B, proSP-C, maturem SP-B und maturem SP-C bestimmt, die im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant verringert waren (Abb. 27).

Dies spiegelt die Ergebnisse aus IPF-Lungen teilweise wider: Aus Lungenhomogenaten und in der BAL konnten Wasnick et al. hier im Western Blot signifikant verringerte Proteinlevel an maturem SP-B und SP-C nachweisen, während gleichzeitig im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Level an Prozessierungs-Intermediaten von SP-B nachweisbar waren [488]. Allerdings unterscheidet sich die Genexpression von *SFTPB* und *SFTPC* zwischen IPF- und gesunden Spenderlungen nicht [5].

Diese verringerte Expression der Surfactantproteine und der für sie kodierenden Gene könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die Typ-II-Zellzahl in Lungenschnitten der beiden *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Stämmen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant verringert war (Abb. 23). Andererseits könnte die verringerte Expression auch eine direkte Folge der Telomerverkürzung oder der Seneszenz sein. Die Seneszenzmarker *Cdkn2a* und *Cip1* waren in der RT-PCR aus Lungengewebe der beiden telomerasedefizienten Mausstämmen im Vergleich zum Wildtyp signifikant stärker exprimiert (Abb. 25 & 26). Auf der Proteinexpressionsebene fand sich im Westernblot aus Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse ein im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant höheres Level an p21 (Abb. 24). Man kann also davon ausgehen, dass in den Lungen der telomerasedefizienten Mäusen viele Zellen seneszent waren. Seneszenz geht nicht nur mit Zellzyklusarrest und SASP einher, sondern auch mit eingeschränkter zellulärer Funktion. Beispielsweise verändert sich die Expression der an der Insulinsekretion beteiligten Gene im Mausmodell mit zunehmendem Alter, bis dadurch in seneszenten Zellen schließlich die Insulinsekretion beeinträchtigt wird [7]. Es ist also möglich, dass die Typ-II-Zellen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten telomerasedefizienten Mausstämmen aufgrund ihrer Seneszenz im Vergleich zum Wildtyp weniger Surfactantproteine synthetisierten.

Interessanterweise fiel bei der Untersuchung von Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse (n=6) im mit einem Antikörper gegen proSP-B durchgeführten Western Blot eine zusätzliche deutliche Bande bei ca. 25 kDa auf, die vermutlich einem unvollständig prozessierten proSP-B-Intermediat entspricht (Abb. 27, Grafik F). Die densitometrische Auswertung dieser Bande zeigte, dass das entsprechende Intermediat in den

telomerasedefizienten Mäusen in signifikant höherer Menge vorlag als in den Wildtypmäusen. Auch im proSP-B-Westernblot aus Lavagen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse (n=6) war dieses Intermediat im Vergleich zum Wildtyp stärker vertreten, allerdings war die Erhöhung nicht signifikant (Abb. 27, Grafik E). Dies spricht dafür, dass die verringerte Menge an Surfactantprotein B in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse nicht nur durch eine geringere Expression der entsprechenden Gene, sondern auch durch eine Störung der Proteinreifung bedingt war.

SP-B wird als Prä-proSP-B translatiert, posttranslational zum 42 kDa proSP-B modifiziert und durchläuft den sekretorischen Weg durch ER, Golgi und Lamellenkörperchen. In den Alveolarraum sekretiert wird schließlich das mature 8 kDa SP-B [34, 353, 471]. Während der Reifung erfolgen mehrere proteolytische Spaltungen, an denen Napsin A, Cathepsin H und Pepsinogen C beteiligt sind [147, 464].

Für die vorliegende Arbeit wurde die Expression der für diese Proteasen kodierenden Gene in telomerasedefizienten A549-Zellen über einen Zeitraum von 19 Wochen untersucht (Abb. 37). Die Expression von *PGC* blieb über den gesamten Zeitraum in T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> gleich hoch. Im Gegensatz dazu war die Expression von *CTSH* ab Passage 19 und die von *NAPSA* ab Passage 46 in den telomeraseinhibierten Zellen signifikant niedriger als in den unbehandelten A549-Zellen. Passend hierzu konnten Wasnick et al. in IPF-Lungen signifikant erniedrigte Proteinlevel von Napsin A und Cathepsin H nachweisen [488].

Es ist unklar, inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf die telomerasedefizienten Mäuse beziehungsweise überhaupt auf die Proteinebene übertragen lassen. Eine verringerte Expression von Napsin A und Cathepsin H wäre jedoch eine einleuchtende Erklärung für die Entstehung des beobachteten 25kDa-Intermediates. Dieses entspricht vermutlich dem nach Spaltung des 42 kDa proSP-B durch Napsin A entstehenden Intermediat, das bereits von Ueno et al. beschrieben wurde [464]. Das erniedrigte Proteinlevel von maturem SP-B in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse könnte neben der verringerten Expression des *Sftpb*-Gens also auch auf die gestörte Surfactantprozessierung zurückzuführen sein. Auch die im Vergleich zu den Wildtypmäusen erniedrigten SP-C-Proteinlevel könnten teilweise auf eine Reifungsstörung zurückzuführen sein, da Cathepsin H genauso an der Prozessierung von proSP-C beteiligt ist [66].

Im Folgenden soll auf die Auswirkungen des verringerten Surfactantproteingehaltes in den KO-Mäusen eingegangen werden.

Die Akkumulation des unvollständig prozessierten SP-B in den Lungen der telomerasedefizienten Mäuse könnte ein zur hier, wenn auch in geringem Umfang, beobachteten UPR beitragender Faktor sein. Unter der Annahme, dass auch A549-Zellen Surfactantproteine synthetisieren, könnte auch der hier beobachtete ausgeprägte ER-Stress zumindest teilweise auf Störungen der Surfactantprotein-Prozessierung zurückzuführen sein. Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass für die A549-Zelllinie unterschiedliche Berichte darüber vorliegen, ob sie Surfactantproteine synthetisiert. Die Ergebnisse verschiedener Gruppen reichen dabei vom fehlenden Nachweis jeglicher Surfactantproteine über einen auf die mRNA-Ebene begrenzten Nachweis einer geringen Genexpression bis hin zum Proteinnachweis von SP-A, SP-B und SP-C per Immunfluoreszenz [219, 386, 475].

SP-B ist für die Reduktion der alveolären Oberflächenspannung sowie die Bildung der Lamellenkörperchen essentiell [92]. *Sftpb*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse sterben unmittelbar postnatal, da sich die Lunge aufgrund der hohen Oberflächenspannung nicht mit Luft füllen kann [458]. Dies liegt auch daran, dass ein Fehlen von SP-B zur weitreichenden Störung der Prozessierung von SP-C führt, sodass eine SP-B-Defizienz auch zum Mangel an maturem SP-C führt [92].

Transgene Mäuse, die nur etwa 65% der normalen SP-B-Menge exprimieren, zeigen eine deutlich verringerte Lungencompliance, eine verringerte Residualkapazität und ultrastrukturell veränderte Lamellenkörperchen. Interessanterweise weisen diese Mäuse darüber hinaus einen emphysemartig veränderten Lungenphänotyp auf [334]. Dieser wurde auch in der vorliegenden Arbeit in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>-SPC-GFP-Mäusen beobachtet und es ist denkbar, dass der vorliegende SP-B-Mangel auch hier eine Rolle spielte (Abb. 23).

Auch SP-C senkt die Oberflächenspannung in den Alveolen, ist jedoch nicht so essentiell wie SP-B. *Sftpc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse zeigen einen normalen Lungenphänotyp, regelrechte Lamellenkörperchen und entwickeln sich genau wie Wildtypiere. Lediglich die Elastizität ihrer Lungen und die Stabilität des Surfactantfilms sind herabgesetzt [155]. Man kann jedoch davon ausgehen, dass sich die Effekte einer verringerten SP-B- und SP-C-Expression aufaddieren, wenn sie, wie in der vorliegenden Arbeit in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>-SPC-GFP-Mäusen beobachtet, gemeinsam auftreten.

Leslie stellte bereits 2012 die Theorie auf, dass die Fibroseentwicklung im Rahmen der IPF eine Folge von hohen auf die Lunge einwirkenden Scherkräften ist: Diese seien in der Lungenperipherie besonders hoch und würden durch die erhöhte

Oberflächenspannung in Folge der in familiären IPF-Fällen beobachteten Surfactantproteinmutationen noch zusätzlich verstärkt. Rekurrerender Alveolarkollaps führe dann schließlich zu bindegewebigem Umbau der betroffenen Areale und somit zur Fibrose [271]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete generell verringerte Produktion von SP-B und SP-C in Mäusen mit verkürzten Telomeren legt die Annahme nahe, dass dieser Mechanismus auch in sporadischen IPF-Fällen ohne zu Grunde liegende Surfactantproteinmutation zum Tragen kommt. Auch in diesen sporadischen Fällen sind die Telomere sowohl in peripheren Leukozyten als auch in alveolären Epithelzellen im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden signifikant verkürzt und, wie von Wasnick et al. gezeigt, ist die Proteinexpression von maturem SP-B und SP-C in IPF-Lungen signifikant verringert [12, 488]. Wasnick et al. konnten 2023 dann im HRCT den expiratorischen Alveolarkollaps in IPF-Patienten auch unabhängig von zugrundeliegenden Surfactantproteinmutationen nachweisen [488].

SP-A ist zwar an der Bildung des tubulären Myelins sowie am Recycling der Surfactant-Phospholipide beteiligt, die Deletion von *Sftpa* im Mausmodell bewirkt jedoch keine Einschränkung der Lungenfunktion [247, 503]. Allerdings sind diese Mäuse anfälliger für bakterielle und virale Infektionen [273, 274]. Dies liegt vermutlich daran, dass SP-A als Opsonin entscheidend an der Phagozytose diverser lungenpathogener gramnegativer und grampositiver Bakterien beteiligt ist [229]. Zudem bindet und neutralisiert SP-A eine Vielzahl von Viren, zu diesen gehören unter anderem Influenzavirus A, das respiratorische Synzytial-Virus und das Herpes-simplex-Virus [47, 150, 466]. Darüber hinaus übt SP-A im Mausmodell je nach Stärke des aktivierenden Stimulus eine fördernde oder hemmende Wirkung auf die T-Zellproliferation aus [323]. Die in der vorliegenden Arbeit in den telomerasedefizienten Mäusen beobachtete verringerte SP-A-Produktion wird also wahrscheinlich keinen Einfluss auf deren Lungenfunktion gehabt, aber ihre pulmonale Pathogenabwehr geschwächt haben. Da die Mäuse unter SPF- Bedingungen gehalten wurden, kann man hierzu jedoch keine genaueren Aussagen treffen.

Interessant ist diese Beobachtung dennoch, da virale Infektionen immer wieder als "Second Hit" in der Entstehung der IPF diskutiert wurden und IPF-Patienten ebenfalls meist verkürzte Telomere aufweisen [12, 318]. Insbesondere Herpesviren sind dabei stark mit IPF assoziiert. Tang et al. wiesen in Lungen von IPF-Patienten in 97% der Fälle DNA eines oder mehrerer Herpesviren (Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 7 und Humanes Herpesvirus 8) nach, während nur in 36% der Kontrolllungen Herpesvirus-DNA detektierbar war [450]. Eine verringerte SP-A-

Produktion infolge verkürzter Telomere könnte eine mögliche Erklärung für diese Virusanfälligkeit sein.

In den telomeraseinhibierten A549-Zellen wurde die Expression von *ABCA3* im Vergleich zu unbehandelten Zellen per RT-PCR untersucht. *ABCA3* wurde hier sowohl in Passage 11 als auch in Passage 19 in T<sup>-</sup> signifikant stärker exprimiert als in T<sup>+</sup>. *ABCA3* ist für die Biogenese der Lamellenkörperchen sowie für den Transport der Surfactant-Phospholipide über deren Membran essentiell [33, 86]. Eine verstärkte Expression von *ABCA3* könnte somit einen Versuch darstellen, die durch die Telomerverkürzung verursachte verringerte Produktion der Surfactantproteine auszugleichen. Allerdings ist auch hier wieder zu beachten, dass es unklar ist, inwieweit die untersuchten A549-Zellen Surfactantproteine synthetisieren, weswegen die hier beobachteten Veränderungen nicht einfach auf die *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse übertragen werden können [219, 386, 475]. Zudem muss eine erhöhte *ABCA3*-Expression nicht zwangsläufig auch mit vermehrter Synthese des *ABCA3*-Proteins einhergehen. Aufgrund der bereits in Passage 11 nach nur einer Woche Kultivierung in T<sup>-</sup> bereits deutlich erhöhten *ABCA3*-Expression ist auch ein Off-Target-Effekt der Telomeraseinhibition nicht auszuschließen.

### 5.3 Emphysementwicklung, Seneszenz und Apoptose durch Telomerverkürzung

#### **Emphysementstehung durch Verlust an Typ-II-Pneumozyten**

In den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen wurde eine diskrete Erweiterung der terminalen Luftwege mit Rarefizierung der alveolären Septen und Entstehung eines emphysemartigen Lungenphänotyps beobachtet (Abb. 23). Dieselben Veränderungen, gemeinsam mit dünner werdenden Alveolarsepten, hatten schon Lee et al. für F4 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse nachgewiesen [266]. Weiterhin beschrieben Lee et al. eine Abnahme der durchschnittlichen Zahl an immunhistochemisch gefärbten proSP-C-positiven Zellen pro Gesichtsfeld, was sich ebenfalls in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten telomerasedefizienten Mäusen bestätigte (Abb. 23) [266].

Typ-II-Alveolarepithelzellen sind Progenitorzellen, die nicht nur die eigene Population aufrechterhalten, sondern sich auch in Typ-I-Zellen differenzieren können [39]. Es ist gut vorstellbar, dass ein Verlust oder Funktionsverlust dieser Progenitorzellen zu verminderter Regenerationsfähigkeit des Epithels und damit zur Emphysementstehung führt. Tatsächlich beobachteten Lee et al. in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine Abnahme der gesamten pulmonalen Zelldichte mit zunehmender Generationenzahl [266]. Auch für humane

Lungen ist die Korrelation zwischen geringer Typ-II-Pneumozytenzahl und Emphyseentwicklung bekannt [357].

Wie kommt es nun zum Verlust der Typ-II-Zellen?

In den untersuchten telomerasedefizienten Mäusen ließ sich eine erhöhte Expression der Chop-Zielgene *Dr5* (nur in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- Mäusen untersucht) und *Casp11* nachweisen (Abb. 25, Abb. 26). Proapoptotischer ER-Stress, der sicherlich in den untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen eine entscheidende Rolle spielte, ist den KO-Mäusen jedoch aufgrund der fehlenden Expressionserhöhung von Chop auf Gen- und Proteinebene als Ursache des Typ-II-Zellverlusts unwahrscheinlich (Abb. 25, 26, 30). Zu bedenken ist auch dass die Genexpression von *Casp11* und *Dr5* durch eine Vielzahl an Signalwegen aktiviert werden kann und nicht nur *downstream* von Chop [6, 446].

Die wahrscheinlichere Möglichkeit, die im Folgenden genauer erklärt werden soll, stellt die durch kurze Telomere ausgelöste DDR dar. Die DDR aktiviert p53, welches wiederum Seneszenz und Apoptose der Typ-II-Zellen bedingen kann.

### **DDR-Auslösung durch kurze Telomere**

Als Progenitorzellen teilen sich Typ-II-Zellen häufiger als andere Zellen, wodurch sich ihre Telomere besonders schnell verkürzen. Durch die fehlende Telomeraseaktivität in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellen ist es denkbar, dass die Telomere schließlich kritisch kurz werden. Solche kritisch kurzen Telomere werden in humanen Fibroblasten durch Proteine der DDR als Doppelstrangbruch erkannt: D'Adda di Fagagna et al. konnten in aufgrund kurzer Telomere seneszenten Fibroblasten eine Rekrutierung der DNA Damage-Kinase ATM und des als Doppelstrangbruchmarker dienenden Histons  $\gamma$ -H2AX an die Telomere nachweisen [114]. ATM phosphoryliert im Rahmen der DDR unter anderem p53, wodurch dieses stabilisiert wird [37, 427]. In murinen Zellen geht eine kritische Telomerverkürzung, wie sie in F5 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen zu beobachten ist, ebenfalls mit einer Akkumulation von  $\gamma$ -H2AX an den Telomeren einher [170]. Auch hier wird also eine Doppelstrangbruch-DDR ausgelöst, die mit Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 durch Atm einhergeht [221].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von phospho-p53 in Lungenschnitten der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen per IHC untersucht. In den telomerasedefizienten Mäusen war die Kolo-kalisation von phospho-p53 mit dem Typ-II-Zellmarker proSP-C ausgeprägter als in den Wildtypmäusen (Abb. 24). Darüber hinaus fand sich in den telomeraseinhibierten A549-Zellen per RT-PCR

eine ab Passage 19 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant höhere Expression des *p53*-Gens. (Abb. 38). Man kann also bei beiden Modellen davon ausgehen, dass in den Typ-II-Pneumozyten (AECII) *p53*-abhängige Signalwege aktiv waren, die möglicherweise im Rahmen der durch die kurzen Telomere initiierten DDR angeschaltet worden waren.

### **Verlust der Regenerationsfähigkeit durch AECII-Seneszenz**

Die Aktivierung von *p53* kann grundsätzlich drei unterschiedliche Folgen haben: Kurzfristiger Zellzyklusarrest, langfristige Seneszenz oder Apoptose [546]. In humanen Zellen gilt die replikative Seneszenz, die durch kritisch kurze Telomere verursacht wird, als Ursache des bereits 1961 entdeckten Hayflick-Limits [59, 179]. Murine Zellen haben jedoch deutlich längere Telomere und in vielen adulten murinen Geweben wird Telomerase exprimiert. Deshalb wird davon ausgegangen, dass der seneszenzähnliche Replikationsstopp, der in murinen Zellkulturen nach etwa 15-30 Zellteilungen zu beobachten ist, durch externe Faktoren und nicht durch Telomerverkürzung bedingt ist [369, 425, 470]. Die Telomere in späteren Generationen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen sind jedoch so kurz, dass sich hier wie in humanen Zellen eine telomerlängenabhängige Seneszenzinduktion beobachten lässt [137].

Mechanistisch läuft diese Seneszenzinduktion folgendermaßen ab: Phospho-*p53* induziert als Transkriptionsfaktor die Transkription des für *p21* kodierenden Gens *CDKN1A/ CIP1* [128]. *p21* ist ein Inhibitor aller Cyclin-Dependent Kinase (CDK) - Komplexe, der den Zellzyklus sowohl in G1 als auch in G2 anhalten kann [74, 473, 509]. *P21* ist primär für die Seneszenzinduktion verantwortlich und in dauerhaft seneszenten humanen Fibroblasten wieder herunterreguliert [11]. Telomerische DNA-Schäden gehen jedoch mit einer persistenten DDR und anhaltender Seneszenz einher [143]. Diese dauerhafte Seneszenz wird durch erhöhte *CDKN2A/p16*-Proteinlevel vermittelt [11]. *CDKN2A/p16* ist ein Inhibitor der *CDK4-Cyclin-D-* und *CDK6-Cyclin-D-Komplexe*, dessen Aktivierung über Hypophosphorylierung von *Rb* zum dauerhaften Zellzyklusarrest in G1 führt [305].

Wie *p21* und *CDKN2A/p16* ist auch *PAI1* ein Marker und Mediator der Seneszenz [381]. Die *PAI1*-Expression steigt in alternden Organismen, seneszenten Geweben und altersassoziierten Krankheiten wie der IPF an [214]. Insbesondere vermittelt *Pai1* *in vitro* die TGF- $\beta$ -induzierte Seneszenz und die Entstehung des SASP in murinen Typ-II-Pneumozyten. Im Gegensatz dazu sind aus *Pai1*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen isolierte Typ-II-Zellen

resistent gegenüber TGF- $\beta$ -induzierter Seneszenz [381]. Die Vermittlung der Seneszenz durch PAI1 scheint hierbei durch eine Inhibierung des Proteasoms durch PAI1 mit folgender geringerer p53-Degradation und somit erhöhten p53- und p21-Proteinleveln abzulaufen [380].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression von p21 per WB in Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit der pulmonalen p21-Expression in Wildtypmäusen verglichen. Die telomerase-defizienten Tiere wiesen dabei signifikant höhere p21-Proteinlevel auf (Abb. 24). Die mittels RT-PCR aus Lungengewebe bestimmte Expression des für p21 kodierenden Gens *Cip1* war sowohl in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- als auch in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant erhöht (Abb. 25, Abb. 26). Die Expression von *Cdkn2a* war dagegen nur in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht, in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen war sie erhöht, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (Abb. 25, Abb. 26). Interessanterweise war die *Pai1*-Expression, die nur in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse untersucht wurde, hier im Vergleich zum Wildtyp nicht differentiell reguliert, worauf in Kapitel 5.5 genauer eingegangen wird (Abb. 26).

Da A549-Zellen eine homozygote Deletion in *CDKN2A* tragen, wurde in T<sup>+</sup> bzw. T<sup>-</sup> nur die Expression von *CIP1* (= *CDKN1A*) und *PAI1* per RT-PCR untersucht [428]. Für beide Gene fand sich bereits ab Passage 11 eine signifikant höhere Expression in T<sup>-</sup>, die sich mit zunehmender Passagenzahl weiter verstärkte (Abb. 38). Es ist denkbar, dass PAI1 in den A549-Zellen aufgrund der *CDKN2A*-Deletion zur Seneszenzerhaltung essentiell ist, während diese Aufgabe in den KO-Mäusen durch p16 übernommen werden kann. Dies könnte den Expressionsunterschied zwischen den beiden Modellen erklären.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass verkürzte Telomere sowohl *in vitro* im A549-System als auch *in vivo* im Mausmodell zur Seneszenz pulmonaler Zellen führen. Aufgrund der hohen *CIP1*- und *PAI1*-Expression in den telomeraseinhibierten A549-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass hiervon insbesondere Typ-II-Zellen betroffen sind. Eine Aussage über weitere betroffene Zelltypen in den untersuchten murinen Lungen kann nicht getroffen werden, da keine zellspezifische Bestimmung von Seneszenzmarkern durchgeführt wurde. Aufgrund des relativ geringen Anteils der Typ-II-Zellen an der gesamten Lungenzellularität und der dennoch deutlich erhöhten pulmonalen Expression von *Cip1*/p21 in den telomerase-defizienten Mausstämmen ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass hier nicht nur die Typ-II-Zellen seneszent waren.

Senescente Zellen teilen sich nicht mehr und können folglich nach Verletzungen keine Reparatur des betroffenen Gewebes mehr durchführen. Insbesondere die Seneszenz der als Progenitorzellen geltenden Typ-II-Pneumozyten dürfte die Regenerationsfähigkeit des Alveolarepithels der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse folglich stark eingeschränkt haben, was eine mögliche Erklärung für die beobachtete diskrete Emphysementwicklung darstellen könnte.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte *in vivo*- und *in vitro*-Modell der Telomerverkürzung spiegelt trotz der fehlenden Fibroseentwicklung die Situation in humanen Lungen von IPF-Patienten recht gut wieder: Schafer et al. wiesen hier eine im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höhere Expression von *CDKN2A* nach, die zudem mit dem Krankheitsstadium korrelierte [405]. Immunhistochemisch konnte *CDKN2A/p16* sowohl im Alveolarepithel als auch in Fibroblasten der Fibroblasten-Foci sowie in Fibroblasten und hyperplastischen Bronchialzellen im Bereich der Honigwaben lokalisiert werden [405]. Vermutlich liegt auch hier eine replikative Seneszenz aufgrund von Telomerverkürzung vor, da per Immunfluoreszenz eine Kollokalisierung von  $\gamma$ -H2AX mit den Telomeren nachgewiesen werden konnte [405]. Jiang et al. wiesen in aus IPF-Lungen isolierten Typ-II-Pneumozyten im Vergleich zu Kontrollen ebenfalls deutlich erhöhte Level an *CDKN2A/p16*, p21 und PAI1 nach [215]. Alvarez et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass senescente IPF-Fibroblasten einen profibrotischen SASP aufweisen [16]. Die von seneszenten Fibroblasten sezernierten Zytokine können *in vitro* gesunde humane Fibroblasten zur Differenzierung in Myofibroblasten und zur vermehrtem Kollagensekretion anregen [405].

Wie bereits in Kapitel 5.1 und 5.2 beschrieben, ist es möglich, dass kurze Telomere entweder direkt oder durch Störung der Surfactantproteinsynthese ER-Stress verursachen. Es ist jedoch auch denkbar, dass die beobachtete UPR durch Seneszenz (mit) verursacht wurde. Die gleichzeitige Aktivierung von UPR und replikativer Seneszenz wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [301, 422]. Allerdings ist bisher noch ungeklärt, ob die UPR Ursache oder Folge der Seneszenz ist. Für Ersteres spricht, dass Thapsigargin als ER-Stressor in murinen Tubuluszellen die Proteinexpression von p21 induziert und die Zahl per  $\beta$ -Galactosidaseaktivität identifizierten seneszenten Zellen signifikant erhöht [281]. Dörr et al. präsentierten dagegen 2013 Daten, die eher darauf schließen lassen, dass die UPR-Aktivierung in seneszenten murinen Lymphomzellen ein Versuch der Zellen ist, den im Rahmen des SASP deutlich erhöhten Proteinumsatz zu kompensieren [120].

Zusammenfassend kann man anhand der abgehandelten Ausführungen sagen, dass Seneszenz insbesondere der alveolären Progenitorzellen eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit in den telomerasedefizienten Mäusen beobachtete Emphysementwicklung ist. Auch die verminderte Zahl der Typ-II-Pneumozyten pro mikroskopischem Gesichtsfeld könnte durch die emphysematöse Abnahme der pulmonalen Zellularität erklärt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass zusätzlich Typ-II-Zellen durch Apoptose verloren gingen und dass dieser Mangel an Typ-II-Zellen die Emphysementstehung mitbedingte. Hierauf wird im Folgenden genauer eingegangen.

### **AECII-Verlust durch Apoptose**

Stabilisiertes p53 fungiert als Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Transkription des den intrinsischen Apoptoseweg auslösenden BCL2-Proteins PUMA induziert [528]. In der vorliegenden Arbeit wurde in A549-Zellen per RT-PCR die *PUMA*-Expression untersucht, diese war ab Passage 19 in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup> (Abb. 38). Gleichzeitig verstärkt p53 die Genexpression von *DR5*. *DR5* codiert für einen TRAIL-Rezeptor, der den extrinsischen Apoptoseweg auslöst [446]. Die Expression von *Dr5* war in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen signifikant höher als in den Wildtypmäusen (Abb. 25). Auch in den per RT-PCR untersuchten A549-Zellen war die *DR5*-Expression zu jedem untersuchten Zeitpunkt in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup> (Abb. 38). In den untersuchten Modellen waren also proapoptotische Signalwege aktiv und es ist gut vorstellbar, dass diese stromabwärts der DDR durch p53-vermittelt aktiviert worden waren. Infolgedessen könnte es generell zum Verlust von pulmonalen Zellen und insbesondere zum Verlust von Typ-II-Pneumozyten gekommen sein, was schlussendlich zur Entstehung des beobachteten emphysemartigen Lungenphänotyps beigetragen haben könnte (Abb. 23). Gestützt wird diese Theorie durch die Befunde von Lee et al., die in Lungenschnitten von F4 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen einen im Vergleich zu Wt-Tieren 7-fach höheren Anteil apoptotischer Typ-II-Zellen nachweisen konnten. Darüber hinaus beschrieben sie in Typ-II-Alveolarepithelzellen (AECII) aus F2-, F3- und F4-*Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine deutliche Proteinexpression von Caspase 3, Caspase 6 und Bax, welche in Wt-Tieren nicht nachweisbar war [266].

*DR5* und *PUMA* können nicht nur stromabwärts von p53 aktiviert werden, sondern sind auch Zielgene des im Rahmen der UPR aktivierten Transkriptionsfaktors CHOP [385, 513]. Da in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten A549-Zellen ab Passage 11 auch eine signifikant höhere Genexpression für *CHOP* nachgewiesen wurde (Abb.38), lässt

sich nicht abschließend sagen, über welchen der beiden Signalwege die *DR5*- und *PUMA*-Expression in den telomeraseinhibierten A549-Zellen induziert wurde. Am wahrscheinlichsten ist hier wohl ein Zusammenspiel aus DDR und UPR, wobei letztere sowohl durch verstärkte Proteinexpression bei genomischer Instabilität als auch durch gestörte Surfactantprozessierung oder durch Proteotoxizität des SASP verursacht werden könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit sowohl in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse *in vivo* als auch in telomeraseinhibierten A549-Zellen *in vitro* beobachtete verstärkte Genexpression von *DR5/Dr5* spiegelt die Situation in IPF-Lungen recht gut wider: Akram et al. wiesen hier eine in den Alveolarepithelzellen deutlich erhöhte Proteinexpression von DR5 nach. Diese ging mit erhöhten p53-Leveln und positivem TUNEL-Staining einher [9].

In der vorliegenden Arbeit wurde in den telomeraseinhibierten A549-Zellen zudem per RT-PCR eine zu jedem Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zu den unbehandelten A549-Zellen erhöhte *ASK1*-Expression beobachtet (Abb. 38). Wie p53, so kann auch ASK1 den programmierten Zelltod vermitteln. ASK1 phosphoryliert und aktiviert dadurch MAP-Kinase-Kinasen, die wiederum die MAP-Kinasen JNK und p38 aktivieren [178, 203]. Aktives JNK hat kontextabhängige Wirkungen, ist aber insbesondere für die Auslösung der Apoptose bekannt [178]. Dies erfolgt einerseits über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun und die folgende vermehrte Transkription proapoptotischer Gene wie BAX, andererseits auch direkt durch Phosphorylierung und Inaktivierung der antiapoptotischen Proteine BCL2 und BCL-XL, wodurch die intrinsische Apoptose ausgelöst wird [178, 295, 303].

Natürlich gilt es auch hier wieder zu bedenken, dass eine erhöhte *ASK1*-Transkription nicht zwangsläufig mit mehr ASK1-Protein einhergeht. Zudem wird die ASK1-Aktivität primär posttranslational reguliert [178]. Dennoch gibt die Erhöhung der *ASK1*-mRNA einen Hinweis darauf, dass in den als Typ-II-Zellmodell geltenden telomeraseinhibierten A549-Zellen auch p53-unabhängige proapoptotische Signalwege aktiv waren.

Trotz der Aktivierung von Signalwegen der Seneszenz und Apoptose wurde in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse keine Fibroseentwicklung beobachtet (Abb. 23). Lee et al. beobachteten selbst in F4 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen keine spontane Fibrose [266]. Allerdings konnten Povedano et al. nachweisen, dass *Tert*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse der zweiten und vierten Generation bereits auf für Wildtypmäuse subtoxische Mengen an Bleomycin mit der Entwicklung einer Lungenfibrose reagierten [366]. Dies spricht dafür, dass kurze Telomere die Regenerationsfähigkeit des

Alveolarepithels so weit herabsetzen, dass dieses auf einen „Second Hit“ nicht mehr adäquat reagieren kann und durch fibrotisches Gewebe ersetzt wird. Die aktuelle Theorie zur Pathogenese der IPF geht ebenfalls davon aus, dass eine genetische Vorbelastung wie beispielsweise kurze Telomere in Kombination mit einem weiteren belastenden Faktor wie viralen Infektionen, Zigarettenrauch oder Umweltnoxen als „Second Hit“ zur Entstehung der Lungenfibrose nötig sind [238]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mausmodell stützt diese These und zeigt, dass eine alleinige Telomerverkürzung nicht ausreicht, um fibrotische Veränderungen auszulösen.

Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass sich die in dieser Arbeit im Mausmodell beobachteten Folgen verkürzter Telomere sehr wahrscheinlich nicht eins zu eins auf IPF-Patienten mit kurzen Telomeren übertragen lassen. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 ausgeführt, besitzen Mäuse deutlich längere Telomere als Menschen [75]. Daraus folgt leider auch, dass sich Mäuse nur in begrenztem Maße dazu eignen, menschliche telomerassoziierte Krankheiten zu modellieren. Während Menschen schon durch Heterozygotie in Telomerasegenen schwere Krankheiten wie Dyskeratosis congenita mit Lungenfibrose, aplastischer Anämie und Leberzirrhose entwickeln, zeigen homozygote  $Terc^{(-/-)}$ -Mäuse erst ab der 3.-5. Generation einen pathologischen Phänotyp. Wie Degryse et al. nachweisen konnten, sind die Auswirkungen selbst dann milder als beim Menschen. Es zeigen sich zwar hämatologische Auffälligkeiten, Wundheilungsstörungen, erhöhte Anfälligkeit für Tumorerkrankungen, Gewichtsabnahme und eine verkürzte Lebenserwartung, aber keine spontane Lungenfibrose [108]. Es ist also nicht auszuschließen, dass das Ausbleiben einer Lungenfibrose trotz kurzer Telomere in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen schlicht auf den Speziesunterschied zwischen Mäusen und Menschen zurückzuführen ist. In diesem Fall müsste man davon ausgehen, dass sich das Mausmodell nicht für die Simulation der IPF-Entstehung eignet.

Grafik 44 fasst die in diesem Kapitel aufgestellte Theorie zur Emphysementstehung durch Telomerverkürzung in  $Terc^{(-/-)}$ -Mäusen noch einmal zusammen.

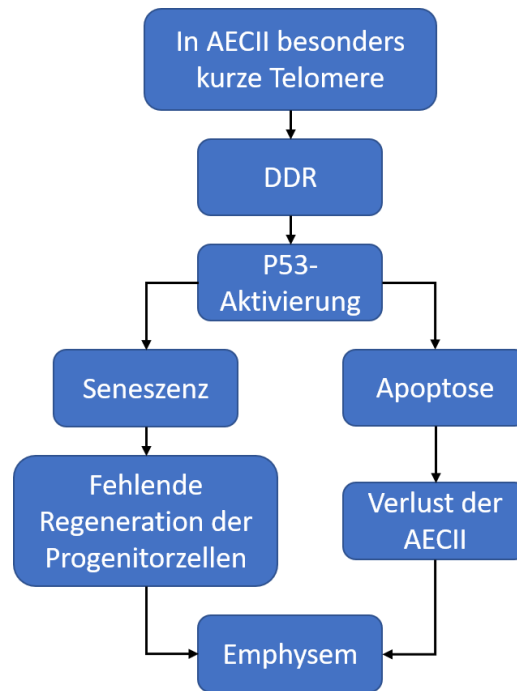


Abbildung 44: Emphysementstehung durch Telomerverkürzung

Abkürzungen: AECII= Typ-II-Pneumozyten, DDR= DNA Damage Response

#### 5.4 Aktivierung proinflammatorischer Signalwege durch Telomerverkürzung

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass Telomerverkürzung durch Telomerase-KO oder durch Telomeraseinhibition sowohl *in vivo* im Mausmodell als auch *in vitro* in humanen A549-Zellen zur vermehrten Aktivierung proinflammatorischer Signalwege führt. Mögliche Gründe hierfür sind ER-Stress, Seneszenz und SASP sowie Signalwege der DNA Damage Response. Im folgenden Kapitel soll hierauf genauer eingegangen werden.

Sowohl in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- als auch in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen wurde per RT-PCR eine im Vergleich zum Wt erhöhte pulmonale Expression von *Casp11* beobachtet (Abb. 25, Abb. 26). Wie bereits erwähnt, codiert *Casp11* für eine proinflammatorische Caspase, die über das nichtkanonische Inflammasom die Spaltung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie die Pyroptose auslösen kann [340, 522]. Darüber hinaus konnten Endo et al. zeigen, dass *Casp11* ein Zielgen des Transkriptionsfaktor Chop ist, dessen Transkription im Rahmen von ER-Stress in murinen Makrophagen induziert wird [130]. Dies ist nicht nur auf Makrophagen beschränkt: Sowohl ER-Stress als auch Chop-Überexpression führen in Rattenastrozyten *in vitro* zur vermehrten *Casp11*-Transkription und zu erhöhten *Casp11*-Proteinleveln [142]. Die in der vorliegenden Arbeit in den KO-Mäusen beobachtete signifikant erhöhte *Casp11*-

Transkription ist aber wohl eher nicht auf Chop-Aktivierung verursacht: Sowohl auf Gen- als auch auf Proteinexpressionsebene konnte keine signifikante Erhöhung von *Chop/Chop* in den KO-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 30).

Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass die erhöhte *Casp11*-Transkription in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse auf die Seneszenzinduktion durch Telomerverkürzung zurückzuführen ist. Caspase 11 ist *in vitro* essentiell für die Spaltung von Interleukin 1 alpha (IL- $\alpha$ ) in dessen aktive Form [494]. IL-1 $\alpha$  ist wiederum ein grundlegender Regulator für die Transkription und Sekretion der SASP-Hauptbestandteile IL-6 und Interleukin 8 (IL-8) [355]. Wiggins et al. konnten zeigen, dass ein Knockout der Caspase 5, einem humanen Homolog der Caspase 11, eine massive Reduktion der IL-6- und IL-8-Produktion in seneszenten Zellen nach sich zieht [494]. Daraus lässt sich schließen, dass Caspase 5 in seneszenten humanen Zellen den SASP kontrolliert. Ob sich das auch auf Mausmodelle übertragen lässt, ist unklar. Sicher ist jedoch, dass sich in murinen seneszenten Zellen *in vivo* erhöhte Proteinlevel an Caspase 11 finden und dass ein *Casp11*-Knockout *in vivo* zur Beeinträchtigung der Immunclearance seneszenten Zellen und folglich zu einer Akkumulation derselben führt [494]. Caspase 11 spielt also in jedem Fall im Rahmen der Seneszenz sowohl in humanen als auch in murinen Zellen eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit fanden sich, wie bereits in Kapitel 5.3 diskutiert, im Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene erhöhte Seneszenzmarker (Abb. 24-26). Folglich liegt die Annahme nahe, dass die in den KO-Mäusen beobachtete erhöhte pulmonale *Casp11*-Expression seneszenzbedingt war.

In der vorliegenden Arbeit wurde per RT-PCR aus Lungengewebe weiterhin eine im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant erhöhte *Nlrp3*-Transkription in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen beobachtet (Abb. 25). In den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen wurde die *Nlrp3*-Expression nicht untersucht. Eine mögliche Erklärung ist auch hier wieder die Seneszenz, deren Marker auf Gen- und Proteinebene in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse erhöht waren (Abb. 24-26). Acosta et al. konnten nachweisen, dass in seneszenten humanen Fibroblasten das Proteinlevel von NLRP3 erhöht ist [3]. Da in denselben Zellen Caspase-1-Aktivität und die Sekretion von maturem IL-1 $\beta$  nachgewiesen wurde, schlossen Acosta et al., dass das NLRP3-Inflammasom an der Entstehung des SASP beteiligt ist [3]. Es ist vorstellbar, dass Seneszenz nicht nur mit erhöhten NLRP3-Proteinleveln, sondern auch mit vermehrter *NLRP3*-Transkription, wie sie in der vorliegenden Arbeit in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen beobachtet wurde, einhergeht.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Expression von *Nlrp3* in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse im Rahmen der ablaufenden DDR erhöht war. Kurze Telomere werden als Doppelstrangbruch erkannt [170]. Die an der Doppelstrangbruch-DDR beteiligte Kinase ATM liegt in humanen Zellen *in vitro* im Ruhezustand im Komplex mit NLRP3 vor. In murinen *Nlrp3*<sup>(-/-)</sup>-Makrophagen ist die doppelstrangbruchinduzierte ATP-Phosphorylierung deutlich abgeschwächt, sodass man davon ausgehen kann, dass Nlrp3 für die Doppelstrangbruchreparatur eine wichtige Rolle spielt [60].

Die erhöhte *NLRP3*-Expression in den Lungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse gibt die Situation in IPF-Lungen recht gut wieder. Hier zeigen einerseits BAL-Makrophagen erhöhte *NLRP3*-Level, andererseits ist die *NLRP3*-Proteinexpression insbesondere im Alveolarepithel erhöht [213, 261]. Es ist gut möglich, dass auch in IPF-Lungen kurze Telomere eine Rolle in der Erhöhung der *NLRP3*-Expression spielen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit in der RT-PCR aus Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse eine im Vergleich zum Wt signifikant höhere *Il1b*-Expression beobachtet (Abb. 25). Dies wurde von Chen et al. bereits für *F2 Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse beschrieben [82]. Wie schon in Kapitel 3.3 erläutert, ist IL-1 $\beta$  ein proinflammatorisches Zytokin, das primär von Makrophagen und Monozyten produziert wird [115]. Darüber hinaus ist IL-1 $\beta$  für die Seneszenz bedeutsam: So konnten Shang et al. zeigen, dass Rattenastrozyten *in vitro* durch die Behandlung mit IL-1 $\beta$  seneszent werden und SASP-Komponenten wie IL-6 und IL-8 sezernieren [420]. Auch in humanen Chondrozyten kann IL-1 $\beta$  Seneszenz und SASP induzieren [365]. IL-1 $\beta$  ist überdies selbst ein proinflammatorischer SASP-Bestandteil [100]. Es ist also möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete *Il-1b*-Expressionserhöhung auf Seneszenz pulmonaler Zellen zurückzuführen ist (vgl. Abb. 24-26, Erhöhung der Seneszenzmarker in Lungen der KO-Mäuse).

Da Monozyten und Makrophagen die Hauptquelle für IL-1 $\beta$  sind, ist es gut vorstellbar, dass diese auch in den *F3 Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen in der vorliegenden Arbeit die Ursache der erhöhten *Il-1b*-Expression darstellten [115].

An dieser Stelle muss jedoch bedacht werden, dass man aus der alleinigen Erhöhung der *Il1b*-Expression auf der Transkriptionsebene keine endgültigen Schlüsse ziehen kann. *Il-1b* wird durch diverse Stimuli transkribiert, ohne translatiert zu werden [115, 224]. Zudem wird IL-1 $\beta$  als inaktive Vorstufe synthetisiert, die erst, meist durch Caspase 1, zur aktiven Form gespalten werden muss [115, 248]. Eine Erhöhung des *IL1b*-Transkriptes in den Lungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen

könnte also proinflammatorische Wirkung haben, an der Seneszenzinduktion beteiligt sein, oder völlig ohne Konsequenz bleiben.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *IL6* in telomeraseinhibierten im Vergleich zu unbehandelten A549-Zellen untersucht. In den unbehandelten Zellen war in Passage 11 und 19 keine Expression von *IL6* nachweisbar, während sich in Passage 46 eine geringe Expression beobachten ließ. Dagegen zeigte sich in mit dem Telomeraseinhibitor BIBR1532 behandelten Zellen nach einer Woche Kultivierung eine niedrige *IL6*-Expression. Diese stieg nach fünf Wochen massiv an, um dann nach 19 Wochen wieder auf das Ausgangsniveau zurückzufallen (Abb. 42).

Welche Faktoren könnten zur Erhöhung der *IL6*-Expression in T<sup>-</sup> beitragen? Eine Möglichkeit stellt ER-Stress dar. Dieser kann die *IL6*-Expression über unterschiedliche Mechanismen deutlich erhöhen: Die Regulation der *IL6*-Expression findet primär auf Transkriptionsebene statt, ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist hierbei NF-κB [278]. Alle drei Arme der UPR können NF-κB aktivieren. IRE1 kann beispielsweise *in vitro* TRAF2 binden und dadurch stromabwärts die NF-κB-Aktivität erhöhen [220]. Die PERK-vermittelte Translationsrepression über die eIF2α- Phosphorylierung bewirkt *in vitro* in Mausfibroblasten eine Freigabe von NF-κB aus dem inhibitorischen Komplex mit Inhibitor of NF-κB (IKB), da dessen Halbwertszeit kürzer als die von NF-κB ist [111]. Yamazaki et al. wiesen nach, dass ATF6 *in vitro* in murinen Fibroblasten und Nierenepithelzellen aus Ratten den AKT-Signalweg auslösen kann, welcher wiederum über Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase (IKK) -Phosphorylierung zur Zunahme der Aktivität von NF-κB führt [32, 514].

Auch NF-κB- unabhängige Mechanismen der UPR-vermittelten *IL6*-Transkription sind bekannt: Meares et al. beobachteten *in vitro* in humanen Astrozyten eine durch ER-Stress verstärkte *IL6*-Transkription. Dabei wiesen sie eine Interaktion zwischen JAK und PERK mit folgender PERK- und STAT3-Phosphorylierung nach, sodass sie schlossen, dass in diesem Fall STAT3 die Transkription von *IL6* induziert [307]. Darüber hinaus wiesen Fang et al. *in vitro* in humanen Nierenepithelzellen nach, dass gespleißtes XBP1 direkt an den *IL6*-Promotor binden kann [135]. Zudem kann CHOP in humanen Melanomzellen die *IL-6*-Transkription erhöhen, indem es deren Inhibitoren abfängt [177].

Außer der UPR könnte auch die beobachtete replikative Seneszenz der telomeraseinhibierten Zellen eine wichtige Rolle für die vermehrte *IL6*-Transkription gespielt haben. Sowohl die *CIP1*- als auch die *PAII*-Expression war in T<sup>-</sup> ab der ersten untersuchten Passage höher als in T<sup>+</sup> (Abb. 38); zudem proliferierten die Zellen über den

Kultivierungszeitraum von 19 Wochen zunehmend langsamer, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass zumindest ein Großteil der telomeraseinhibierten A549-Zellen seneszent war. IL-6 gilt als der wichtigste Bestandteil des SASP, der von seneszenten humanen und murinen Zellen sezerniert wird. Erhöhte IL-6-Level wurden hierbei in vielen unterschiedlichen seneszenten Zellarten, beispielsweise Monozyten, Fibroblasten und Epithelzellen, unabhängig von der Art der Seneszenzinduktion beobachtet [98]. IL-6 ist dabei auch selbst ein Mediator der Seneszenz, so führt die *in vitro*-Behandlung humaner Fibroblasten mit IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor innerhalb von 8 Tagen zum Wachstumsarrest und zur Zunahme der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität [242].

Die Erhöhung der IL-6-Level in der Seneszenz wird dabei vermutlich durch die DDR gesteuert: Kritisch kurze Telomere in seneszenten Zellen werden als Doppelstrangbruch erkannt und verursachen eine permanente DDR [114]. Diese scheint auch für die verstärkte IL-6-Sekretion, die in humanen Fibroblasten sowohl durch extratelomerische Doppelstrangbrüche als auch durch kurze Telomere in seneszenten Zellen verursacht werden kann, verantwortlich zu sein: Rodier et al. konnten zeigen, dass eine Depletion der an der Doppelstrangbruch-DDR beteiligten Proteine ATM, Nibrin oder Checkpoint Kinase 2 die IL-6-Synthese in diesen Zellen hemmt [390].

IL-6 ist zwar primär ein proinflammatorisches Zytokin, allerdings zeigt es auch profibrotische Wirkung. *In vitro* induziert die IL-6-Überexpression in Fibroblasten über den STAT3-Signalweg und TGF- $\beta$ -Aktivierung die Proliferation von Fibroblasten, deren Differenzierung zu Myofibroblasten sowie die Kollagenproduktion [354, 480]. *Il6*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp nur eine abgeschwächte Fibroseentwicklung nach Bleomycin-Behandlung [400]. Passend zu dieser profibrotischen Wirkung von IL-6 sezernieren sowohl aus IPF-Lungen isolierte Makrophagen als auch Fibroblasten deutlich größere Mengen an IL-6 als aus gesunden Lungen isolierte [131, 544]. In AECII aus IPF-Lungen findet sich eine robuste IL-6-Expression, während Typ-II-Pneumozyten aus gesunden Lungen kein IL-6 produzieren [102]. Es ist also möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit in den telomeraseinhibierten A549-Zellen beobachtete vermehrte *IL6*-Expression eine Verbindung zwischen kurzen Telomeren und Fibroseentwicklung darstellt.

Während Seneszenz, DNA Damage und ER-Stress alle valide Erklärungen für die *IL6*-Expression in den telomeraseinhibierten A549-Zellen darstellen, ist nicht ersichtlich, warum diese zuerst stark anstieg und dann wieder abfiel. Keiner der per RT-PCR untersuchten UPR- und Seneszenzmarker zeigte in seinem Expressionsmuster den

gleichen Verlauf wie *IL6*. Die Expression von *ATF6*, *ATF4*, *XBPI*, *CHOP*, *TRB3*, *DR5*, *PUMA* und *CDKN1A* stieg mit höherer Passagenzahl immer weiter an oder blieb zumindest stabil hoch (Abb. 38). Ein ähnlicher Verlauf der Expression zeigte sich lediglich für *CTGF* (Abb. 42), doch auch hier ist die Ursache unklar.

Zu den bisher zu *IL6* diskutierten Ergebnissen gilt es zu bedenken, dass man aus der Untersuchung und Erhöhung der *IL6*-Transkription nicht mit Sicherheit darauf schließen kann, dass IL-6 auch auf der Proteinebene vermehrt synthetisiert wurde. *IL6* wird posttranskriptionell stark reguliert: An den untranslatierten Bereich am 3'-Ende der *IL6*-mRNA binden unterschiedliche microRNA's und RNA-bindende Proteine, die zur Destabilisierung der mRNA beitragen [448]. Zudem wird die *IL6*-mRNA durch die Nuklease Regnase-1 abgebaut [302].

## 5.5 Aktivierung profibrotischer Signalwege durch Telomerverkürzung

Es ist bekannt, dass eine Telomerverkürzung allein, zumindest im Mausmodell, ohne „Second Hit“ nicht zur Entstehung einer pulmonalen Fibrose führt [266].

Dennoch ist die Regenerationsfähigkeit des Alveolarepithels verringert. F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse besitzen im Vergleich zu Wt-Mäusen weniger bronchopulmonale Stammzellen und Typ-II-Pneumozyten, dementsprechend regeneriert sich ihr Lungengewebe nach einer partiellen Pneumonektomie wesentlich schlechter als das von Wildtyp-Tieren [209]. Diese verringerte Regenerationsfähigkeit hat eine Neigung zur Fibrose zur Folge: Auf einen „Second Hit“ mit Bleomycin oder LPS reagieren F2/F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit deutlich stärkerer Fibroseentwicklung als WT-Tiere [284]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse zeigten ebenfalls keine spontane Fibroseentwicklung (Abb. 23). Es wurde untersucht, ob sich dennoch bereits im Ruhezustand eine Fibroseneigung bzw. die Aktivierung profibrotischer Signalwege abzeichnete.

Hierfür wurde die Expression von *Pai1* per RT-PCR aus Lungengewebe der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse untersucht. Per Western Blot wurde die pulmonale Proteinexpression von Arginase-1 und Integrin-β6 untersucht und per IHC die Proteinexpression von TGF-β und Arginase-1. Aus telomeraseinhibitierten A549-Zellen wurde per RT-PCR die Genexpression von *CTGF*, *EDN1*, *PAI1*, *TGFBI*, *TGFBR2*, *VEGFA*, *PLAT* und *PLAU* untersucht.

PAI1 ist für die Wundheilung unerlässlich, da es über Inhibition von uPA und tPA den Abbau von Proteinen der EZM und die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen hemmt. Dauerhafte PAI1-Aktivierung kann über diesen Mechanismus jedoch zu Fibrose

führen [430]. Passend hierzu ist die PAI-Expression in fibrotischen Erkrankungen erhöht. Beispielsweise exprimieren dermale Fibroblasten aus Sklerodermiepatienten deutlich mehr *PAII* als Fibroblasten aus gesunder Haut [462]. In der BAL von IPF-Patienten finden sich ebenso signifikant höhere PAI1-Level als in der BAL gesunder Kontrollen [249]. *Pai1*-Deletion schwächt die bleomycininduzierte Fibrose im Mausmodell deutlich ab [214]. *In vitro* wird *Pai1* in murinen AECII stromabwärts von TGF- $\beta$  aktiviert und vermittelt die Sekretion der profibrotischen Mediatoren PDGF, Interleukin-4 und Interleukin-13 [381]. Die Aktivierung von PAI1 durch TGF- $\beta$  wurde dabei für viele unterschiedliche Zelltypen beschrieben, der genaue molekulare Mechanismus unterscheidet sich jedoch je nach Gewebe [151].

Interessanterweise war in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen die *Pai1*-Expression im Vergleich zum Wildtyp unverändert, während die telomeraseinhibierten A549-Zellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine signifikant höhere *PAII*-Expression zeigten als die unbehandelten A549-Zellen (Abb. 26, Abb. 42).

Die Erhöhung der *PAII*-Expression in telomeraseinhibierten A549-Zellen (T<sup>-</sup>) steht im Einklang mit bisher publizierten Ergebnissen. Wie bereits in Kapitel 5.3 ausgeführt, ist PAI1 ein Mediator und Marker der Seneszenz sowohl in humanen als auch in murinen Zellen [381, 510]. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen PAI1 und der Telomerlänge: In humanen Zellen verkürzt sich die durchschnittliche Telomerlänge pro Jahr um ca. 26 bp [419]. Gleichzeitig steigen die PAI1-Serumlevel mit zunehmendem Alter an [176]. Peng et al. konnten in einer Studie in einer Population amerikanischer Ureinwohner nachweisen, dass ein hohes PAI1-Serumlevel mit kurzer durchschnittlichen Telomerlänge in Leukozyten korreliert. Diese Korrelation blieb auch nach altersabhängiger Korrektur der Telomerlänge bestehen [363].

Warum die *Pai1*-Expression in den in der vorliegenden Arbeit per RT-PCR untersuchten Lungen der F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse nicht erhöht war, bleibt unklar. Auch in Mäusen wird die Seneszenz über *Pai1* vermittelt, *Pai*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse sind resistent gegen TGF- $\beta$ -induzierte Seneszenz [381]. In der vorliegenden Arbeit waren die Seneszenzmarker *Cip1* in beiden KO-Mauslinien und *Cdkn2a* zumindest in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen in der pulmonalen RT-PCR im Vergleich zu Wt-Tieren signifikant erhöht (Abb. 26), sodass man eigentlich auch ein erhöhtes *Pai1*-Level erwarten könnte. Denkbar ist jedoch, wie bereits in Kapitel 5.3 erwähnt, dass PAI1 in den in telomeraseinhibierten A549-Zellen (T<sup>-</sup>) aufgrund der *CDKN2A*-Deletion zur Seneszenzerhaltung essentiell ist, während diese Aufgabe in den KO-Mäusen durch p16 übernommen werden kann. Die fehlende *Pai1*-

Erhöhung passt auch zur Beobachtung, dass die telomerase-defizienten Mäuse trotz kurzer Telomere keine Fibrose entwickelten.

Wie bereits ausgeführt, ist PAI1 ein direkter Inhibitor der Serinproteasen tPA und uPA. Diese Inhibition geschieht durch Bildung äquimolarer 1:1-Komplexe mit den beiden Plasminogenaktivatoren [126]. Um die Auswirkungen der beobachteten erhöhten *PAI1*-Expression zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *PLAT* und *PLAU* per RT-PCR aus telomerase-inhibierten A549-Zellen analysiert. Über den Beobachtungszeitraum von 19 Wochen blieb die Expression von *PLAU* unverändert und unterschied sich zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> nicht. Im Gegensatz dazu war die *PLAT*-Expression in jeder untersuchten Passage in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>, nahm jedoch insgesamt mit der Zeit ab (Abb. 42). Denkbar ist, dass die *PLAT*-Expression kompensatorisch erhöht war, um die vermehrte *PAI1*-Expression auszugleichen. Unklar ist jedoch, warum die *PLAT*-Expression über die Zeit abnahm und warum *PLAU* nicht ebenfalls kompensatorisch verstärkt exprimiert wurde. Zu bedenken ist, dass sich tPA und uPA zwar strukturell ähneln und beide sowohl Plasmin als auch MMP's aktivieren können, sie davon abgesehen jedoch deutlich unterschiedliche biologische Aufgaben erfüllen und es somit nicht verwundern sollte, wenn sie differenziell reguliert werden [148, 201, 543]. Während tPA - fibrinabhängig und intravaskulär - primär für die Aktivierung von Plasmin im Rahmen der Auflösung von Fibrinthromben zuständig ist, spielt das meist rezeptorgebunden auf der Zelloberfläche vorliegende uPA darüber hinaus eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion, -migration und EZM-Abbau [148, 521, 543]. Zudem ist uPA an der Regulation der AECII-Apoptose beteiligt [54].

Bei bereits in Passage 11 nach nur einer Woche Kultivierung in T<sup>-</sup> deutlich erhöhter *PLAT*-Expression ist auch ein Off-Target-Effekt der Telomeraseinhibition nicht auszuschließen.

Eine andere Erklärung für die erhöhte *PLAT*-Expression in T<sup>-</sup> ist die Seneszenz der telomerase-inhibierten A549-Zellen. West et al. konnten per Northern Blot *in vitro* zeigen, dass in seneszenten humanen Hautfibroblasten die Expression von *PLAT* im Vergleich zu proliferierenden Zellen zunimmt [492]. Dies könnte auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten telomerase-inhibierten A549-Zellen eine Rolle gespielt haben. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass West et al. in derselben Publikation beschrieben, dass sich die *PLAT*-Expression zwischen seneszenten und proliferierenden humanen Lungenfibroblasten nicht unterschied [492]. Folglich unterscheidet sich die

*PLAT*-Expression zwischen unterschiedlichen seneszenten Zelltypen deutlich und es bleibt fraglich, ob die Ergebnisse auf die A549-Zellen übertragbar sind.

Auch die Folgen der erhöhten *PLAT*-Expression lassen sich kaum abschätzen. Einerseits wurde in der vorliegenden Arbeit nur die Genexpressionsebene untersucht, daraus lässt sich nicht sicher auf die Expression des tPA-Proteins schließen. Andererseits wurde in T ebenfalls per RT-PCR eine signifikant erhöhte *PAII*-Expression beobachtet (Abb. 42). Es ist möglich, dass eine vermehrte tPA-Produktion aufgrund der Inhibition von tPA durch PAII gar nicht zu erhöhter Aktivität der Serinprotease führte. Hinzu kommt, dass zur Wirkung von tPA auf den Fibroseprozess widersprüchliche Daten vorliegen: Auf der einen Seite gilt tPA als antifibrotisches Enzym, das direkt oder über Plasminspaltung MMP's aktivieren und somit die übermäßige Akkumulation von EZM-Bestandteilen wie Kollagen verhindern kann [201, 430]. Andererseits ist tPA unabhängig von seiner proteolytischen Funktion auch als Zytokin wirksam. In dieser Funktion wirkt es in murinen renalen Fibroblasten und Myofibroblasten *in vitro* und *in vivo* über Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2 (Erk1/Erk2)-Phosphorylierung antiapoptotisch [200]. Folglich sind *Plat*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse weniger anfällig für renale Fibrose durch Ureterobstruktion [517]. Auch in murinen Lungenfibroblasten *in vitro* konnten Chen et al. einen Erk1/Erk2-vermittelten proliferationsfördernden Effekt von tPA nachweisen [80]. Weiterhin wies die Gruppe per IHC in Lungen mit inhalativem Bleomycin behandelte Mäuse eine vermehrte tPA-Expression nach [80].

TGF- $\beta$  ist ein ubiquitär synthetisiertes Zytokin, das an diversen Signalwegen beteiligt ist. Zu diesen gehören beispielsweise die Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose unterschiedlicher Zelltypen und die Kontrolle der EZM-Synthese. Auf diese Weise ist TGF- $\beta$  an Embryogenese, Wundheilung, Immunantwort und Tumorentstehung beteiligt [399].

Weiterhin übt TGF- $\beta$  über unterschiedliche Signalwege eine starke profibrotische Wirkung aus. Einerseits hemmt TGF- $\beta$  *in vitro* die Proliferation der als Progenitorzellen geltenden Typ-II-Pneumozyten [397]. Gleichzeitig fördert TGF- $\beta$  *in vitro* in murinen AECII deren Differenzierung zu Typ-I-Zellen [542]. Auf der anderen Seite regt TGF- $\beta$  in embryonalen Mausfibroblasten *in vitro* deren Proliferation sowie Kollagenproduktion an [507]. In humanen pulmonalen Fibroblasten bewirkt eine TGF- $\beta$ -Behandlung *in vitro* die Differenzierung zu matrixproduzierenden Myofibroblasten [68]. In aus Ratten isolierten AECII *in vitro* kann durch TGF- $\beta$  die EMT zu myofibroblastenähnlichen Zellen

ausgelöst werden. Hierdurch gehen gleichzeitig Progenitorzellen verloren und die Zahl profibrotischer Myofibroblasten nimmt zu [495].

In der vorliegenden Arbeit wurde die TGF- $\beta$  -Expression per IHC in Lungenschnitten von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen untersucht und mit der in Wt-Mäusen verglichen. In den Wildtyp-Tieren war keine TGF- $\beta$ -Expression nachweisbar. Im Gegensatz dazu fand sich in beiden KO-Stämmen eine robuste TGF- $\beta$ -Expression in pulmonalen Makrophagen (Abb. 31).

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al., die im WB aus den Lungen von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine im Vergleich zum Wt deutlich erhöhte Expression von TGF- $\beta$  nachweisen konnten [284]. Zudem zeigte sich sowohl in den F2 als auch in den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im pulmonalen WB ein markanter Anstieg der Expression von phosphoryliertem Smad3 [284]. SMAD3 und SMAD2 werden in Säugetieren stromabwärts von rezeptorgebundenem TGF- $\beta$  phosphoryliert und translozieren im Komplex mit SMAD4 in den Nukleus, wo die drei SMAD's als Transkriptionsfaktoren wirken [331].

Die TGF- $\beta$ -Expression in den Lungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-KO-Mäuse kolokalisierte mit der Expression des Makrophagenmarkers F4/80 (Abb. 31). Dies war erwartet worden, da in der Literatur in murinen Lungen Alveolarmakrophagen als wichtigste *Tgfb1* -Quelle beschrieben wurden [531]. Allerdings sind sie nicht die einzige Quelle: Yu et al. konnten in gesundem murinen Alveolarepithel per PCR eine geringe *Tgfb1*-Expression nachweisen [531]. Auch in humanen Lungen konnte per IHC eine schwache Expression von TGF- $\beta$  in Alveolarepithel gezeigt werden. In Lungen von IPF-Patienten war das TGF- $\beta$ -Proteinlevel im Alveolarepithel dagegen deutlich erhöht [48].

Passend hierzu wiesen die in der vorliegenden Arbeit per RT-PCR untersuchten A549-Zellen ein geringes basales Level an *TGFBI* auf. In den telomeraseinhibierten A549-Zellen war die *TGFBI*-Expression dagegen zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant erhöht und stieg während des Beobachtungszeitraums weiter an (Abb. 42). Man kann also schließen, dass eine Telomerverkürzung die Produktion von TGF- $\beta$  sowohl in murinen Alveolarmakrophagen als auch in humanen Typ-II-Zellen erhöht.

Es ist gut möglich, dass dies durch die durch Telomerverkürzung induzierte Seneszenz bedingt ist, deren Marker in der vorliegenden Arbeit sowohl in den A549-Zellen als auch in den KO-Mäusen erhöht waren (Abb. 24-26, Abb. 38, Abb. 42). TGF- $\beta$  ist als Bestandteil des SASP bekannt [459]. Zudem kann TGF- $\beta$  selbst eine Seneszenzinduktion

verursachen: Werden humane Bronchialepithelzellen *in vitro* mit TGF- $\beta$  behandelt, entwickeln sie einen seneszenten Phänotyp mit erhöhter  $\beta$ -Galactosidaseaktivität und verstärkter p21-Proteinexpression [315]. Die Seneszenzinduktion durch TGF- $\beta$  wurde auch für andere Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten und hepatozelluläre Karzinomzellen beschrieben [107, 415].

Die TGF- $\beta$ -Expression könnte eventuell mit für die in der vorliegenden Arbeit aufgefallene verringerte Surfactantproteinproduktion in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen verantwortlich sein. Zhao et al. konnten *in vitro* in murinen Typ-II-Zellen nachweisen, dass TGF- $\beta$ -Behandlung die Expression von *Sftpa*, *Sftpb* und *Sftpc* signifikant senkt. Auch auf der Proteinebene konnten sie im WB und per Immunfluoreszenz eine deutlich reduzierte Expression von proSP-C nachweisen [542].

TGF- $\beta$  bindet direkt an TGFBR2, der daraufhin TGFBR1 bindet, phosphoryliert und somit aktiviert [331, 501]. Wie bereits erwähnt, phosphoryliert TGFBR1 im Rahmen des kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweges seinerseits SMAD2 und SMAD3, die im Komplex mit SMAD4 in den Nukleus translozieren, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken [331, 501]. Weiterhin laufen auch alle bekannten nichtkanonische Signalwege über TGFBR2 [333]. Ein Beispiel für einen nichtkanonischen Signalweg ist die Phosphorylierung und Aktivierung von Erk durch TGF- $\beta$ , die erstmals 2007 von Lee et al. *in vitro* in Meerkatzen-Fibroblasten und pulmonalen Nerz-Epithelzellen beschrieben wurde [268].

In der vorliegenden Arbeit wurde die *TGFBR2*-Expression in telomeraseinhibitierten A549-Zellen per RT-PCR untersucht. Interessanterweise war die *TGFBR2*-Expression in Passage 19 und 46 in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>, während es zu Beginn der Untersuchungen in Passage 11 genau umgekehrt war (Grafik 42).

Rojas et al. konnten *in vitro* in einer humanen Kolonkarzinomlinie zeigen, dass das Ausmaß der TGFBR2-Expression linear mit der Menge an phosphoryliertem ERK korreliert. Auch die SMAD2-Phosphorylierung nahm mit zunehmender TGFBR2-Expression zu, wenn auch nicht linear [392]. Es ist gut vorstellbar, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete vermehrte *TGFBR2*-Expression in T<sup>-</sup> ebenfalls zu einer Verstärkung der Signalweiterleitung stromabwärts des profibrotischen Zytokins TGF- $\beta$  führte. Es muss jedoch bedacht werden, dass auch hier in der vorliegenden Arbeit nur die Genexpressionebene untersucht wurde. Zudem ist nicht klar, inwieweit die Ergebnisse von Rojas et al. auf A549-Zellen übertragbar sind. Auch der Grund für die initial in T<sup>+</sup> höhere *TGFBR2*-Expression bleibt ungeklärt.

TGF-beta liegt in der EZM gebunden an LAP und LTBP vor [496]. Aus diesem Komplex kann es einerseits durch Proteolyse, andererseits auch durch mechanischen Stress freigesetzt werden [496, 530]. Dieser mechanische Stress entsteht beispielsweise durch die Kombination einer, wie in fibrotischen Erkrankungen, starren extrazellulären Matrix mit der Kontraktion von Myofibroblasten [496]. Die Myofibroblastenkontraktion wird dabei über Integrine wie das  $\alpha\beta6$ -Integrin übertragen, die an LAP über dessen RGD-Sequenz binden [327].

In der vorliegenden Arbeit wurde die pulmonale Expression der  $\beta6$ -Untereinheit des  $\alpha\beta6$ -Integrins per WB aus Lungengewebe von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen untersucht. In beiden KO-Stämmen waren die Integrin- $\beta6$ -Level im Vergleich zum Wt erhöht, wobei dieser Unterschied nur in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen statistisch signifikant war. Interessanterweise lässt sich in gesundem humanen Lungengewebe per IHC kein  $\alpha\beta6$ -Integrin nachweisen, während IPF-Lungen eine ausgeprägte Integrin  $\alpha\beta6$ -Expression in an fibrotische Bereiche angrenzenden Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten aufweisen [196]. Die WB-Befunde aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass kurze Telomere ausreichend sind, um eine erhöhte Integrin  $\alpha\beta6$ -Proteinexpression zu verursachen. Dieser Mechanismus könnte auch in der IPF eine Rolle spielen.

Welche Folgen hat nun diese verstärkte Integrinexpression? Integrin  $\alpha\beta6$  ist für die epithelständige Aktivierung von TGF- $\beta$  essentiell. Dies zeigt sich daran, dass in mit inhalativem Bleomycin behandelten Mäusen die pulmonale Expression des Integrins stark ansteigt. Infolgedessen entwickeln die Mäuse eine Fibrose, die durch ein Knockout der  $\beta6$ -Untereinheit verhindert werden kann [328]. Die Inhibition des  $\alpha\beta6$ -Integrins ist damit ein interessanter neuer Therapieansatz für die IPF. Studien hierzu haben jedoch bisher ambivalente Ergebnisse geliefert. So mussten die Phase II-Studien des subkutan zu verabreichenden  $\alpha\beta6$ -Antikörpers BG00011 aufgrund in der Interventionsgruppe vermehrt auftretenden akuten Exazerbationen und im Vergleich zur Placebogruppe verstärkter Fibroseentwicklung sowie stärkerem FVC-Verlust abgebrochen werden [289]. Auch die Studien zum inhalativen  $\alpha\beta6$ -Inhibitor GSK3008348 und zum Pan- $\alpha$  Integrin Inhibitor IDL-2965 wurden nach Phase I abgebrochen [289, 478]. Im Gegensatz dazu lieferte die Phase-II-Studie von McIsaac et al. vielversprechende Ergebnisse: Hier konnte für den oral verfügbaren dualen  $\alpha\beta6/\alpha\beta1$ -Inhibitor über den 12-Wochenzeitraum der Studie nachgewiesen werden, dass sowohl der radiologische Progress der Lungenfibrose als auch der FVC-Verlust in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Placebogruppe verringert war [259]

Alternativ aktivierte M2-Makrophagen sind essentiell für die Reparatur von Epithelverletzungen. Sie sezernieren entzündungshemmende Zytokine wie IL-10, induzieren die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, regen die Kollagenproduktion an und räumen apoptotische Zellen ab [64, 199, 267]. Genau über diese eigentlich protektiven Mechanismen spielen M2-Makrophagen jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung fibrotischer Erkrankungen. Effektoren sind dabei die von M2-Makrophagen sezernierten Zytokine TGF- $\beta$ , PDGF, Insulin-like Growth Factor I und Galactin-3 [64]. Kokultur von M2-Makrophagen und murinen pulmonalen Stammzellen induziert die Differenzierung der Stammzellen zu Myofibroblasten [199]. Humane Trachealfibroblasten in einer *in vitro*-Kokultur mit M2-Makrophagen zeigen eine deutlich erhöhte Kollagensynthese [322]. Werden murine Alveolarepithelzellen gemeinsam mit M2-Makrophagen kultiviert, differenzieren sie sich zu Myofibroblasten. Diese EMT kann durch TGF- $\beta$ -Blockade verhindert werden [545]. Dementsprechend ist es wenig überraschend, dass in IPF-Lungen die Zahl der fibrosefördernden M2-Makrophagen die der proinflammatorischen M1-Makrophagen weit übersteigt [199]. Auch im Bleomycin-Mausmodell sind M2-Makrophagen dominierend. Wird die M2-Polarisation vor Bleomycin-Exposition *in vivo* gehemmt, so wird die durch Bleomycin induzierte Fibrose deutlich abgeschwächt [360].

Als Marker muriner M2-Makrophagen gilt das Enzym Arginase-1, das die Spaltung von Arginin in Ornithin und Harnstoff katalysiert [326]. Im Einklang mit der vermehrten M2-Infiltration bei fibrotischen Erkrankungen ist die Arginase-Expression im Bleomycin-Mausmodell sowohl auf der Gen- als auch auf der Proteinebene signifikant erhöht [240]. Arginase-1 ist in murinen Lungen jedoch nicht nur in M2-Makrophagen, sondern auch in interstitiellen Fibroblasten und im Bronchialepithel nachweisbar [240]. Insbesondere die Fibroblasten-Arginase stellt dabei auch unabhängig von der Makrophagenpolarisation einen profibrotischen Faktor dar, denn das durch Arginase-1 produzierte Ornithin ist ein wichtiger Ausgangsstoff für Prolin, den Hauptbestandteil von Kollagen. Eine Inhibition von Arginase-1 in pulmonalen Rattenfibroblasten bewirkt eine Senkung der Kollagensynthese um  $\frac{1}{3}$  [487]. Auch in humanen Lungen korreliert der Arginase-1-Gehalt mit der Fibroseentwicklung: Während sich in gesundem humanem Lungengewebe per Immunfluoreszenz nur geringe Mengen an Arginase-1 in der Umgebung der Blutgefäße nachweisen lässt, zeigen IPF-Lungen eine Anreicherung von Arginase-1 insbesondere in Fibroblasten [319].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Arginase-1-Expression in *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen per WB aus Lungengewebe untersucht. Im Vergleich zum Wt wurde in beiden KO-Linien ein höheres Arginase-1-Level nachgewiesen (Abb. 34). Dieser Unterschied erreichte nur in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen Signifikanz. Per IHC ließ sich nachweisen, dass Arginase-1 mit dem Makrophagenmarker F4/80 kolokalisierte, wobei die Zahl der doppelt positiven Zellen in den KO-Mäusen höher war als im Wt (Abb. 35). Die pulmonale Gesamtzahl der Makrophagen war in den KO-Mäusen etwas, aber nicht signifikant, niedriger als in den Wt-Mäusen (Abb. 31). Folglich war das erhöhte Arginase-1-Level in diesen Mäusen nicht durch die Zahl der Makrophagen bedingt. Dies spricht dafür, dass Telomerverkürzung in murinen Lungen eine M2-Polarisation der pulmonalen Makrophagen verursachen kann. Die erhöhte Zahl an M2-Makrophagen und die vermehrte Arginase-1-Expression gehen dabei mit der oben beschriebenen Fibrosetendenz einher, sind aber offensichtlich allein nicht ausreichend, um in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine pulmonale Fibrose auszulösen.

Interessanterweise wurde darüber hinaus in allen Stämmen in der pulmonalen IHC eine Kolokalisation von Ttf1 mit Arginase-1 beobachtet, wobei kein Unterschied zwischen den Wildtyp-Tieren und den KO-Mäusen erkennbar war (Abb. 35). Ttf-1 wird in zilienlosen Bronchialepithelzellen wie Club-Zellen und Typ-II-Pneumozyten exprimiert [204]. Man kann also davon ausgehen, dass auch murine AECII Arginase-1 exprimieren. Allerdings wird diese Expression wohl nicht durch die Telomerlänge beeinflusst, da sich die Zahl der Zellen mit Kolokalisation von Ttf1 und Arg1 zwischen Wt- und KO-Mäusen nicht unterschied (Abb. 35).

F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse besitzen kürzere Telomere als Wildtyp-Tiere desselben Stammes [266]. Zudem weisen sie in ihren Lungen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, erhöhte Level der Seneszenzmarker *Cip1/p21* und *Cdkn2a/p16* auf (Abb. 24-26). In gewissem Sinne stellen sie damit eine Art Alterssimulation dar, da die durchschnittliche Telomerlänge im Alter ebenfalls abnimmt, während die Zahl seneszenten Zellen ansteigt [75]. Interessanterweise wurde ein altersbedingter Anstieg des M2-Anteils an der gesamten Makrophagenzahl bereits für humane und murine Muskelbiopsien sowie für murine Ovarialzellen *in vivo* beschrieben [105, 485, 541]. Cui et al. untersuchten in den humanen Muskelbiopsien darüber hinaus die Expression von *CIP1* und *CDKN2A*, die mit zunehmendem Alter parallel zur steigenden M2-Makrophagenzahl anstieg [105].

Telomerverkürzung, egal ob durch Telomerase-KO oder durch biologische Alterungsprozesse verursacht, fördert folglich die Makrophagenpolarisation in Richtung

der fibrosefördernden M2-Makrophagen. Dies spricht dafür, dass die in IPF-Patienten beobachteten kurzen Telomere einen möglichen Einflussfaktor auf die hier ebenfalls beobachtete verstärkte pulmonale M2-Polarisation darstellen könnten [12, 199].

Es ist unklar, ob der im WB beobachtete erhöhte Arginase-1-Proteinspiegel in den KO-Mäusen noch auf weitere Zellen außer M2-Makrophagen und Typ-II-Zellen bzw. Club-Zellen zurückzuführen ist, da hierzu keine Untersuchungen gemacht wurden. Eine mit zunehmendem Alter (und damit kürzeren Telomeren) verstärkte Proteinexpression von Arginase-1 wurde jedoch bereits für unterschiedliche Gewebetypen beschrieben, unter anderem für humane Endothelzellen und für Myozyten aus Ratten [300, 320].

M2-Makrophagen synthetisieren diverse profibrotische Zytokine, beispielsweise CTGF [536]. Die *CTGF*-Transkription wird stromabwärts von TGF- $\beta$  über SMAD's induziert. Auf diesem Weg gilt CTGF als primärer Mediator der TGF- $\beta$ -induzierten Lungenfibrose [127]. Die CTGF-Synthese ist jedoch nicht auf M2-Makrophagen beschränkt: Im Lungengewebe von IPF-Patienten konnten Pan et al. per IHC nachweisen, dass auch hyperplastische Typ-II-Alveolarepithelzellen und aktivierte Myofibroblasten CTGF synthetisieren [359]. Auch in murinen Lungen steigt die *CTGF*-Expression nach Bleomycin-Exposition signifikant an [262]. Die Bedeutung der Transkriptionsinduktion von *CTGF* stromabwärts von TGF- $\beta$  wird deutlich, wenn man sich die Ergebnisse von *CTGF-Knockdown*- beziehungsweise *CTGF-KO*-Experimenten ansieht. Praktisch alle TGF- $\beta$ -vermittelten profibrotischen Effekte werden durch Inhibition von CTGF abgeschwächt oder sogar komplett aufgehoben: Humane und Rattenfibroblasten werden *in vitro* durch TGF- $\beta$ -Behandlung aktiviert und steigern die Kollagensynthese. Antikörper gegen CTGF blockieren diesen Anstieg [125]. In humanen Orbitalfibroblasten *in vitro* bewirkt ein *Knockdown* von *CTGF* eine deutliche Abschwächung der TGF- $\beta$ -induzierten Synthese von Fibronectin und dem Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA [461]. Auch die durch TGF- $\beta$ -Behandlung ausgelöste EMT in humanen Lungenepithelzellen lässt sich *in vitro* durch *CTGF*- Small Interfering RNA (siRNA) stark reduzieren [435]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *CTGF* in A549-Zellen mit inhibierter Telomerase per RT-PCR untersucht. Während in den unbehandelten Kontrollzellen zu keinem Zeitpunkt *CTGF*-mRNA nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in telomeraseinhibierten A549-Zellen (T<sup>-</sup>) in Passage 11 und 46 eine moderate *CTGF*-Expression. Zwischenzeitlich, in Passage 19, stieg die *CTGF*-Expression signifikant an, um dann in Passage 46 wieder auf das Ausgangsniveau zu sinken (Abb. 42). Die in T<sup>+</sup> fehlende *CTGF*-Expression stimmt mit den Ergebnissen von Pan et al.

überein, die in Typ-II-Zellen gesunder Lungen per IHC nur eine sehr schwache Expression von CTGF nachweisen konnten [359]. Die in T<sup>-</sup> erhöhte *CTGF*-Expression ist ebenfalls wenig verwunderlich, da in T<sup>-</sup> auch die Expression von *TGFBI* deutlich erhöht war (Abb. 42). Wie bereits ausgeführt, ist *CTGF* ein Zielgen der SMAD-Transkriptionsfaktoren, die stromabwärts von TGF- $\beta$  aktiviert werden [127]. Warum das *CTGF*-Level in T<sup>-</sup> jedoch nach dem Anstieg in Passage 19 wieder stark abfiel, bleibt unklar. Auffällig ist, dass exakt der gleiche Expressionsverlauf in T<sup>-</sup> auch für *IL6* beobachtet wurde (Abb. 42). Sowohl IL-6 als auch CTGF sind SASP-Bestandteile [98, 233]. Dies erklärt den Expressionsverlauf jedoch nicht, da die anderen in T<sup>-</sup> untersuchten SASP-Marker *PAIL*, *TGFBI*, *VEGFA* und *EDNI* eine mit höherer Passagenzahl ansteigende oder zumindest stabil hohe Expression aufwiesen (Abb. 42). Ein positiver Zusammenhang zwischen IL-6 und CTGF wurde bisher nur für humane Synovialfibroblasten nachgewiesen. Hier induziert CTGF über Bindung an Integrin  $\alpha\beta6$  und die Aktivierung von ASK1 die Transkription von *IL6* [283]. Es ist jedoch fraglich, inwieweit diese Beobachtung auf A549-Zellen übertragbar ist. Zu beachten ist hier insbesondere, dass in humanen und Rattenhepatozyten *in vitro* genau das Gegenteil nachgewiesen wurde: Hier senkt eine Behandlung mit IL-6 die Proteinexpression von CTGF massiv [161]. Insgesamt scheint der Zusammenhang zwischen IL-6 und CTGF also gewebspezifisch unterschiedlich zu sein.

Die Erhöhung der CTGF-Expression durch kurze Telomere wurde bereits von Westhoff et al. beschrieben, die *in vivo* in den Nieren von G4 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen in Reaktion auf einen Reperfusionsschaden im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöhte CTGF-Proteinlevel nachweisen konnten. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant [493]. Möglicherweise ist die Ursache der auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten erhöhten *CTGF*-Expression in T<sup>-</sup> in der durch die kurzen Telomere verursachten Seneszenz zu suchen. CTGF wurde in humanen Fibroblasten als Bestandteil des SASP beschrieben und ist *in vitro* auch in der Lage, diese seneszent werden zu lassen [216, 233]. Auch der in den A549-Zellen beobachtete ER-Stress (Abb. 38) könnte einen Einflussfaktor auf die *CTGF*-Expression darstellen. Takahashi et al. konnten zeigen, dass ER-Stress, vermittelt über den IRE1-Arm der UPR, in humanen Granulosazellen *in vitro* mit einer erhöhten *CTGF*-Expression einhergeht [444].

Auch hier muss bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wieder bedacht werden, dass die *CTGF*-Expression nur per RT-PCR, d.h. auf der Genexpressionsebene, untersucht wurde. *CTGF* wird extensiv posttranskriptionell

reguliert, beispielsweise inhibiert die Bindung der micro-RNA 26a an *CTGF* dessen Translation [253, 277]. Folglich kann aus der Erhöhung der *CTGF*-Transkription in T<sup>-</sup> nur bedingt auf eine Erhöhung des CTGF-Proteinlevels geschlossen werden.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *EDN1* in T<sup>-</sup> per RT-PCR untersucht. Die *EDN1*-Expression war zu jedem untersuchten Zeitpunkt in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup> und stieg zudem über den Beobachtungszeitraum weiter an (Abb. 42).

Ein Zusammenhang zwischen kurzen Telomeren und einer verstärkten *EDN1*-Expression wurde bereits von Pérez-Rivero et al. beschrieben, die in F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöhte *EDN1*-Serumlevel nachweisen konnten [364]. Im Gegensatz hierzu fanden Cheng et al. in humanen Probanden keinen Zusammenhang zwischen dem *EDN1*-Serumlevel und der Leukozyten-Telomerlänge [85]. Es ist dennoch gut vorstellbar, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete erhöhte *EDN1*-Expression auf die Telomerverkürzung zurückzuführen ist. Hierfür spricht auch der zunehmende Anstieg in T<sup>-</sup> über die Zeit, da sich die Telomere der A549-Zellen mit jeder Teilung weiter verkürzten. Einen weiteren Einflussfaktor könnte die in T<sup>-</sup> ebenfalls beobachtete erhöhte *TGFBI*-Expression darstellen (Abb. 42), da die *EDN1*-Transkription stromabwärts von TGF-β induziert wird [391].

Die Erhöhung des *EDN1*-Levels in T<sup>-</sup> passt zu dem hier allgemein beobachteten Trend zur Ausschüttung profibrotischer Mediatoren, der im Verlauf dieses Kapitels bereits beschrieben wurde. *EDN1* wurde zwar primär als Vermittler der Broncho- und Vasokonstriktion entdeckt, ist jedoch auch für die physiologische Wundheilung unverzichtbar [442]. Fibrose ist nichts anderes als eine überschießende Wundheilungsreaktion. Folglich verwundert es nicht, dass sich in IPF-Lungen deutlich mehr *EDN1*-Protein nachweisen lässt als in Lungen gesunder Probanden [403]. Das Alveolarepithel sowie Alveolarmakrophagen aus IPF-Lungen sezernieren signifikant höhere Mengen an *EDN1* als Epithel und Makrophagen gesunder Lungen [403, 418]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten A549-Zellen als Typ-II-Zellmodell spiegeln durch ihre verkürzten Telomere also die vermehrte *EDN1*-Produktion des Alveolarepithels in der IPF wider.

Zur Fibroseentstehung trägt *EDN1* auf vielfältige Weise bei: In humanen Fibroblasten *in vitro* verstärkt eine Behandlung mit *EDN1* die Kollagensynthese und regt Proliferation sowie Myofibroblastendifferenzierung an [218, 418]. Weiterhin wirkt *Edn1* *in vitro* chemotaktisch auf Rattenfibroblasten und induziert in aus Ratten isolierten AECII die

EMT [211, 362]. Passend hierzu entwickeln Mäuse, die das humane *EDN1*-Gen pulmonal überexprimieren, im Alter eine Lungenfibrose [190].

EDN1 wirkt nicht nur fibrosefördernd. Eventuell könnte die in T<sup>-</sup> beobachtete erhöhte *EDN1*-Expression darüber hinaus einen Beitrag zur Entstehung des hier beobachteten ER-Stresses (Abb. 38) geleistet haben. Damit könnte EDN1 eine Verbindung zwischen kurzen Telomeren und ER-Stress darstellen: EDN1 wirkt über die Endothelinrezeptoren A und B (ET-A, ET-B) [22, 402]. Die für die beiden Rezeptoren kodierenden mRNA's wurden unter anderem in A549-Zellen nachgewiesen [112]. ET-A und ET-B sind G-proteingekoppelt, ihre Aktivierung bewirkt über mehrere Zwischenschritte die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP3). Dieses kann an IP3-Rezeptoren im ER binden, wodurch der Ausstrom von Calcium aus dem ER ausgelöst wird [197]. Dies kann zur Calciumdepletion im ER führen, was wiederum ER-Stress nach sich zieht [15]. ER-Stressauslösung und Aktivierung der UPR durch EDN-1-Einwirkung wurden in unterschiedlichen Zellen nachgewiesen, beispielsweise *in vitro* in humanen Trophoblastenzellen und humanen glatten Muskelzellen [210, 520]. Es ist denkbar, dass dieser Mechanismus auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen zum Tragen kam.

Die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit in T<sup>-</sup> beobachtete erhöhte *EDN1*-Expression auch eine Erhöhung der biologisch aktiven maturen EDN1-Form nach sich zieht, kann nicht sicher beantwortet werden. Nach der Translation wird das Präpro-Endothelin zu Proendothelin gespalten und muss anschließend noch vom membranständigen Endothelin-Converting Enzyme aktiviert werden. Da die Regulation von EDN1 jedoch primär auf der Transkriptionsebene erfolgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass mehr *EDN1*-mRNA auch zu mehr EDN1-Protein führt [442, 515].

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *VEGFA* in T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> per RT-PCR untersucht. VEGF-A ist ein Zytokin, das klassischerweise für seine die Angiogenese und Vaskulogenese fördernde sowie die vaskuläre Permeabilität erhöhende Wirkung bekannt ist [8, 40, 414]. Pulmonal wird VEGF-A im Alveolarepithel ausgeprägt, in geringerem Umfang auch in Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten exprimiert [40]. Zum Einfluss von VEGF-A auf die Fibroseentwicklung in der Lunge liegen widersprüchliche Daten vor: So konnten beispielsweise Murray et al. in Lungen von IPF-Patienten eine signifikant verringerte Expression von *VEGFA* und erniedrigte VEGF-A-Proteinlevel zeigen, während Barrat et al. per ELISA ein unverändertes VEGF-A-Niveau nachwiesen [40, 329]. Für das Bleomycin-Mausmodell liegen sowohl Daten über die

antifibrotische Wirkung von VEGF-A als auch Daten, die auf eine profibrotische Wirkung hindeuten, vor [168, 329]. Dieser scheinbare Widerspruch kann dadurch erklärt werden, dass die häufigste VEGF-A-Isoform VEGF-A<sub>165</sub> alternativ gespleißt wird. *In vitro* wirkt VEGF-A<sub>165a</sub> migrations- und proliferationsfördernd auf humane pulmonale Fibroblasten, außerdem erhöht es die EZM-Produktion. Diese Effekte werden durch hinzugegebenes VEGF-A<sub>165b</sub> inhibiert. Weiterhin schützt VEGF<sub>165b</sub>-Überexpression transgene Mäuse vor bleomycininduzierter Fibrose [40]. Es ist also möglich, dass VEGF-A<sub>165a</sub> fibrosefördernd ist, während VEGF-A<sub>165b</sub> eine antifibrotische Wirkung zeigt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich sowohl in T<sup>-</sup> als auch in T<sup>+</sup> mit zunehmender Passagenzahl eine verstärkte *VEGFA*-Expression (Abb. 42). Dabei war das *VEGFA*-Level in T<sup>+</sup> in Passage 11 und 19 signifikant höher als in T<sup>-</sup>, in Passage 46 war dieser Unterschied aufgrund der starken Expressionszunahme in T<sup>+</sup> aufgehoben. Ob die in T<sup>-</sup> höhere *VEGF*-Expression eine profibrotische Wirkung ausübt, kann nicht sicher gesagt werden. Einerseits ist nur die Transkriptionsebene und nicht das Proteinlevel untersucht worden. Hinzu kommt, dass der benutzte Primer die unterschiedlichen Spleißformen von VEGF-A nicht unterscheiden kann. Es ist also nicht klar, ob die erhöhte Expression auf das profibrotische VEGF-A<sub>165a</sub> oder das antifibrotische VEGF-A<sub>165b</sub> zurückzuführen ist. Welche Faktoren könnten zur vermehrten *VEGFA*-Expression in T<sup>-</sup> beitragen? Die durch die in T<sup>-</sup> erhöhte *CDKN1A*- sowie *PAII*-Expression nachgewiesene Seneszenz der telomeraseinhibierten A549-Zellen könnte hierbei eine Rolle gespielt haben (Abb. 38, Abb. 42). Coppé et al. konnten in seneszenten humanen Lungenfibroblasten eine Erhöhung der VEGF-A-Level sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene nachweisen [99]. Allerdings ist nicht sicher, ob sich diese Befunde auf Epithelzellen übertragen lassen, da die VEGF-A-Wirkung zellspezifisch unterschiedlich ist. Beispielsweise hat VEGF-A in humanen Endothelzellen die umgekehrte Wirkung: Hier kann es die Seneszenzentwicklung verzögern und sogar bereits seneszente Zellen wieder aktivieren [489]. Einen weiteren Einflussfaktor könnte der in T<sup>-</sup> beobachtete ER-Stress darstellen (Abb. 38). Ghosh et al. konnten nachweisen, dass eine ER-Stressauslösung *in vitro* in unterschiedlichen humanen und murinen Zelllinien die *VEGF*-Transkription induzieren kann. Erreicht wird dies durch Bindung von ATF4, ATF6 und/ oder gespleißtem XBP-1 an den *VEGFA*-Promotor [153].

Da die Expression von *VEGFA* sowohl in T<sup>+</sup> als auch in T<sup>-</sup> im Verlauf der Kultivierung anstieg, ist jedoch davon auszugehen, dass außer Telomerverkürzung und ER-Stress noch andere Faktoren einen Einfluss auf die *VEGFA*-Expression hatten. Ein möglicher

Einflussfaktor könnte hierbei die Dauer der Kultivierung sein. Es ist bekannt, dass über längere Zeit kultivierte Zellen ihr Genexpressionsmuster verändern und es ist gut vorstellbar, dass *VEGFA* zu diesen durch das "In-vitro-Altern" differenziell regulierten Genen gehört [97, 481].

Zusammenfassend gesagt wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Expression profibrotischer Marker sowohl im *in vivo*- als auch im *in vitro*-Modell der Telomerverkürzung zunimmt. Es ist gut vorstellbar, dass ein – wie auch immer gearteter – „Second Hit“ auf Basis dieser Fibroseneigung zu einer ausgeprägten Fibroseentwicklung führt.

## 5.6 Erhöhte Sirtuinexpression durch Telomerverkürzung

SIRT1 ist eine NADH-abhängige Deacetylase, die auf der Proteinebene in humanen und murinen Lungen in Bronchial- und Alveolarepithel, Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten nachgewiesen wurde [73, 378, 539]. Sowohl in IPF-Lungen als auch in den fibrotischen Lungen von mit inhalativem Bleomycin behandelten Mäusen lassen sich per Immunfluoreszenz (IF) erhöhte SIRT1-Level nachweisen [534]. SIRT1 gilt in diesem Kontext als endogenes antifibrotisches Enzym. *In vitro* in humanen embryonalen Fibroblasten kann eine Behandlung mit dem SIRT1-Aktivator Resveratrol den TGF- $\beta$ -vermittelten Anstieg der Kollagensynthese verhindern [91]. Auch die Myofibroblastendifferenzierung, die Produktion weiterer EZM-Bestandteile und die Fibroblastenmigration werden durch Resveratrol abgeschwächt [534]. Im Bleomycin-Mausmodell der pulmonalen Fibrose mildert eine Resveratrol-Behandlung die Fibroseentwicklung sowie die Synthese von Kollagen und Fibronectin ab [91, 534].

In der vorliegenden Arbeit war die per RT-PCR bestimmte pulmonale *Sirt1*-Expression in den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen signifikant höher als in den Wt-Tieren (Abb. 26). Dies bestätigte sich im pulmonalen WB der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse (Abb. 32). In der IHC ließen sich in den KO-Mäusen mehr Sirt1-positive Zellen nachweisen als in den Wt-Mäusen. Die Sirt1-positiven Zellen waren großteils Typ-II-Zellen (Abb. 32). Auch in den untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild: Hier war die per RT-PCR bestimmte *SIRT1*-Expression in jeder der drei untersuchten Passagen in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup>. Zudem zeigte sich in T<sup>-</sup> eine Zunahme der *SIRT1*-Expression über die Zeit (Abb. 41). Insbesondere das erhöhte Sirt1-Level in den KO-Mäusen ist hier interessant, da es eine mögliche Erklärung liefert, warum die KO-Mäuse

trotz Aktivierung von profibrotischen Signalwegen keine pulmonale Fibrose entwickelten.

In den per IHC untersuchten murinen Lungenschnitten in der vorliegenden Arbeit ließ sich Sirt1 in Typ-II-Zellen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch anfärben (Abb. 32). Dies stimmt mit der hierzu vorliegenden Literatur überein. So gilt Sirt1 als primär nukleäres Protein, das jedoch teilweise auch zytoplasmatisch nachweisbar ist [516].

Es ist gut vorstellbar, dass SIRT1 in den beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellen aufgrund der kurzen Telomere kompensatorisch erhöht war, da SIRT1 an der Telomermaintenance beteiligt ist: Palacios et al. konnten nachweisen, dass *Sirt*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse deutlich verkürzte, *Sirt1*-überexprimierende Mäuse dagegen verlängerte Telomere aufweisen [358]. Die sirtuinvermittelte Telomerverlängerung läuft *in vitro* in murinen induzierten pluripotenten Stammzellen über die Hemmung der Cellular Myelocytomatosis Oncogene (c-Myc)- Degradation durch Sirt1 ab [63]. C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor für *TERT* und die *TERT* Expression war in der vorliegenden Arbeit in den telomeraseinhibitierten A549-Zellen ebenfalls erhöht (Abb. 40) [140]. Es ist also möglich, dass Telomerverkürzung eine verstärkte Expression von SIRT1 induziert, um die Telomeraseaktivität kompensatorisch zu erhöhen.

Darüber hinaus ist SIRT1 über mehrere Mechanismen an der DDR beteiligt. Oberdoerffer et al. konnten zeigen, dass Sirt1 in murinen embryonalen Stammzellen an DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) rekrutiert wird [344]. Hier kann SIRT1 sowohl das an der nichthomologen Endverknüpfung beteiligte Ku70 als auch die regulatorische Untereinheit des für die homologe Rekombination benötigten MRN-Komplexes deacetylieren und somit deren jeweilige Aktivitäten erhöhen [212, 532]. Kritisch kurze Telomere werden ebenfalls als DSB erkannt [114, 221]. Folglich ist es auch denkbar, dass sehr kurze Telomere die SIRT1-Synthese induzieren, da dieses für die DDR benötigt wird.

Die erhöhte *SIRT1*-Expression in T<sup>+</sup> könnte auch einen Kompensationsversuch für den beobachteten ER-Stress darstellen: Ein hemmender Einfluss von SIRT1 auf die ER-stressvermittelte Apoptose wurde bereits in Lunge, Herz, Nieren, Leber, Kolon und Nervensystem nachgewiesen [477]. Beispielsweise konnten Prola et al. zeigen, dass ein *Sirt1*-KO *in vitro* in Rattenkardiomyozyten und *in vivo* in Mausherzen unter ER-Stress das Proteinlevel unterschiedlicher UPR-Marker aller drei Arme und infolgedessen die Apoptoserate erhöht. Der Sirt1-Induktor STAC3 schützte dagegen über eIF2 $\alpha$  - Deacetylierung *in vitro* Rattenkardiomyozyten vor ER-stressinduzierter Apoptose [368].

He et al. beschrieben in Lungen von Zigarettenrauch ausgesetzten Ratten ebenfalls eine vermehrte ER-Stressantwort und infolgedessen Apoptose. SIRT1-Aktivierung durch Melatonin schwächte dies stark ab [180].

Oxidativer Stress wurde in der vorliegenden Arbeit in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen beobachtet (Abb. 36). Eine Erhöhung der *Sirt1*-Expression und des Sirt1-Proteinlevels als Abwehrmechanismus gegen die vermehrte ROS-Belastung ist aufgrund der hierzu vorliegenden Literatur gut vorstellbar. Eine protektive Funktion von SIRT1 gegenüber oxidativem Stress und durch oxidativen Stress vermittelte Apoptose wurde bereits für humane Fibroblasten *in vitro* und im Mausmodell mit kardialer *Sirt1*-Überexpression *in vivo* nachgewiesen [10, 286].

Zusammenfassend gesagt war die SIRT1-Expression in beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellen signifikant erhöht. Mögliche Ursachen hierfür könnten Telomerverkürzung, DNA-Damage-Signalling an den kurzen Telomeren oder durch die Telomerverkürzung verursachter ER- bzw. oxidativer Stress sein.

Zusätzlich zu *SIRT1* wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *SIRT2* per RT-PCR in den telomeraseinhibierten A549-Zellen untersucht. Hierbei war die *SIRT2*-Expression ab Passage 19 in T<sup>-</sup> signifikant höher als in T<sup>+</sup> (Abb. 41). Dies steht im Gegensatz zu den von Amano et al. publizierten Ergebnissen, die im Lebergewebe von F4 *Tert*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine erniedrigte Proteinexpression aller sieben Sirtuine beschrieben [17]. Diese gegensätzlichen Befunde machen es wahrscheinlich, dass die Regulation der Sirtuine durch die Telomerlänge gewebsspezifisch unterschiedlich ist.

Eine mögliche Ursache für die in den telomeraseinhibierten A549-Zellen beobachtete erhöhte *SIRT2*-Expression ist die bereits mehrfach angesprochene replikative Seneszenz dieser Zellen. Erhöhte SIRT2-Proteinspiegel in seneszenten Zellen wiesen Anwar et al. 2016 für humane Osteosarkomzellen nach. Es ist gut möglich, dass auch andere Zelltypen in der Seneszenz vermehrt SIRT2 synthetisieren [21].

Die Konsequenz der erhöhten *SIRT2*-Expression in Bezug auf die fibrotische Wirkung ist nicht so eindeutig zu bewerten wie bei *SIRT1*. Auf der einen Seite wurde in der vorliegenden Arbeit nur die Genexpression von *SIRT2* untersucht, es liegen keine Daten zur Proteinebene vor. Da *SIRT2* extensiv posttranskriptionell und posttranslatorisch reguliert wird, geht dies mit einer eingeschränkten Aussagekraft der Ergebnisse einher [486]. Hinzu kommt, dass die Rolle von SIRT2 in Bezug auf die Fibroseentwicklung nicht eindeutig ist. Einerseits schützt eine kardiale *Sirt2*-Überexpression Mäuse vor kardialer Hypertrophie und Fibrose durch Angiotensin II, andererseits reagieren *Sirt2*<sup>(-/-)</sup>-

Mäuse auf Tetrachlormethanbehandlung mit einer geringeren hepatischen Fibrose als Mäuse des Wildtyps [27, 449]. Generell ist hinsichtlich der pulmonalen Fibrose jedoch eher von einer profibrotischen Wirkung von SIRT2 auszugehen: In humanen embryonalen Fibroblasten werden *in vitro* die TGF- $\beta$ -vermittelte Myofibroblastendifferenzierung und Fibronektinproduktion durch SIRT2-Inhibition blockiert. Auch *in vivo* im Bleomycin-Mausmodell sind eine Abschwächung der pulmonalen Fibrose sowie eine Verringerung des  $\alpha$ -SMA- und Fibronektin-Proteinlevels durch *Sirt2*-KO zu beobachten [158]. Die in T<sup>-</sup> beobachtete erhöhte *SIRT2*-Expression ist also vermutlich ein weiterer durch die Telomerverkürzung verursachter profibrotischer Faktor.

### 5.7 Vermehrte Proteinoxidation durch Telomerverkürzung

Unter oxidativem Stress versteht man eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts zugunsten oxidativer Prozesse. Dies kann einerseits durch vermehrte Produktion von ROS, die beispielsweise als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung oder im Rahmen der Pathogenabwehr in Leukozyten entstehen, verursacht werden. Andererseits kann oxidativer Stress auch durch eine verminderte Produktion antioxidativer Proteine entstehen [87]. Erhöhte Marker oxidativen Stresses lassen sich sowohl in der Ausatemluft als auch in der BAL von IPF-Patienten nachweisen [269, 370]. ROS können *in vitro* die *TGFBI*-Transkription induzieren und die Freisetzung von TGF- $\beta$  aus dem Komplex mit LAP bewirken [46]. Über diesen Mechanismus gelten ROS als wichtige Faktoren der IPF-Pathogenese [87]. Darüber hinaus können ROS sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg auslösen und somit zum IPF-typischen Verlust an Typ-II-Pneumozyten beitragen [384, 479]. Ein weiterer in der Pathogenese der IPF bedeutsamer Faktor ist die Seneszenz, insbesondere die Seneszenz der Fibroblasten und Typ-II-Pneumozyten [16, 518]. Auch hieran sind ROS beteiligt: Oxidativer Stress kann direkt die stressinduzierte prämaturne Seneszenz verursachen, aber auch über Beschleunigung der Telomerverkürzung die replikative Seneszenz vorantreiben [124, 535]. Zu guter Letzt stören erhöhte ROS-Level im ER den Faltungsprozess der hier synthetisierten Proteine und können auf diese Weise ER-Stress induzieren sowie die UPR aktivieren [293]. Die erhöhten ER-Stressmarker, die in IPF-Lungen beobachtet werden, könnten also auch auf vermehrte oxidative Belastung zurückzuführen sein [246].

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine vermehrte oxidative Proteincarbonylierung nachgewiesen (Abb. 36). Wie bereits erwähnt, kann

oxidativer Stress zu ER-Stress führen. Allerdings erhöht die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER auch die ROS-Produktion [293]. Folglich ist es auch denkbar, dass die vermehrte oxidative Belastung die Folge und nicht die Ursache des in den KO-Mäusen beobachteten ER-Stresses ist (Abb. 24-26).

Andererseits kommt auch eine verminderte Produktion antioxidativer Proteine als Ursache in Frage, weswegen die Expression von Peroxiredoxinen und NADPH-Oxidasen in den KO-Mäusen und telomeraseinhibierten A549-Zellen genauer untersucht wurde.

PRDX1 und PRDX6 sind Enzyme, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und organische Peroxide reduzieren und somit dem Schutz vor oxidativem Stress dienen, während sie selbst oxidiert werden [500]. PRDX1-PRDX5 besitzen jeweils zwei Cysteinreste und nutzen Thioredoxin als Elektronendonator, PRDX6 hat nur einen Cysteinrest und nutzt Glutathion [375]. PRDX6 nimmt dabei eine besondere Stellung ein, da es als einziges Peroxiredoxin in der Lage ist, auch Phospholipid-Hydroperoxide zu reduzieren [139]. Darüber hinaus besitzt PRDX6 eine zweite Funktion als Phospholipase A2 [79].

In der vorliegenden Arbeit war die per RT-PCR untersuchte Expression von *Prdx1* und *Prdx6* in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse signifikant niedriger als in den Wt-Tieren (Abb. 26). Dies ist eine plausible Erklärung für die in den KO-Mäusen beobachtete vermehrte Proteinoxidation (Abb. 36), insbesondere, da *Prdx6* das pulmonal am stärksten exprimierte Peroxiredoxin darstellt [407]. PRDX6 ist somit für die Abwehr pulmonalen oxidativen Stresses essentiell.

Dies zeigt sich auch daran, dass *Prdx6*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse auf Behandlung mit Paraquat, einem potenten Induktor oxidativen Stresses, mit signifikant stärkerer pulmonaler Inflammation reagieren und zudem an wesentlich geringeren Paraquat-Dosen versterben als Wt-Tiere [483]. *Prdx1*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse zeigen ebenfalls eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress. So ist der pulmonale Gehalt an 8-Isoprostan in *Prdx1*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen nach Behandlung mit Bleomycin im Vergleich zum Wt signifikant erhöht [230].

*Terc*-KO führt zu verkürzten Telomeren, doch auch der natürliche Alterungsprozess geht mit Telomerverkürzung einher [75, 266]. Passend zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme der PRDX6-Expression und eine damit einhergehende Zunahme des oxidativen Stresses mit zunehmendem Alter bereits von Chhunchha et al. in humanen okulären Trabekelzellen nachgewiesen [88]. Es ist also wahrscheinlich, dass die in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen in der vorliegenden Arbeit beobachtete verringerte pulmonale *Prdx6*-Expression direkt auf die Telomerverkürzung zurückzuführen ist.

Die verringerte pulmonale *Prdx6*-Expression in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten KO-Mäusen spiegelt die Befunde aus IPF-Lungen wider: Hier beschrieben Korfei et al. im Vergleich zu Lungen gesunder Donoren signifikant niedrigere PRDX6-Level in der BAL [244]. Es ist also gut möglich, dass dieses verringerte Level an Antioxidantien in IPF-Lungen auf verkürzte Telomere zurückzuführen ist und einen Beitrag zur hier beobachteten vermehrten Proteinoxidation leistet [393]. Im Gegensatz hierzu passt die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verringerte Expression von *Prdx1* in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse nicht zu dem Bild, dass sich in den Lungen humaner IPF-Patienten bietet: Hier ist das PRDX1-Proteinlevel im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant, in der BAL nichtsignifikant erhöht [244]. Dies lässt darauf schließen, dass die Erhöhung des PRDX1-Proteinlevels in IPF-Lungen nicht durch Telomerverkürzung bedingt ist. Während die verringerte *Prdx1*-Expression in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten KO-Mäusen vermutlich eine Teilursache der hier beobachteten vermehrten Proteinoxidation darstellt, ist das erhöhte PRDX1-Level in IPF-Lungen am ehesten als Versuch zu werten, einer für IPF-Lungen typischen vermehrten oxidativen Belastung entgegenzuwirken [393].

In den in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten A549-Zellen zeigten sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt Unterschiede in der Expression von *PRDX1* und *PRDX6* zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> (Abb. 39). Da A549-Zellen als Typ-II-Zellmodell gelten, könnte man dies so deuten, dass die in den KO-Mäusen beobachtete verringerte Expression von *Prdx1* und *Prdx6* nicht auf Veränderungen der Genexpression in Typ-II-Zellen zurückzuführen ist. In humanen Lungen findet sich PRDX1 primär in zilierten Bronchialepithelzellen und, insbesondere in IPF-Lungen, in Alveolarmakrophagen. PRDX6 ist dagegen vor allem in Typ-II-Zellen, aber auch in inflammatorischen Zellen und zilierten Bronchialepithelzellen nachweisbar [244]. Unter der Annahme, dass diese Ergebnisse auf Mäuse übertragbar sind, kommen also inflammatorische Zellen, insbesondere Makrophagen, sowie zilierte Bronchialepithelzellen als Ursache der durch verkürzte Telomere verringerten *Prdx1*- und *Prdx6*-Expression in Frage.

Einschränkend muss an dieser Stelle jedoch erwähnt werden, dass es Hinweise darauf gibt, dass sich die pulmonale PRDX1-Expression zwischen Menschen und Mäusen unterscheidet: Gharib et al. konnten zeigen, dass das *Prdx1*-Level in murinen BAL-Proben grundsätzlich höher ist als in humanen Proben. Während einer akuten Lungenschädigung steigt das PRDX1-Level in humanen BAL-Proben signifikant an, während es in murinen Proben rapide sinkt [149]. Zudem handelt es sich bei A549-Zellen

um eine Krebszelllinie, deren Genexpressionsmuster sich zwangsläufig von dem reiner Typ-II-Zellen unterscheidet. Die vorliegenden Ergebnisse sind folglich mit Vorsicht zu interpretieren.

Prdx1 ist nicht nur ein antioxidatives Enzym, sondern schützt auch vor Fibroseentstehung: Kikuchi et al. konnten zeigen, dass *Prdx1*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse auf Bleomycin-Gabe mit stärkerer pulmonaler Inflammation und Fibrose reagieren als Tiere des Wildtyps [230]. Gleiches gilt für PRDX6, dessen *Knockdown* in humanen okulären Trabekelzellen hier zu verstärkter TGF- $\beta$ -Aktivierung, vermehrter EZM-Produktion sowie einem Anstieg des  $\alpha$ -SMA-Levels führt [88]. Die verringerte *Prdx1*- und *Prdx6*-Expression in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen trägt folglich vermutlich zum in diesen Mäusen beobachteten profibrotischen Milieu bei.

Darüber hinaus ist oxidativer Stress ein etablierter Induktor der prämaternen Seneszenz [460]. Es ist also gut möglich, dass die verringerte Expression der beiden Peroxiredoxine an der Auslösung der in den Mauslungen beobachteten Seneszenz beteiligt war (Abb. 24-26). Auch die beobachtete Erhöhung der ER-Stressmarkern *Atf6* und *Grp78* in den Lungen der KO-Mäuse könnte durch die verringerte *Prdx6*-Expression beeinflusst worden sein: Wie bereits erwähnt, stören erhöhte ROS-Level im ER den Proteinfaltungsprozess und können auf diese Weise ER-Stress verursachen [293]. Passend hierzu konnten Fatma et al. in Linsenepithelzellen aus *Prdx6*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine verstärkte UPR nachweisen [136].

PRDX2 ist ein zytosolisches Peroxiredoxin, das in humanen Lungen in geringerem Umfang als PRDX1 oder PRDX6 exprimiert wird. Es findet sich in Bronchial- und Alveolarepithel sowie in Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen [239]. In IPF-Lungen ist das PRDX2-Level niedriger als in gesunden Lungen. Dabei ist die PRDX2-Expression insbesondere in fibrotischen Bereichen sehr niedrig, während hyperplastische AECII sogar eine verstärkte PRDX2-Expression aufweisen [472]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die per RT-PCR untersuchte *PRDX2*-Expression in T<sup>-</sup> konstant hoch, während sie in T<sup>+</sup> über den Beobachtungszeitraum abnahm. Dadurch ergab sich in Passage 46 eine in T<sup>-</sup> signifikant höhere Expression als in T<sup>+</sup> (Abb. 39). Während der Grund für die Abnahme der *PRDX2*-Expression in T<sup>+</sup> nicht klar ist, könnte die in T<sup>-</sup> beobachtete replikative Seneszenz (Abb. 38: erhöhte *CDKN1A*-Expression, Abb. 42: erhöhte *PAIL*-Expression) erklären, warum die *PRDX2*-Expression hier hoch blieb: Seneszenten Zellen produzieren vermehrt ROS, es ist also vorstellbar, dass die kontinuierlich hohe *PRDX2*-Expression in T<sup>-</sup> einen Kompensationsmechanismus zum

Abbau von  $H_2O_2$  darstellte [361]. Auch die in  $T^+$  beobachtete vermehrte *NOXO1*-Expression (Abb. 39) könnte zu einer vermehrten oxidativen Belastung und kompensatorischen *PRDX2*-Expressionserhöhung beigetragen haben.

*NOX2* ist die katalytische Untereinheit des membrangebundenen Cytochroms  $B_{558}$ , das primär in den Phagosomen Neutrophiler und Makrophagen zu finden ist und im Alveolarepithel nur in geringem Umfang exprimiert wird [70, 175, 529]. Cytochrom  $B_{558}$  produziert als Bestandteil der phagozytischen NADPH-Oxidase Superoxid-Anionen, die im Rahmen des oxidativen Bursts der Pathogenabwehr dienen [529]. Darüber hinaus sind die durch *NOX2* produzierten ROS an Signalwegen wie Apoptose und Inflammation beteiligt [276, 342]. In der vorliegenden Arbeit war die *Nox2*-Expression im Vergleich zum Wildtyp weder in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen noch in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse differentiell reguliert (Abb. 25 & 26). Auch in den A549-Zellen zeigte sich kein Expressionsunterschied zwischen  $T^+$  und  $T^-$  (Abb. 39). Man kann also davon ausgehen, dass Telomerverkürzung keinen Einfluss auf die *Nox2*-Expression hat.

*NOX4* ist die katalytische Untereinheit einer NADPH-Oxidase, die in der humanen Lunge ubiquitär nachweisbar ist, unter anderem im Bronchial- und Alveolarepithel, in Mesenchymzellen sowie in inflammatorischen Zellen [175]. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der *NOX*-Familie ist *NOX4* konstitutiv aktiv und produziert anstelle von Superoxid primär  $H_2O_2$  [338]. In IPF-Lungen lässt sich *NOX4* per IHC verstärkt in Fibroblasten der Fibroblasten-Foci sowie im Alveolarepithel nachweisen [77, 183]. *NOX4* gilt als wichtiger pathogenetischer Faktor in der IPF-Entwicklung: Die TGF- $\beta$ -induzierte Myofibroblastendifferenzierung und Fibronectinproduktion in IPF-Fibroblasten wird über  $H_2O_2$  vermittelt, welches wiederum durch *NOX4* produziert wird [183]. Passend hierzu sind *Nox4*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse beinahe vollständig vor bleomycininduzierter Fibrose und interessanterweise auch vor Apoptose der Alveolarepithelzellen geschützt [77]. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Nox4*-Expression per RT-PCR in den Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen untersucht. Hierbei fand sich kein Expressionsunterschied zwischen den KO-Mäusen und den Wt-Tieren (Abb. 25 & 26). Es ist folglich davon auszugehen, dass die in IPF-Lungen nachweisbaren erhöhten *NOX4*-Level nicht auf Telomerverkürzung zurückzuführen sind. Auch die in den KO-Mäusen beobachtete vermehrte Proteincarbonylierung basiert nicht auf Veränderungen der *Nox4*-Expression (Abb. 36).

*NOXA1* ist ein Bestandteil des *NOX1*-Multiproteinkomplexes und stimuliert diesen gemeinsam mit *NOXO1* zur Superoxidproduktion [35]. In geringerem Umfang kann

NOXA1 auch NOX2 und NOX3 aktivieren [36, 227]. Eine vermehrte NOXA1-Expression würde folglich zum Anstieg der zellulären Superoxidproduktion und zu vermehrtem oxidativem Stress führen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die pulmonale *Noxa1*-Expression in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen per RT-PCR untersucht. Es zeigte sich jedoch in beiden KO-Stämmen kein Unterschied zur Wt-Expression. Man kann also schlussfolgern, dass Telomerverkürzung nicht zu einer vermehrten *Noxa1*-Expression führt und die in den Mäusen beobachtete vermehrte pulmonale oxidative Proteincarbonylierung nicht auf die *Noxa1*-Expression zurückzuführen ist.

Auch NOXO1 ist ein Bestandteil des NOX1-Komplexes, der außer NOX1 auch NOX3 aktivieren und somit die Superoxidproduktion erhöhen kann [35, 36]. NOXO1 wird primär im Darmepithel exprimiert, findet sich aber im Mausmodell auch im Alveolar- und Bronchialepithel sowie im pulmonalen Endothel [35, 410]. In der vorliegenden Arbeit wurde die *NOXO1*-Expression per RT-PCR in telomeraseinhibierten A549-Zellen (T<sup>-</sup>) *in vitro* untersucht. Dabei war die *NOXO1*-Expression in T<sup>-</sup> ab Passage 19 signifikant höher als in T<sup>+</sup> (Abb. 39). NOXO1 unterscheidet sich von seinem Homolog p47phox dadurch, dass es dauerhaft mit NOX1 assoziiert vorliegt und zudem keine Phosphorylierungs-Domäne besitzt [35, 84]. Im Gegensatz zu p47phox muss NOXO1 zur NOX1-Aktivierung folglich weder zur Plasmamembran rekrutiert noch phosphoryliert werden. Stattdessen wird die Superoxidproduktion durch NOX1 vermutlich direkt durch das NOXO1-Level gesteuert. Hierfür spricht, dass ein *Knockout* von *Nox1* in Mäusen den Anstieg der zigarettenrauchinduzierten Superoxidproduktion in AECII komplett verhindert [410]. Unter der Annahme, dass sich die in der vorliegenden Arbeit beobachtete vermehrte *NOXO1*-Expression in T<sup>-</sup> auch auf der Proteinebene wiederfindet, kann man folglich davon ausgehen, dass in T<sup>-</sup> eine vermehrte Superoxidbelastung vorlag. Es ist denkbar, dass die durch verkürzte Telomere vermittelte erhöhte *NOXO1*-Expression auch in IPF-Lungen zur dort beobachteten vermehrten oxidativen Belastung beiträgt [269].

Zusammenfassend gesagt zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in den beiden untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Stämmen eine vermehrte pulmonale oxidative Belastung, die sich durch die erniedrigte pulmonale *Prdx1*- und *Prx6*-Expression erklären lässt. Auch in den untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen ist vermehrter oxidativer Stress aufgrund der hier beobachteten verstärkten *NOXO1*-Expression wahrscheinlich. In beiden Modellen verkürzter Telomere sind andere Quellen oxidativen Stresses natürlich

nicht auszuschließen. Mitochondrien stellen die wichtigste zelluläre ROS-Quelle da. Wie Sahin et al. in *Tert*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen zeigen konnten, gehen kurze Telomere mit Störungen des mitochondrialen Stoffwechsels und vermehrter mitochondrialer ROS-Produktion einher [398]. Es ist wahrscheinlich, dass diese Mechanismen auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mausstämmen und den telomeraseinhibierten A549-Zellen zum Tragen kamen.

## 5.8 Kompensatorische Expressionserhöhung der Komponenten des Telomerasekomplexes durch Telomerverkürzung

In den für diese Arbeit untersuchten A549-Zellen wurde die Telomeraseaktivität durch Behandlung mit BIBR1532 inhibiert. Es wurde untersucht, welchen Einfluss diese Inhibition auf die Expression der für Komponenten des Telomerase- und Shelterinkomplexes kodierenden Gene hatte. Im Vergleich zu T<sup>+</sup> war die Expression der Telomerasekomplex-Bestandteile *TERT*, *TERC*, *DKC1*, *GARI* und *NOP10* in T<sup>-</sup> zu jedem der untersuchten Passagezeitpunkte signifikant erhöht (Abb. 40).

Diese Expressionserhöhung stellt sehr wahrscheinlich einen Kompensationsversuch in Reaktion auf die zunehmende Telomerverkürzung dar. Kim et al. konnten dies bereits für *TERT* zeigen: Dessen Expression ist in immortalisierten humanen Fibroblasten umgekehrt proportional zur Telomerlänge. Zudem führt die mit der Kulturdauer abnehmende Telomerlänge in humanen Fibroblasten zur progressiven epigenetischen Derepression des *TERT*-Locus [237]. Die kompensatorisch erhöhte *TERC*-Expression in T<sup>-</sup> ist ebenfalls wenig verwunderlich. Da *TERC* das RNA-Template des Telomerasekomplexes darstellt, hängt seine Expression direkt mit der Telomerlänge zusammen. Ein *Knockout* von *Terc* führt im Mausmodell zur Telomerverkürzung, die durch Wiedereinführung von *Terc* rückgängig gemacht werden kann [138, 266, 404].

*DKC1* und *NOP10* sind Mitglieder der H/ACA Small Ribonucleoprotein - Familie, die direkt an das H/ACA-Motiv von *TERC* binden [316, 474]. *DKC1*-Mutationen führen einerseits zur X-chromosomal vererbten Form der Dyskeratosis congenita, wurden andererseits aber auch in einer Familie mit FIP beschrieben [184, 252]. Da *DKC1* zur *TERC*-Stabilisierung beiträgt, führen die veränderten *DKC1*-Proteine zu einem verminderten *TERC*-Level und infolgedessen zu geringerer Telomeraseaktivität und stark verkürzten Telomeren [316]. Ähnliches gilt für *NOP10*: Mutationen in diesem Gen, die sich in Patienten mit der autosomal-rezessiven Form der Dyskeratosis congenita finden, ziehen ebenfalls ein verringertes *TERC*-Level und verkürzte Telomere nach sich

[474]. Es ist folglich gut vorstellbar, dass kurze Telomere zur kompensatorischen Erhöhung der *DKC1*- und *NOP10*- Expression führen.

GAR1 gehört ebenfalls zur H/ACA Small Ribonucleoprotein-Familie, bindet jedoch im Gegensatz zu NOP10 und DKC1 nicht direkt an *TERC*, sondern an DKC1 [169]. Mit *GARI*-Mutationen assoziierte Telomeropathien sind nicht bekannt. Jedoch konnten MacNeil et al. *in vitro* in humanen embryonalen Nierenzellen zeigen, dass GAR1 für die korrekte Lokalisation von DKC1 und somit für die Telomeraseaktivität essentiell ist [290]. Auch hier erscheint eine kompensatorische *GARI*-Expressionserhöhung durch Telomerverkürzung plausibel.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der für verschiedene Shelterinkomponenten kodierenden Gene *TRF1*, *TRF2*, *POT1*, *TPP1* und *TIN2* in den telomeraseinhibierten A549-Zellen untersucht.

TRF1 und TRF2 binden als Homodimere an die doppelsträngigen Telomerabschnitte [406]. Beide sind direkt an der Regulation der Telomerlänge beteiligt, so führt Überexpression von *TRF1* oder *TRF2* in humanen Fibrosarkomzellen zur progressiven Telomerverkürzung [433]. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass TRF1 und TRF2 an der Bildung des T-Loops beteiligt sind, wobei nur TRF2 essentiell für dessen Bildung ist [56, 456]. Smogorzewska et al. stellten die Theorie auf, dass die Telomerenenden im T-Loop für die Telomerase nicht zugänglich sind und folglich nicht verlängert werden können [433]. Damit entspräche die T-Loop-Formation der geschlossenen Konformation im Schaltermodell [452]. Da sowohl TRF1 als auch TRF2 die Telomerverkürzung fördern, wäre es denkbar gewesen, dass kurze Telomere rückkoppelnd die zellulären Level an TRF1 und TRF2 senken. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwischen T<sup>-</sup> und T<sup>+</sup> jedoch zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein Unterschied in der Genexpression von *TRF1* und *TRF2* (Abb. 40). Dies spricht dafür, dass kurze Telomere keinen Einfluss auf die Transkription von *TRF1* und *TRF2* haben. Eine posttranskriptionelle oder posttranslationale Regulation kann hierdurch natürlich nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere für TRF1 ist eine Steuerung des Proteinlevels über posttranslationale Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung bereits beschrieben worden [234, 432].

POT1 und TPP1 sind weitere Bestandteile des Shelterinkomplexes. Sie bilden Heterodimere, die über POT1 an den einzelsträngigen 3'-Überhang der telomerischen DNA binden und per TPP1 mit dem restlichen Shelterinkomplex verbunden sind [78]. Beide Proteine sind für den Schutz der Telomere essentiell, was durch

Deletionsexperimente deutlich wird. Während die Deletion von *Pot1a*, einem Homolog des humanen *POT1*, in Mäusen bereits embryonal letal ist, führt konditionelle Deletion von *Pot1a in vitro* in murinen embryonalen Fibroblasten zum Verlust der Shelterinkappe an den Telomerenden [191, 505]. In Folge dessen kommt es zur Auslösung der Atm-abhängigen DDR und zur Induktion von Zellzyklusarrest und Seneszenz [164, 505]. Auch eine *Tpp1*-Deletion führt *in vitro* in murinen embryonalen Fibroblasten zur Seneszenz und aktiviert über ATR die DDR [164]. Darüber hinaus sind POT1 und TPP1 auf unterschiedliche Weise an der Regulation der Telomerlänge beteiligt. Auf der einen Seite ist der Komplex aus TPP1 und POT1 an der Öffnung der G-Quadruplexe beteiligt, wodurch diese der Verlängerung durch die Telomerase zugänglich werden [511]. Zudem kann TPP1/POT1 *in vitro* an einzelsträngige telomerische DNA binden und darüber die Aktivität der Telomerase sowie deren Rekrutierung an die Telomere fördern [476, 508]. Dies scheint jedoch nur bei kurzen Telomeren zum Tragen zu kommen. An langen Telomeren, die größere Mengen des TPP1/POT1-Komplexes binden können, wirkt dieser hingegen hemmend auf die Telomeraseaktivität [512]. Aufgrund dieses Einflusses auf die Telomerlänge wurde in der vorliegenden Arbeit die *POT1*- und *TPP1*- Expression in telomeraseinhibierten A549-Zellen per RT-PCR ( $T^-$ ) untersucht. Hierbei zeigte sich in Passage 19 isoliert eine in  $T^-$  signifikant höhere Expression von *POT1*, die jedoch weder in P11 noch in P46 zu beobachten war. Die *TPP1*-Expression war dagegen erstaunlicherweise in P46 in  $T^+$  signifikant höher als in  $T^-$  (Abb. 40). Diese Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluss zu. Es ist möglich, dass die Induktion der *POT1*-Expression in Passage 19 einen durch die zunehmende Telomerverkürzung in  $T^-$  ausgelösten Kompensationsmechanismus darstellt. In diesem Fall stellt sich jedoch die Frage, warum die *POT1*-Expression in Passage 46 wieder auf das Ausgangsniveau sank. Zudem bleibt unklar, weshalb *TPP1* in Passage 19 nicht differentiell reguliert war und in Passage 46 in  $T^-$  sogar auf einem signifikant niedrigeren Level exprimiert wurde als in  $T^+$ . Da TPP1 im Heterodimer mit POT1 vorliegt und für dessen Funktion und Lokalisation essentiell ist, wäre zu erwarten gewesen, dass auch POT1 in Passage 19 vermehrt exprimiert wird [78, 508]. Es ist natürlich möglich, dass die isoliert erhöhte *POT1*-Expression in Passage 19 ein Zufallseffekt ist, der nicht auf die Telomerverkürzung zurückzuführen ist. Andererseits ist es auch denkbar, dass nur *POT1* durch die Telomerverkürzung auf der Transkriptionsebene reguliert wird, während die Aktivität von TPP1 über posttranslationale Modifikationen kontrolliert wird. TPP1 besitzt acht phosphorylierbare Loci, deren Phosphorylierung beispielsweise die Fähigkeit

zur Telomeraserekrutierung im Verlauf des Zellzyklus reguliert [377, 538]. Es ist möglich, dass sich auch kurze Telomere auf die Phosphorylierung von TPP1 und somit auf dessen Telomeraseaffinität auswirken.

Sowohl TPP1 als auch TRF1 und TRF2 sind im Shelterinkomplex an TIN2 gebunden, welches die Klammer darstellt, die den gesamten Shelterinkomplex zusammenhält und für dessen Integrität essentiell ist [231]. Folglich ist ein *Knockout* von *TIN2* im Mausmodell bereits in der Embryonalphase letal [89]. Vorübergehende Deletion beziehungsweise Silencing von *TIN2* führt dagegen zur starken Abnahme der telomerischen Lokalisation von TPP1, POT1 und TRF2 [445, 519]. Der durch *TIN2*-Deletion bzw. -Mutation ausgelöste Phänotyp entspricht dabei einer Kombination der durch *TRF2*- und *TPP1*-Deletion ausgelösten Veränderungen: *TIN2*-Defizienz führt *in vitro* einerseits zur Telomerverlängerung, behindert andererseits jedoch die Rekrutierung der Telomerase an die Telomere [2, 236]. Zudem löst eine konditionale Deletion von *TIN2* eine DDR über ATM und ATR aus [445]. Aufgrund des ausgeprägten Einflusses von *TIN2* auf die Telomerlänge wäre es denkbar gewesen, dass sich die *TIN2*-Expression in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten A549-Zellen mit abnehmender Telomerlänge verändert. Es zeigte sich jedoch in keiner der untersuchten Passagen ein Expressionsunterschied zwischen T<sup>+</sup> und T<sup>-</sup> (Abb. 40). Folglich hat die Telomerlänge unter diesen Bedingungen keine Auswirkung auf die Transkription von *TIN2*. Es ist jedoch zu bedenken, dass Modifikationen auf der Proteinebene, wie beispielsweise die von Bhanot et al. für *TIN2* beschriebene Ubiquitinierung, hierdurch nicht ausgeschlossen werden können [55].

Zusammenfassend gesagt bewirkte die mit zunehmender Passagenzahl abnehmende Telomerlänge in den telomeraseinhibierten A549-Zellen eine kompensatorische Expressionserhöhung der für Komponenten des Telomerasekomplexes kodierenden Gene. Auf die Expression von Genen, die für Shelterinkomplexbestandteile kodieren, hatte die Telomerlänge jedoch keinen eindeutigen Einfluss. Auffällig war zudem, dass die Expression von *TRF2* und *TPP1* mit zunehmender Passagenzahl sowohl in T<sup>+</sup> als auch in T<sup>-</sup> signifikant zunahm (Abb. 40). Die Ursache hierfür ist unklar und kann eher nicht auf Telomerverkürzung zurückzuführen sein, da die Expressionszunahme nicht auf T<sup>-</sup> beschränkt war.

## 5.9 Schlussfolgerungen, Limitationen und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biochemischen zellulären Folgen einer kritischen Telomerverkürzung in A549 *in vitro* und in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen *in vivo* zu charakterisieren, um daraus mögliche Schlüsse über den Einfluss von verkürzten Telomeren auf die IPF-Pathogenese ziehen zu können. Die zu beantwortenden Fragen waren:

1. Führen kurze Telomere zur Entwicklung einer (proapoptotischen) UPR?
2. Mit welchen weiteren Veränderungen im Gen- und Proteinexpressionsmuster gehen verkürzte Telomere einher?
3. Reichen kurze Telomere aus, um eine Fibroseentwicklung auszulösen?

Es ergaben sich folgende zentrale Beobachtungen:

Wie bereits mehrfach von unterschiedlichen Gruppen im Mausmodell gezeigt, führt eine Telomerverkürzung allein nicht zur spontanen Entwicklung einer pulmonalen Fibrose [284, 366]. Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit. Dennoch zeigten sich einige durch kurze Telomere bedingte Veränderungen im Gen- und Proteinexpressionsmuster.

Durch Telomerverkürzung wurde eine ER-Stressantwort ausgelöst, die insbesondere *in vitro* im humanen Typ-II-Zellmodell A549 zu beobachten war. Im *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mausmodell fand sich ebenfalls eine pulmonale Kolo-kalisation der ER-Stressmarker mit Typ-II-Zellmarkern, die UPR-Marker waren jedoch mit Ausnahme der Grp78-Proteinexpression sowie der *Atf6*-Genexpression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht heraufreguliert. Vermutlich ist dies durch die deutlich längeren murinen Telomere und die damit verbundene geringere Anfälligkeit gegenüber Telomerverkürzung zu erklären. Nicht mit Sicherheit auszuschließen ist auch, dass der Unterschied zwischen beiden Modellen dadurch zu erklären ist, dass primär Typ-II-Zellen, die in Ganzlungen-Homogenaten nur einen Bruchteil aller Zellen ausmachen, auf kurze Telomere mit ER-Stress reagieren.

Auch oxidativer Stress ließ sich in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse vermehrt nachweisen. Als denkbarer Verursacher zeigte sich eine verringerte Expression von für Peroxiredoxine kodierenden Genen. Dies ließ sich in A549-Zellen jedoch nicht reproduzieren. A549-Zellen zeigten dafür eine verstärkte *NOXO1*-Expression, die vermutlich ebenfalls zur oxidativen Belastung beitrug.

Weiterhin führte Telomerverkürzung im Mausmodell *in vivo* zu gestörter Surfactantproteinsynthese und -prozessierung sowie zum Typ-II-Zellverlust. Letzterer ist vermutlich durch Aktivierung von Signalwegen der Seneszenz und Apoptose in Typ-II-

Zellen zu erklären. Deren Aktivierung ließ sich auch *in vitro* im Typ-II-Zellmodell A549 nachweisen.

Zudem fand sich *in vivo* in den Lungen von *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen und *in vitro* in den telomeraseinhibierten A549-Zellen eine durch Telomerverkürzung verstärkte Expression proinflammatorischer und profibrotischer Marker. Vermittelt wurde dies vermutlich durch DDR, Seneszenz, eine vermehrte M2-Polarisation der Makrophagen und, zumindest in den A549-Zellen, durch die UPR. Da auch die telomeraseinhibierten A549-Zellen eine signifikant erhöhte Expression der für profibrotische und proinflammatorische Zytokine kodierenden Gene aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass Typ-II-Pneumozyten deren Hauptquelle waren. Diese profibrotische Prädisposition trägt wahrscheinlich zur in *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen späterer Generationen beobachteten vermehrten Fibroseentwicklung in Reaktion auf „Second Hits“ wie Bleomycin und LPS bei [284].

Erstaunlicherweise aktivierte die pulmonale Telomerverkürzung im Mausmodell jedoch auch die Transkription und Translation von SIRT1, insbesondere, aber nicht ausschließlich in Typ-II-Zellen. Dies bestätigte sich *in vitro* in A549-Zellen, was dafür spricht, dass Typ-II-Zellen die Hauptquelle der vermehrten Sirtuinexpression darstellten. SIRT1 besitzt antifibrotische Wirkung und schützt vor durch ER- und oxidativen Stress vermittelter Apoptose [10, 477, 534]. Die vermehrte SIRT1-Expression stellte also wahrscheinlich einen Versuch dar, die durch die Telomerverkürzung verursachte Dysregulation unterschiedlicher Signalwege zu kompensieren.

Die bisher beschriebenen in Folge der Telomerverkürzung differentiell regulierten Gene und Proteine ähneln den Veränderungen, die in Analysen aus IPF-Lungen im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden, auffallend. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, finden sich in IPF-Patienten sowohl in peripheren Leukozyten als auch im Alveolarepithel im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant verkürzte Telomere [12]. Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass diese Telomerverkürzung Ursache der Fibroseentstehung ist und zumindest in Typ-II-Zellen auch ER-Stress auslösen kann.

Abschließend wurde in der vorliegenden Arbeit in den A549-Zellen noch der Einfluss der Telomeraseinhibition durch BIBR1532 auf die Expression von für Komponenten des Shelterin- und Telomerasekomplexes kodierenden Genen untersucht. Hierbei zeigte sich eine kompensatorische Erhöhung der Expression der für Komponenten des Telomerasekomplexes kodierenden Gene. Auf die Genexpression von

Shelterinkomponenten hatte die Telomeraseinhibition dagegen keinen eindeutigen Einfluss.

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Limitationen zu beachten: Aus den A549-Zellen konnten aufgrund technischer Probleme keine Western Blots durchgeführt werden und auch für einige der aus den Mauslungen untersuchten Gene liegen keine Ergebnisse auf der Proteinebene vor. Man kann in diesen Fällen nicht mit Sicherheit davon ausgehen, dass sich Veränderungen in der Genexpression eins zu eins auf die Proteinexpression übertragen lassen, da eine posttranskriptionelle und/ oder posttranslationale Regulation nicht ausgeschlossen ist.

Bei den per IHC in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>- bzw. *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäusen durchgeführten Proteinanalysen war es nicht bei allen Färbungen möglich, eine Auszählung gefärbter Zellen durchzuführen, sodass Unterschiede im Proteinlevel zwischen Wildtyptieren und KO-Mäusen nur qualitativ durch den optischen Eindruck bewertet werden konnten.

Leider war es nicht möglich, eine Telomerlängenmessung für die KO-Mäuse und A549-Zellen durchzuführen, sodass für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von durch andere Gruppen bestimmten Telomerlängen ausgegangen werden musste. Die exakte Telomerlänge der untersuchten A549-Zellen und Mausstämme blieb unbekannt.

Durch die verwendeten Modelle selbst entstanden ebenfalls einige Limitationen, die die Übertragbarkeit auf IPF-Patienten einschränken. Einerseits besitzen C57BL/6J-Mäuse erheblich längere Telomere als Menschen und selbst für F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse dieses Stammes wird die durchschnittliche Telomerlänge noch mit 14,9 kB angegeben [266]. Im Gegensatz dazu weisen Menschen bei Geburt etwa 11 kb lange Telomere auf, die im Alter von 80 Jahren auf durchschnittlich 7,6 kb schrumpfen [57, 349]. Folglich haben Mäuse eine wesentlich größere "Telomerreserve" und werden von einer Telomerverkürzung nicht so schnell beeinträchtigt wie Menschen. Dies zeigt sich auch daran, dass kurze Telomere in Menschen zu schweren Krankheiten wie IPF, Dyskeratosis congenita oder aplastischer Anämie führen, während die in der vorliegenden Arbeit untersuchten F3/F5 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit Ausnahme eines diskreten Lungenemphysems phänotypisch unauffällig waren. Bei der Übertragung der im Mausmodell beobachteten Veränderungen auf das Entstehungsmodell einer humanen Krankheit sollte man daher Vorsicht walten lassen. Zudem stellt sich bei Expressionsunterschieden zwischen A549-Zellen und *in*

*vivo*-Mausmodell immer die Frage, ob dieser Unterschied speziesbedingt ist oder dadurch verursacht wird, dass in einer A549-Zellkultur nur ein Zelltyp vorkommt, während in den murinen Lungen unterschiedliche Zellen vertreten sind.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *in vitro*-Modell A549 hat seine eigenen Einschränkungen. A549-Zellen sind pulmonale Adenokarzinomzellen, keine reinen Typ-II-Zellen [97]. Wie bereits in Kapitel 5.2 ausgeführt, herrscht Uneinigkeit darüber, inwieweit und ob A549-Zellen überhaupt Surfactantproteine produzieren [219, 386, 475]. Zudem weisen A549-Zellen eine *CDKN2A*-Deletion auf, wodurch sie sich in der Aufrechterhaltung der Seneszenz möglicherweise von gewöhnlichen AECII unterscheiden [428].

Um die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zu untermauern, könnten folglich weiterführende Experimente durchgeführt werden. Es könnte versucht werden, die in den beiden Modellen differentiell regulierten Gene per Western Blot auf der Proteinebene zu untersuchen, um zu klären, welche Bedeutung die beobachteten Veränderungen haben. Zudem könnte in den Lungen der KO-Mäuse und in den A549-Zellen ein Telomerlängenassay durchgeführt werden, um die genaue Länge der Telomere zu bestimmen. Außerdem könnte die Untersuchung der Proteincarbonylierung, wie sie in den *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen durchgeführt wurde, in der A549-Zellkultur wiederholt werden. Hierdurch ließe sich überprüfen, ob hier trotz der im Gegensatz zu den Mäusen unveränderten *PRDX1*-/*PRDX6*-Expression oxidativer Stress vorlag.

Um die Frage zu beantworten, ob die in den KO-Mäusen nur sehr schwach nachweisbare ER-Stressantwort durch den Speziesunterschied bedingt war oder ob sich ER-Stress primär auf Typ-II-Zellen auswirkt, könnten aus F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen gewonnene AECII isoliert auf die Expression von UPR-Markern untersucht werden.

Interessant wäre auch die Untersuchung gealterter F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse. Die IPF ist keine Erkrankung des jungen Alters und die Telomerlänge nimmt im Laufe des Lebens ab [75]. Chromosomale Fusionen, welche über eine Dysregulation der Proteinsynthese bei kritisch kurzen Telomeren als Auslöser des in den A549-Zellen beobachteten ER-Stresses denkbar sind, können in F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen erst ab einem Alter von 15 Monaten nachgewiesen werden [395]. Folglich ist es denkbar, dass gealterte F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>- und F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>/SPC-GFP-Mäuse durchaus ER-Stress entwickeln.

Um die Theorie der ER-Stressauslösung durch chromosomale Fusionen zu überprüfen, könnten Karyotypenanalysen der A549-Zellen (und KO-Mäuse) durchgeführt werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt sich die These, dass Telomerverkürzung allein zwar zur Entstehung von ER- und oxidativem Stress, zur Einschränkung der Surfactantproteinsynthese, zum Verlust von Typ-II-Zellen mit folgender diskreter Emphyseentwicklung und zur Entstehung eines proinflammatorischen und profibrotischen Milieus, aber nicht zur Fibroseentstehung führt. Wie bereits aus den Arbeiten von Liu et al. und Povedano et al. bekannt, reagieren Mäuse mit kurzen Telomeren jedoch auf sogenannte „Second Hits“ wie Bleomycin und LPS mit ausgeprägterer pulmonaler Fibroseentwicklung als Wt-Tiere [284, 366]. Es wäre interessant zu ermitteln, ob sich in einem Mausmodell mit kurzen Telomeren auch durch einen typischen IPF-Risikofaktor wie die pulmonale Infektion mit Herpesviren oder Exposition gegenüber organischen Stäuben als „Second Hit“ Fibrose auslösen lässt [372]. Der anerkannte Risikofaktor Zigarettenrauch im Sinne eines „Second Hits“ wurde bereits von Alder et al. untersucht, er löst in F4 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen ein pulmonales Emphysem, aber keine Fibrose aus [13].

Es ist nicht auszuschließen, dass humane Zellen auf eine Telomerverkürzung kritischer reagieren als murine Zellen, zumal die in dieser Arbeit untersuchten telomeraseinhibierten A549-Zellen eine ausgeprägte Verstärkung der Expression profibrotischer Gene aufwiesen. Es wäre folglich sinnvoll, den Einfluss der kurze Telomere tragenden A549-Zellen auf pulmonale humane Fibroblasten zu untersuchen. Möglich wäre dies beispielsweise durch eine Kokultur der beiden Zelltypen. Auf diese Weise könnte eruiert werden, ob humane Typ-II-Zellen mit kurzen Telomeren Proliferation, Kollagensynthese und Myofibroblastendifferenzierung pulmonaler Fibroblasten fördern. Auch der Einfluss eines „Second Hits“ wie beispielsweise einer Herpesvirusinfektion könnte so untersucht werden.

Sollte sich der Einfluss der Telomerverkürzung auf die Fibroseentwicklung im Rahmen der IPF in Folgeexperimenten bestätigen, könnte man im nächsten Schritt über eine therapeutische Telomerverlängerung nachdenken. Povedano et al. konnten in Mäusen mit kritisch kurzen Telomeren bereits nachweisen, dass eine gezielte Einführung von *Tert* per vektorbasierter Gentherapie in Typ-II-Pneumozyten eine bleomycininduzierte Fibrose abmildern kann [367]. Im Gegensatz zur ubiquitären *Tert*-Überexpression in klassischen transgenen Mäusen, die die Entwicklung von Neoplasien nach sich zieht, führt eine vektorbasierte Einführung von *Tert* in gealterten Mäusen zur Verlängerung von Telomeren und Lebensspanne, ohne jedoch Krebs zu verursachen [26, 51]. Es ist momentan, noch unklar, inwieweit sich diese Ergebnisse auf langlebige Spezies wie den

Menschen übertragen lassen. Zu bedenken ist hier vor allem, dass Telomeraseexpression ein klassisches Merkmal humaner Krebszellen ist [421].

In jedem Fall bleibt hier noch viel Raum für Folgeexperimente, da die IPF-Forschung trotz vieler Fortschritte in den letzten Jahren immer noch recht weit am Anfang steht. Da die IPF-Inzidenz weltweit steigt, ist jedoch davon auszugehen, dass dieses Thema in Zukunft an Bedeutung gewinnen wird [202].

## 6. Zusammenfassung

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist eine interstitielle Lungenerkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters mit sehr schlechter Prognose. Die Pathogenese ist noch unbekannt, aktuell geht man jedoch davon aus, dass die IPF durch eine aberrante Wundheilung bei repetitiver Schädigung des Alveolarepithels entsteht. Es ist bekannt, dass sowohl familiäre als auch sporadische IPF-Fälle mit verkürzten Telomeren und mit einem alveolärepithelialen endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Telomerverkürzung in den Lungen von F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen und im mit dem Telomeraseinhibitor BIBR1532 behandelten Typ-II-Zellmodell A549 ER-Stress auslösen kann. Zudem wurde untersucht, mit welchen weiteren Veränderungen der Gen- und Proteinexpression die Telomerverkürzung einhergeht und ob allein durch verkürzte Telomere eine Lungenfibrose induziert werden kann.

In den F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen konnte keine spontane Fibroseentwicklung und nur eine minimale UPR beobachtet werden. Es konnte jedoch eine Kolokalisation der UPR-Marker mit dem Typ-II-Zellmarker Surfactantprotein C nachgewiesen werden. Im A549-Zellmodell der Telomerase-Inhibition zeigte sich dagegen eine deutlich stärkere ER-Stressantwort mit signifikant verstärkter Expression der für Proteine der UPR codierenden Gene.

Oxidativer Stress ließ sich in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse vermehrt nachweisen. Als denkbarer Verursacher zeigte sich eine verringerte Expression von für Peroxiredoxine kodierenden Genen. Weiterhin führte die Telomerverkürzung im Mausmodell zu gestörter Surfactantproteinsynthese und -prozessierung sowie zur Entwicklung eines diskreten Lungenemphysems mit Verlust von Typ-II-Zellen und Aktivierung von Signalwegen der Seneszenz und Apoptose. Deren Aktivierung ließ sich auch *in vitro* im Typ-II-Zellmodell A549 nachweisen und kann den Typ-II-Zellverlust erklären. Zudem

fand sich in den Lungen der *Terc*<sup>(-/-)</sup>-Mäuse eine verstärkte Expression proinflammatorischer und profibrotischer Marker. Dies ließ sich in den *Telomerase*-inhibierten A549-Zellen reproduzieren. Möglicherweise sind seneszente Typ-II-Zellen eine Hauptquelle profibrotischer Mediatoren.

Die ausbleibende Fibroseentwicklung im Mausmodell könnte durch die im Vergleich zum Menschen selbst im F3-Modell noch immer deutlich längeren murinen Telomere erklärt werden. Einen weiteren Einflussfaktor dürfte die kompensatorische Aktivierung antifibrotischer Signalwege darstellen. Es fanden sich in beiden Modellen erhöhte Level an Sirtuin 1- mRNA bzw. Sirtuin 1-Protein. Sirtuin-1 ist ein Deacetylase, die antifibrotische und antiapoptotische Wirkung ausübt. Insgesamt ähnelten die durch Telomerverkürzung differenziell regulierten Gene und Proteine den in IPF-Lungen beobachteten Veränderungen, ohne jedoch zu Fibrose zu führen.

## Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is an interstitial lung disease that occurs in mid to late adulthood and is characterized by a very poor prognosis. The exact pathogenesis of IPF has not yet been fully elucidated. The most widely accepted hypothesis states that IPF results from aberrant wound healing caused by repetitive microinjuries to the alveolar epithelium on a basis of increased susceptibility.

There is evidence that familial as well as sporadic cases of IPF are associated with shortened telomeres and pulmonary endoplasmic reticulum (ER) stress. The present study seeks to answer the question if telomere shortening can directly cause ER stress in the lungs of F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup> mice and in an *in vitro* model for type II cells. For the latter, A549 cells were treated with the *Telomerase* inhibitor BIBR1532. Furthermore, it was investigated whether telomere shortening is sufficient to cause pulmonary fibrosis. Lastly, the influence of telomere shortening on the expression of markers of senescence, oxidative stress, inflammation and fibrosis as well as on surfactant processing and lung phenotype was analysed.

In line with published results from other groups, no spontaneous fibrosis was observed in the F3 *Terc*<sup>(-/-)</sup> mice. While the A549 telomerase inhibition model showed a robust upregulation of UPR markers, there was only a minimal ER stress response in both *telomerase knockout* mice strains. In the murine lungs, the UPR proteins colocalized with type II cell markers.

Moreover, oxidative stress caused by diminished expression of genes encoding for peroxiredoxins was evident in these lungs. Furthermore, in the *Terc*<sup>(-/-)</sup> mice, telomere shortening led to disturbed surfactant protein synthesis and processing as well as development of a mild pulmonary emphysema which was probably caused by the observed loss of type II pneumocytes. This loss can be explained by the activation of proapoptotic and prosenescent signalling which was detected in the lungs of the KO mice as well as in the A549 cells *in vitro*. Activation of profibrotic and proinflammatory signalling was also seen in the murine lungs. Since this could be reproduced in the *in vitro* model using A549 cells, it is safe to assume that senescent type II cells are the main source of those mediators.

Nevertheless, there was no evidence of fibrosis in the murine model. The underlying cause for this might be the fact that mice have significantly longer telomeres than humans. The elevated levels of Sirtuin 1-mRNA and protein that were found in both models might be another influencing factor. Sirtuin 1 is a deacetylase known for its antifibrotic and antiapoptotic properties. Taken together, the observed changes in gene and protein expression caused by shortened telomeres resembled those apparent in IPF lungs without, however, causing fibrosis.

## 7. Anhang

### 7.1 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.

St. Georgen, 15.03.2025

( Saskia Schlenker)

## 7.2 Danksagung

Mein Dank gilt allen voran meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Martina Korfei. Vielen Dank, Martina, dass du mir bei Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden bist. Danke auch für deinen Humor und unsere tollen Gespräche. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Günther für die Bereitstellung des Themas bedanken.

Ich bin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Günther für ihre Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit dankbar. Insbesondere möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen Beate Schneider, Silke Händel und Ann-Christin Beitel bedanken. Beate, danke dass Du mir die Grundlagen aller in dieser Arbeit angewandten Methoden beigebracht hast. Silke, vielen lieben Dank für das Einscannen meiner Schnitte und dafür, dass du diese morgens immer für mich in den Ofen gelegt hast. Und danke Dir Ann, dass du die Lungenschnitte für mich hergestellt hast.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann Simon Schlenker bedanken. Ihr habt mir mein Medizinstudium und damit auch die Entstehung dieser Doktorarbeit erst ermöglicht. Danke vor allem auch dafür, dass ihr mich in jeder Lebenslage unterstützt habt und mir immer Mut gemacht habt.

## Literaturverzeichnis

- [1] Abbas, T. and Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* 9, 6, 400–414.

- [2] Abreu, E., Arifonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R. M., Lingner, J., and Terns, M. P. 2010. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Molecular and cellular biology* 30, 12, 2971–2982.
- [3] Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., and Gil, J. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology* 15, 8, 978–990.
- [4] Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. 2008. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 1, 75–89.
- [5] Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S., Ayaub, E. A., Neumark, N., Ahangari, F., Chu, S. G., Raby, B. A., DeJuliis, G., Januszyk, M., Duan, Q., Arnett, H. A., Siddiqui, A., Washko, G. R., Homer, R., Yan, X., Rosas, I. O., and Kaminski, N. 2020. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Advances* 6, 28, eaba1983.
- [6] Agnew, A., Nulty, C., and Creagh, E. M. 2021. Regulation, Activation and Function of Caspase-11 during Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 22, 4.
- [7] Aguayo-Mazzucato, C., van Haaren, M., Mruk, M., Lee, T. B., Crawford, C., Hollister-Lock, J., Sullivan, B. A., Johnson, J. W., Ebrahimi, A., Dreyfuss, J. M., van Deursen, J., Weir, G. C., and Bonner-Weir, S. 2017.  $\beta$  Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 25, 4, 898-910.e5.
- [8] Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., and Park, J. E. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331, 22, 1480–1487.
- [9] Akram, K. M., Lomas, N. J., Forsyth, N. R., and Spiteri, M. A. 2014. Alveolar epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis display upregulation of TRAIL, DR4 and DR5 expression with simultaneous preferential over-expression of pro-apoptotic marker p53. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7, 2, 552–564.
- [10] Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S. F., and Sadoshima, J. 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research* 100, 10, 1512–1521.
- [11] Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 24, 13742–13747.
- [12] Alder, J. K., Chen, J. J.-L., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S., Cogan, J. D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tudor, R. M., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Loyd, J. E., and Armanios, M. Y. 2008. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 35, 13051–13056.
- [13] Alder, J. K., Guo, N., Kembou, F., Parry, E. M., Anderson, C. J., Gorgy, A. I., Walsh, M. F., Sussan, T., Biswal, S., Mitzner, W., Tudor, R. M., and Armanios,

- M. 2011. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184, 8, 904–912.
- [14] Alfaro, M. P., Deskins, D. L., Wallus, M., DasGupta, J., Davidson, J. M., Nanney, L. B., A Guney, M., Gannon, M., and Young, P. P. 2013. A physiological role for connective tissue growth factor in early wound healing. *Lab Invest* 93, 1, 81–95.
- [15] Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultsinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., Bellerocche, J. de, Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E., and Samali, A. 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal* 286, 2, 241–278.
- [16] Álvarez, D., Cárdenes, N., Sellarés, J., Bueno, M., Corey, C., Hanumanthu, V. S., Peng, Y., D'Cunha, H., Sembrat, J., Nouraie, M., Shanker, S., Caufield, C., Shiva, S., Armanios, M., Mora, A. L., and Rojas, M. 2017. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 313, 6, L1164-L1173.
- [17] Amano, H., Chaudhury, A., Rodriguez-Aguayo, C., Lu, L., Akhanov, V., Catic, A., Popov, Y. V., Verdin, E., Johnson, H., Stossi, F., Sinclair, D. A., Nakamaru-Ogiso, E., Lopez-Berestein, G., Chang, J. T., Neilson, J. R., Meeker, A., Finegold, M., Baur, J. A., and Sahin, E. 2019. Telomere Dysfunction Induces Sirtuin Repression that Drives Telomere-Dependent Disease. *Cell Metabolism* 29, 6, 1274-1290.e9.
- [18] Ambasta, R. K., Kumar, P., Griendling, K. K., Schmidt, H. H. H. W., Busse, R., and Brandes, R. P. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44, 45935–45941.
- [19] Andersson-Sjöland, A., Alba, C. G. de, Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., and Selman, M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 10, 2129–2140.
- [20] Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. 2004. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of Cell Biology* 165, 5, 723–734.
- [21] Anwar, T., Khosla, S., and Ramakrishna, G. 2016. Increased expression of SIRT2 is a novel marker of cellular senescence and is dependent on wild type p53 status. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15, 14, 1883–1897.
- [22] Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 6303, 730–732.
- [23] Armanios, M. 2009. Syndromes of Telomere Shortening. *Annual review of genomics and human genetics* 10, 45.
- [24] Armanios, M. and Blackburn, E. H. 2012. The telomere syndromes. *Nature reviews. Genetics* 13, 10, 693–704.
- [25] 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., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W., and Loyd, J. E. 2007. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 356, 13, 1317–1326.
- [26] Artandi, S. E., Alson, S., Tietze, M. K., Sharpless, N. E., Ye, S., Greenberg, R. A., Castrillon, D. H., Horner, J. W., Weiler, S. R., Carrasco, R. D., and DePinho, R. A. 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in

- aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12, 8191–8196.
- [27] Arteaga, M., Shang, N., Ding, X., Yong, S., Cotler, S. J., Denning, M. F., Shimamura, T., Breslin, P., Lüscher, B., and Qiu, W. 2016. Inhibition of SIRT2 suppresses hepatic fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 310, 11, G1155-68.
- [28] ATS. 2002. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165, 277–304.
- [29] Austyn, J. M. and Gordon, S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology* 11, 10, 805–815.
- [30] Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. 2004. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 279, 7, 5288–5297.
- [31] Baek, H. A., Kim, D. S., Park, H. S., Jang, K. Y., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., Chae, H. J., and Chung, M. J. 2012. Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Myofibroblastic Differentiation of Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(6), 731-739. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46, 6, 731–739.
- [32] Bai, D., Ueno, L., and Vogt, P. K. 2009. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 125, 12, 2863–2870.
- [33] Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., and Inagaki, N. 2007. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 282, 13, 9628–9634.
- [34] Bánfi, C. and Agostoni, P. 2016. Surfactant protein B: From biochemistry to its potential role as diagnostic and prognostic marker in heart failure. *International journal of cardiology* 221, 456–462.
- [35] Bánfi, B., Clark, R. A., Steger, K., and Krause, K.-H. 2003. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6, 3510–3513.
- [36] Bánfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.-H. 2004. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44, 46065–46072.
- [37] Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* 281, 5383, 1674–1677.
- [38] Barbas-Filho, J. V., Ferreira, M. A., Sesso, A., Kairalla, R. A., Carvalho, C. R., and Capelozzi, V. L. 2001. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). *Journal of Clinical Pathology* 54, 2, 132–138.
- [39] Barkauskas, C. E., Crouce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., and Hogan, B. L. M. 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 123, 7, 3025–3036.
- [40] Barratt, S. L., Blythe, T., Jarrett, C., Ourradi, K., Shelley-Fraser, G., Day, M. J., Qiu, Y., Harper, S., Maher, T. M., Oltean, S., Hames, T. J., Scotton, C. J., Welsh,

- G. I., Bates, D. O., and Millar, A. B. 2017. Differential Expression of VEGF-Axxx Isoforms Is Critical for Development of Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 196, 4, 479–493.
- [41] Barratt, S. L., Creamer, A., Hayton, C., and Chaudhuri, N. 2018. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *Journal of Clinical Medicine* 7, 8.
- [42] Barratt, S. L., Flower, V. A., Pauling, J. D., and Millar, A. B. 2018. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *International journal of molecular sciences* 19, 5.
- [43] B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. 2013. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 41, 16, 7683–7699.
- [44] Beers, M. F. and Mulugeta, S. 2017. The biology of the ABCA3 lipid transporter in lung health and disease. *Cell and tissue research* 367, 3, 481–493.
- [45] Behr, J., Günther, A., Ammenwerth, W., Bittmann, I., Bonnet, R., Buhl, R., Eickelberg, O., Ewert, R., Gläser, S., Gottlieb, J., Grohé, C., Kreuter, M., Kroegel, C., Markart, P., Neurohr, C., Pfeifer, M., Prasse, A., Schönfeld, N., Schreiber, J., Sitter, H., Theegarten, D., Theile, A., Wilke, A., Wirtz, H., Witt, C., Worth, H., Zabel, P., Müller-Quernheim, J., and Costabel, U. 2013. S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 67, 2, 81–111.
- [46] Bellocq, A., Azoulay, E., Marullo, S., Flahault, A., Fouqueray, B., Philippe, C., Cadranet, J., and Baud, L. 1999. Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21, 1, 128–136.
- [47] Benne, C. A., Kraaijeveld, C. A., van Strijp, J. A., Brouwer, E., Harmsen, M., Verhoef, J., van Golde, L. M., and van Iwaarden, J. F. 1995. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *The Journal of infectious diseases* 171, 2, 335–341.
- [48] Bergeron, A., Soler, P., Kambouchner, M., Loiseau, P., Milleron, B., Valeyre, D., Hance, A. J., and Tazi, A. 2003. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-beta and IL-10. *The European respiratory journal* 22, 1, 69–76.
- [49] Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology* 7, 2, 99–109.
- [50] Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272, 33, 20313–20316.
- [51] Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M. A. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO molecular medicine* 4, 8, 691–704.
- [52] 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, 6, 326–332.
- [53] Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 7090, 235–238.
- [54] Bhandary, Y. P., Shetty, S. K., Marudamuthu, A. S., Gyetko, M. R., Idell, S., Gharaee-Kermani, M., Shetty, R. S., Starcher, B. C., and Shetty, S. 2012.

- Regulation of alveolar epithelial cell apoptosis and pulmonary fibrosis by coordinate expression of components of the fibrinolytic system. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 302, 5, L463-L473.
- [55] Bhanot, M. and Smith, S. 2012. TIN2 stability is regulated by the E3 ligase Siah2. *Molecular and cellular biology* 32, 2, 376–384.
- [56] Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and Lange, T. de. 1997. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *The EMBO Journal* 16, 7, 1785–1794.
- [57] Bischoff, C., Graakjaer, J., Petersen, H. C., Jeune, B., Bohr, V. A., Koelvræ, S., and Christensen, K. 2005. Telomere length among the elderly and oldest-old. *twin res hum genet* 8, 5, 425–432.
- [58] Blasco, M. A., Lee, H.-W., Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. 1997. Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA. *Cell* 91, 1, 25–34.
- [59] Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., and Wright, W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)* 279, 5349, 349–352.
- [60] Bodnar-Wachtel, M., Huber, A.-L., Gorry, J., Hacot, S., Gerossier, L., Guey, B., Goutagny, N., Bartosch, B., Ballot, E., Ghiringhelli, F., Py, B. F., Coute, Y., Ballesta, A., Lantuejoul, S., Hall, J., and Petrilli, V. 2020. *NLRP3 controls ATM activation in response to DNA damage.*
- [61] Bogatkevich, G. S., Tourkina, E., Silver, R. M., and Ludwicka-Bradley, A. 2001. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 48, 45184–45192.
- [62] Bohinski, R. J., Di Lauro, R., and Whitsett, J. A. 1994. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Molecular and cellular biology* 14, 9, 5671–5681.
- [63] Bonis, M. L. de, Ortega, S., and Blasco, M. A. 2014. SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2, 5, 690–706.
- [64] Braga, T. T., Agudelo, J. S. H., and Camara, N. O. S. 2015. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Frontiers in immunology* 6, 602.
- [65] Bragg, A. D., Moses, H. L., and Serra, R. 2001. Signaling to the epithelium is not sufficient to mediate all of the effects of transforming growth factor  $\beta$  and bone morphogenetic protein 4 on murine embryonic lung development. *Mechanisms of Development* 109, 1, 13–26.
- [66] Brasch, F., Brinke, A. ten, Johnen, G., Ochs, M., Kapp, N., Müller, K. M., Beers, M. F., Fehrenbach, H., Richter, J., Batenburg, J. J., and Bühling, F. 2002. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 26, 6, 659–670.
- [67] Brennan, M. A. and Cookson, B. T. 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular microbiology* 38, 1, 31–40.
- [68] Breton, J.-D., Heydet, D., Starrs, L. M., Veldre, T., and Ghildyal, R. 2018. Molecular changes during TGF $\beta$ -mediated lung fibroblast-myofibroblast differentiation: implication for glucocorticoid resistance. *Physiological Reports* 6, 7, e13669.

- [69] Brewer, J. W. and Diehl, J. A. 2000. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 23, 12625–12630.
- [70] Brown, D. I. and Griendling, K. K. 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine* 47, 9, 1239–1253.
- [71] Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO Journal* 14, 17, 4240–4248.
- [72] Bullard, J. E., Wert, S. E., Whitsett, J. A., Dean, M., and Noguee, L. M. 2005. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172, 8, 1026–1031.
- [73] Bulvik, R., Breuer, R., Dvir-Ginzberg, M., Reich, E., Berkman, N., and Wallach-Dayana, S. B. 2020. SIRT1 Deficiency, Specifically in Fibroblasts, Decreases Apoptosis Resistance and Is Associated with Resolution of Lung-Fibrosis. *Biomolecules* 10, 7.
- [74] Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* 282, 5393, 1497–1501.
- [75] Calado, R. T. and Dumitriu, B. 2013. Telomere dynamics in mice and humans. *Seminars in hematology* 50, 2, 165–174.
- [76] Cantin, A. M., North, S. L., Fells, G. A., Hubbard, R. C., and Crystal, R. G. 1987. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 79, 6, 1665–1673.
- [77] Carnesecchi, S., Deffert, C., Donati, Y., Basset, O., Hinz, B., Preynat-Seauve, O., Guichard, C., Arbiser, J. L., Banfi, B., Pache, J.-C., Barazzone-Argiroffo, C., and Krause, K.-H. 2011. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling* 15, 3, 607–619.
- [78] Chen, C., Gu, P., Wu, J., Chen, X., Niu, S., Sun, H., Wu, L., Li, N., Peng, J., Shi, S., Fan, C., Huang, M., Wong, C. C. L., Gong, Q., Kumar-Sinha, C., Zhang, R., Pusztai, L., Rai, R., Chang, S., and Lei, M. 2017. Structural insights into POT1-TTP1 interaction and POT1 C-terminal mutations in human cancer. *Nat Commun* 8, 1, 14929.
- [79] Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. 2000. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37, 28421–28427.
- [80] Chen, L., Hou, J., Fu, X., Chen, X., Wu, J., and Han, X. 2019. tPA promotes the proliferation of lung fibroblasts and activates the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 18, 22, 3137–3146.
- [81] Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., and Huang, D. C. S. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* 17, 3, 393–403.
- [82] Chen, R., Zhang, K., Chen, H., Zhao, X., Wang, J., Li, L., Cong, Y., Ju, Z., Xu, D., Williams, B. R. G., Jia, J., and Liu, J.-P. 2015. Telomerase Deficiency Causes Alveolar Stem Cell Senescence-associated Low-grade Inflammation in Lungs. *J. Biol. Chem.* 290, 52, 30813–30829.

- [83] Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K., and Tsuruo, T. 1999. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18, 1, 173–180.
- [84] Cheng, G. and Lambeth, J. D. 2004. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6, 4737–4742.
- [85] Cheng, G., Wang, L., Dai, M., Wei, F., and Xu, D. 2020. Shorter Leukocyte Telomere Length coupled with lower expression of Telomerase Genes in patients with Essential Hypertension. *International journal of medical sciences* 17, 14, 2180–2186.
- [86] Cheong, N., Zhang, H., Madesh, M., Zhao, M., Yu, K., Dodia, C., Fisher, A. B., Savani, R. C., and Shuman, H. 2007. ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *The Journal of biological chemistry* 282, 33, 23811–23817.
- [87] Cheresh, P., Kim, S.-J., Tulasiram, S., and Kamp, D. W. 2013. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 1832, 7, 1028–1040.
- [88] Chhunchha, B., Singh, P., Stamer, W. D., and Singh, D. P. 2017. Prdx6 retards senescence and restores trabecular meshwork cell health by regulating reactive oxygen species. *Cell death discovery* 3, 17060.
- [89] Chiang, Y. J., Kim, S.-H., Tessarollo, L., Campisi, J., and Hodes, R. J. 2004. Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Molecular and cellular biology* 24, 15, 6631–6634.
- [90] Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E., and Kopito, R. R. 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nature cell biology* 10, 3, 272–282.
- [91] Chu, H., Jiang, S., Liu, Q., Ma, Y., Zhu, X., Liang, M., Shi, X., Ding, W., Zhou, X., Zou, H., Qian, F., Shaul, P. W., Jin, L., and Wang, J. 2018. Sirtuin1 Protects against Systemic Sclerosis-related Pulmonary Fibrosis by Decreasing Proinflammatory and Profibrotic Processes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 58, 1, 28–39.
- [92] Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E., and Whitsett, J. A. 1995. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 17, 7794–7798.
- [93] Coghlan, M. A., Shifren, A., Huang, H. J., Russell, T. D., Mitra, R. D., Zhang, Q., Wegner, D. J., Cole, F. S., and Hamvas, A. 2014. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respiratory Research* 1, 1.
- [94] Collard, H. R., King, T. E., Bartelson, B. B., Vourlekis, J. S., Schwarz, M. I., and Brown, K. K. 2003. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 168, 5, 538–542.
- [95] Compornolle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., and Carmeliet, P. 2002. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine* 8, 7, 702–710.

- [96] Cong, Y.-S., Wright, W. E., and Shay, J. W. 2002. Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 407-425. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 3, 407–425.
- [97] Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, E. C., Kempself, K. E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J. E., and Davies, D. E. 2016. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PloS one* 11, 10.
- [98] Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99-118. *Annual review of pathology* 5, 99–118.
- [99] Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C. M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *Journal of Biological Chemistry* 281, 40, 29568–29574.
- [100] Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLOS Biology* 6, 12, 2853–2868.
- [101] Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal* 11, 5, 1921–1929.
- [102] Crestani, B., Cornillet, P., Dehoux, M., Rolland, C., Guenounou, M., and Aubier, M. 1994. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest* 94, 2, 731–740.
- [103] Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K. M. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 1, 121–134.
- [104] Crocco, P., Montesanto, A., Passarino, G., and Rose, G. 2016. Polymorphisms Falling Within Putative miRNA Target Sites in the 3'UTR Region of SIRT2 and DRD2 Genes Are Correlated With Human Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71, 5, 586–592.
- [105] Cui, C.-Y., Driscoll, R. K., Piao, Y., Chia, C. W., Gorospe, M., and Ferrucci, L. 2019. Skewed macrophage polarization in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 18, 6, e13032.
- [106] Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., and Diehl, J. A. 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology* 23, 20, 7198–7209.
- [107] Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., Longueville, F. de, Boffe, S., Remacle, J., and Toussaint, O. 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 118, Pt 4, 743–758.
- [108] Degryse, A. L., Xu, X. C., Newman, J. L., Mitchell, D. B., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Jones, B. R., McMahon, F. B., Gleaves, L. A., Phillips, J. A., Cogan, J. D., Blackwell, T. S., and Lawson, W. E. 2012. Telomerase deficiency does not alter bleomycin-induced fibrosis in mice. *Experimental lung research* 38, 3, 124–134.

- [109] Denchi, E. L. and Lange, T. de. 2007. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 448(7157), 1068-1071. *Nature* 448, 7157, 1068–1071.
- [110] Deng, C., Zhang, P., Wade Harper, J., Elledge, S. J., and Leder, P. 1995. Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 4, 675–684.
- [111] Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P., and Ron, D. 2004. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and cellular biology* 24, 23, 10161–10168.
- [112] Deprez-Roy, I., Coge, F., Bertry, L., Galizzi, J. P., Feletou, M., Vanhoutte, P. M., and Canet, E. 2000. Endothelin-1 pathway in human alveolar epithelial cell line A549 and human umbilical vein endothelial cells. *Acta pharmacologica Sinica* 21, 6, 499–506.
- [113] Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* 146, 1, 56–66.
- [114] Di d'Adda Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Zglinicki, T. von, Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 6963, 194–198.
- [115] Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 27, 519–550.
- [116] Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., and Shao, F. 2016. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535, 7610, 111–116.
- [117] Disayabutr, S., Kim, E. K., Cha, S.-I., Green, G., Naikawadi, R. P., Jones, K. D., Golden, J. A., Schroeder, A., Matthay, M. A., Kukreja, J., Erle, D. J., Collard, H. R., and Wolters, P. J. 2016. miR-34 miRNAs Regulate Cellular Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* 11, 6, e0158367.
- [118] Dokal, I. 2011. Dyskeratosis Congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 1, 480–486.
- [119] Donati, G., Imbriano, C., and Mantovani, R. 2006. Dynamic recruitment of transcription factors and epigenetic changes on the ER stress response gene promoters. *Nucleic acids research* 34, 10, 3116–3127.
- [120] Dörr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J. H. M., Lisek, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfürst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Gräler, M., Hummel, M., Keller, U., Buck, A. K., Dörken, B., Willmitzer, L., Reimann, M., Kempa, S., Lee, S., and Schmitt, C. A. 2013. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501, 7467, 421–425.
- [121] Driscoll, B., Buckley, S., Bui, K. C., Anderson, K. D., and Warburton, D. 2000. Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279, 6, L1191-8.
- [122] Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., and Montminy, M. 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science (New York, N.Y.)* 300, 5625, 1574–1577.
- [123] Du Bois, R. M., Weycker, D., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Kartashov, A., Lancaster, L., Noble, P. W., Sahn, S. A., Szwarcberg, J., Thomeer, M., Valeyre, D., and King, T. E. 2011. Six-minute-walk test in idiopathic

- pulmonary fibrosis: test validation and minimal clinically important difference. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183, 9, 1231–1237.
- [124] Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J.-B., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free radical biology & medicine* 28, 3, 361–373.
- [125] Duncan, M. R., Frazier, K. S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., and Grotendorst, G. R. 1999. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 13, 1774–1786.
- [126] Eddy, A. A. 2002. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 283, 2, F209-20.
- [127] Effendi, W. I. and Nagano, T. 2022. Connective Tissue Growth Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Breaking the Bridge. *International journal of molecular sciences* 23, 11.
- [128] El-Deiry, W. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 4, 817–825.
- [129] Eletto, D., Dersh, D., and Argon, Y. 2010. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 5, 479–485.
- [130] Endo, M., Mori, M., Akira, S., and Gotoh, T. 2006. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176, 10, 6245–6253.
- [131] Epstein Shochet, G., Brook, E., Bardenstein-Wald, B., and Shitrit, D. 2020. TGF- $\beta$  pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling. *Respir Res* 21, 1, 56.
- [132] Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., Petrenko, O., and Moll, U. M. 2004. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Molecular and cellular biology* 24, 15, 6728–6741.
- [133] Escudero, L., Cleal, K., Ashelford, K., Fegan, C., Pepper, C., Liddiard, K., and Baird, D. M. 2019. Telomere fusions associate with coding sequence and copy number alterations in CLL. *Leukemia*, 33(8), 2093-2097. *Leukemia* 33, 8, 2093–2097.
- [134] Ezhevsky, S. A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Gius, D. R., Wei, M. C., and Dowdy, S. F. 1997. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 20, 10699–10704.
- [135] Fang, P., Xiang, L., Huang, S., Jin, L., Zhou, G., Zhuge, L., Li, J., Fan, H., Zhou, L., Pan, C., and Zheng, Y. 2018. IRE1 $\alpha$ -XBP1 signaling pathway regulates IL-6 expression and promotes progression of hepatocellular carcinoma. *Oncology letters* 16, 4, 4729–4736.
- [136] Fatma, N., Singh, P., Chhunchha, B., Kubo, E., Shinohara, T., Bhargavan, B., and Singh, D. P. 2011. Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis. *American journal of physiology. Cell physiology* 301, 4, C954-67.
- [137] Feldser, D. M. and Greider, C. W. 2007. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer cell* 11, 5, 461–469.

- [138] Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., and Yu, J. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N.Y.)* 269, 5228, 1236–1241.
- [139] Fisher, A. B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J. W., and Feinstein, S. I. 1999. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30, 21326–21334.
- [140] Flores, I., Evan, G., and Blasco, M. A. 2006. Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo. *Molecular and cellular biology* 26, 16, 6130–6138.
- [141] Fouché, N., Cesare, A. J., Willcox, S., Ozgür, S., Compton, S. A., and Griffith, J. D. 2006. The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats. *Journal of Biological Chemistry* 281, 49, 37486–37495.
- [142] Fradejas, N., Pastor, M. D., Burgos, M., Beyaert, R., Tranque, P., and Calvo, S. 2010. Caspase-11 mediates ischemia-induced astrocyte death: involvement of endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein. *Journal of neuroscience research* 88, 5, 1094–1105.
- [143] Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P., and Di d'Adda Fagagna, F. 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology* 14, 4, 355–365.
- [144] Gabbiani, G., Ryan, G. B., and Majne, G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27, 5, 549–550.
- [145] Garcia, C. K. 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis: update on genetic discoveries. *Proceedings of the American Thoracic Society* 8, 2, 158–162.
- [146] García-Sancho, C., Buendía-Roldán, I., Fernández-Plata, M. R., Navarro, C., Pérez-Padilla, R., Vargas, M. H., Loyd, J. E., and Selman, M. 2011. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* 105, 12, 1902–1907.
- [147] Gerson, K. D., Foster, C. D., Zhang, P., Zhang, Z., Rosenblatt, M. M., and Guttentag, S. H. 2008. Pepsinogen C proteolytic processing of surfactant protein B. *Journal of Biological Chemistry* 283, 16, 10330–10338.
- [148] Gharaee-Kermani, M., Hu, B., Phan, S. H., and Gyetko, M. R. 2008. The role of urokinase in idiopathic pulmonary fibrosis and implication for therapy. *Expert opinion on investigational drugs* 17, 6, 905–916.
- [149] Gharib, S. A., Nguyen, E., Altemeier, W. A., Shaffer, S. A., Doneanu, C. E., Goodlett, D. R., and Schnapp, L. M. 2010. Of mice and men: comparative proteomics of bronchoalveolar fluid. *European Respiratory Journal* 35, 6, 1388–1395.
- [150] Ghildyal, R., Hartley, C., Varrasso, A., Meanger, J., Voelker, D. R., Anders, E. M., and Mills, J. 1999. Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *The Journal of infectious diseases* 180, 6, 2009–2013.
- [151] Ghosh, A. K. and Vaughan, D. E. 2012. PAI-1 in tissue fibrosis. *Journal of cellular physiology* 227, 2, 493–507.
- [152] Ghosh, A. P., Klocke, B. J., Ballestas, M. E., and Roth, K. A. 2012. CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PloS one* 7, 6, e39586.

- [153] Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., and Urano, F. 2010. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLOS ONE* 5, 3, e9575.
- [154] Glassberg, M. K. 2019. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis, evidence-based guidelines, and recent. *The American journal of managed care* 25, 11 Suppl, S195-S203.
- [155] Glasser, S. W., Burhans, M. S., Korfhagen, T. R., Na, C. L., Sly, P. D., Ross, G. F., Ikegami, M., and Whitsett, J. A. 2001. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11, 6366–6371.
- [156] Goldman, F. D., Aubert, G., Klingelhutz, A. J., Hills, M., Cooper, S. R., Hamilton, W. S., Schlueter, A. J., Lambie, K., Eaves, C. J., and Lansdorp, P. M. 2008. Characterization of primitive hematopoietic cells from patients with dyskeratosis congenita. *Blood* 111, 9, 4523–4531.
- [157] Gómez, D. L. M., Farina, H. G., and Gómez, D. E. 2013. Telomerase regulation: a key to inhibition? (Review). *International journal of oncology* 43, 5, 1351–1356.
- [158] Gong, H., Zheng, C., Lyu, X., Dong, L., Tan, S., and Zhang, X. 2021. Inhibition of Sirt2 Alleviates Fibroblasts Activation and Pulmonary Fibrosis via Smad2/3 Pathway. *Frontiers in pharmacology* 12, 756131.
- [159] Greider, C. W. 2016. Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model. *Genes & development* 30, 13, 1483–1491.
- [160] Greider, C. W. and Blackburn, E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43, 2, 405–413.
- [161] Gressner, O. A., Peredniene, I., and Gressner, A. M. 2011. Connective tissue growth factor reacts as an IL-6/STAT3-regulated hepatic negative acute phase protein. *World journal of gastroenterology* 17, 2, 151–163.
- [162] Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and Lange, T. de. 1999. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*, 97(4), 503-514.
- [163] Guo, N., Parry, E. M., Li, L.-S., Kembou, F., Lauder, N., Hussain, M. A., Berggren, P.-O., and Armanios, M. 2011. Short telomeres compromise  $\beta$ -cell signaling and survival. *PloS one* 6, 3, e17858.
- [164] Guo, X., Deng, Y., Lin, Y., Cosme-Blanco, W., Chan, S., He, H., Yuan, G., Brown, E. J., and Chang, S. 2007. Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *The EMBO Journal* 26, 22, 4709–4719.
- [165] Hagemeyer, L. and Kolb, M. 2016. Idiopathische Lungenfibrose. In *Seltene Lungenerkrankungen*, M. Kreuter, U. Costabel, F. Herth and D. Kirsten, Eds. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 127–141. DOI=10.1007/978-3-662-48419-7\_11.
- [166] Haies, D. M., Gil, J., and Weibel, E. R. 1981. Morphometric study of rat lung cells. I. Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell population. *The American review of respiratory disease* 123, 5, 533–541.
- [167] Haim, Y., Blüher, M., Konrad, D., Goldstein, N., Klötting, N., Harman-Boehm, I., Kirshtein, B., Ginsberg, D., Tarnovscki, T., Gepner, Y., Shai, I., and Rudich, A. 2017. ASK1 (MAP3K5) is transcriptionally upregulated by E2F1 in adipose tissue in obesity, molecularly defining a human dys-metabolic obese phenotype. *Molecular Metabolism* 6, 7, 725–736.
- [168] Hamada, N., Kuwano, K., Yamada, M., Hagimoto, N., Hiasa, K., Egashira, K., Nakashima, N., Maeyama, T., Yoshimi, M., and Nakanishi, Y. 2005. Anti-

- vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 2, 1224–1231.
- [169] Hamma, T., Reichow, S. L., Varani, G., and Ferré-D'Amaré, A. R. 2005. The Cbf5-Nop10 complex is a molecular bracket that organizes box H/ACA RNPs. *Nature structural & molecular biology* 12, 12, 1101–1107.
- [170] Hao, L.-Y., Strong, M. A., and Greider, C. W. 2004. Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 279, 43, 45148–45154.
- [171] Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. 2000. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, Vol 6, 1099–1108.
- [172] Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. 2000. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 6, 5, 1099–1108.
- [173] Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 6716, 271–274.
- [174] Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., and Ron, D. 2003. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11, 3, 619–633.
- [175] Harijith, A., Natarajan, V., and Fu, P. 2017. The Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Lung Architecture Remodeling. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6, 4.
- [176] Hashimoto, Y., Kobayashi, A., Yamazaki, N., Sugawara, Y., Takada, Y., and Takada, A. 1987. Relationship between age and plasma t-PA, PA-inhibitor, and PA activity. *Thrombosis Research* 46, 5, 625–633.
- [177] Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H., and Onozaki, K. 2003. C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Letters* 541, 1-3, 33–39.
- [178] Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K., and Ichijo, H. 2012. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 88, 8, 434–453.
- [179] HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 3, 585–621.
- [180] He, B., Zhang, W., Qiao, J., Peng, Z., and Chai, X. 2019. Melatonin protects against COPD by attenuating apoptosis and endoplasmic reticulum stress via upregulating SIRT1 expression in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 97, 5, 386–391.
- [181] He, H., Multani, A. S., Cosme-Blanco, W., Tahara, H., Ma, J., Pathak, S., Deng, Y., and Chang, S. 2006. POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. *The EMBO Journal* 25, 21, 5180–5190.
- [182] Heather P. Harding, Yuhong Zhang, Anne Bertolotti, Huiqing Zeng, and David Ron. 2000. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*, Vol. 5, 897–904.
- [183] Hecker, L., Vittal, R., Jones, T., Jagirdar, R., Luckhardt, T. R., Horowitz, J. C., Pennathur, S., Martinez, F. J., and Thannickal, V. J. 2009. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nature medicine* 15, 9, 1077–1081.

- [184] Heiss, N. S., Knight, S. W., Vulliamy, T. J., Klauck, S. M., Wiemann, S., Mason, P. J., Poustka, A., and Dokal, I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nature genetics* 19, 1, 32–38.
- [185] Heldin, C. H., Miyazono, K., and Dijke, P. ten. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 6659, 465–471.
- [186] Hemmerich, W. A. 2025. *Rechner zur Adjustierung des  $\alpha$ -Niveaus* / *StatistikGuru.de*. <https://statistikguru.de/rechner/adjustierung-des-alphaniveaus.html>. Accessed 28 February 2025.
- [187] Herranz, N. and Gil, J. 2018. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 128, 4, 1238–1246.
- [188] Hickey, K. A., Rubanyi, G., Paul, R. J., and Highsmith, R. F. 1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *The American journal of physiology* 248, 5 Pt 1, C550-6.
- [189] Hiyama, E. and Hiyama, K. 2007. Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer* 96, 7, 1020–1024.
- [190] Hocher, B., Schwarz, A., Fagan, K. A., Thöne-Reineke, C., El-Hag, K., Kusserow, H., Elitok, S., Bauer, C., Neumayer, H. H., Rodman, D. M., and Theuring, F. 2000. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23, 1, 19–26.
- [191] Hockemeyer, D., Daniels, J.-P., Takai, H., and Lange, T. de. 2006. Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 1, 63–77.
- [192] Hoffman, T. W., van der Vis, J. J., van der Smagt, J. J., Massink, M. P. G., Grutters, J. C., and van Moorsel, C. H. M. 2019. Pulmonary fibrosis linked to variants in the ACD gene, encoding the telomere protein TPP1. *European Respiratory Journal* 54, 6.
- [193] Hoffman, T. W., van der Vis, J. J., van Oosterhout, M. F. M., van Es, H. W., van Kessel, D. A., Grutters, J. C., and van Moorsel, C. H. M. 2016. TINF2 Gene Mutation in a Patient with Pulmonary Fibrosis. *Case reports in pulmonology* 2016, 1310862.
- [194] 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, 3, 323–331.
- [195] Holohan, B., Wright, W. E., and Shay, J. W. 2014. Telomeropathies: An emerging spectrum disorder. *The Journal of Cell Biology*, 205(3), 289-299. *The Journal of Cell Biology* 205, 3, 289–299.
- [196] Horan, G. S., Wood, S., Ona, V., Li, D. J., Lukashev, M. E., Weinreb, P. H., Simon, K. J., Hahm, K., Allaire, N. E., Rinaldi, N. J., Goyal, J., Feghali-Bostwick, C. A., Matteson, E. L., O'Hara, C., Lafyatis, R., Davis, G. S., Huang, X., Sheppard, D., and Violette, S. M. 2008. Partial inhibition of integrin  $\alpha(v)\beta6$  prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177, 1, 56–65.
- [197] Horinouchi, T., Terada, K., Higashi, T., and Miwa, S. 2013. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *Journal of pharmacological sciences* 123, 2, 85–101.
- [198] Hosokawa, N., You, Z., Tremblay, L. O., Nagata, K., and Herscovics, A. 2007. Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong  $\alpha1$ -antitrypsin by Golgi  $\alpha1,2$ -mannosidases. *Biochemical and biophysical research communications* 362, 3, 626–632.

- [199] 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, 89.
- [200] Hu, K., Lin, L., Tan, X., Yang, J., Bu, G., Mars, W. M., and Liu, Y. 2008. tPA protects renal interstitial fibroblasts and myofibroblasts from apoptosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19, 3, 503–514.
- [201] Hu, K., Yang, J., Tanaka, S., Gonias, S. L., Mars, W. M., and Liu, Y. 2006. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4, 2120–2127.
- [202] Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R., and McKeever, T. 2015. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *European Respiratory Journal* 46, 3, 795–806.
- [203] Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P. ten, Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)* 275, 5296, 90–94.
- [204] Ikeda, K., Clark, J. C., Shaw-White, J. R., Stahlman, M. T., Boutell, C. J., and Whitsett, J. A. 1995. Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 14, 8108–8114.
- [205] Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nature cell biology* 3, 2, 158–164.
- [206] Iwawaki 2009 Function of IRE1 alpha in the placenta.
- [207] Iyer, S. N., Gurujeyalakshmi, G., and Giri, S. N. 1999. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289, 1, 211–218.
- [208] Iyer, S. N., Gurujeyalakshmi, G., and Giri, S. N. 1999. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291, 1, 367–373.
- [209] Jackson, S.-R., Lee, J., Reddy, R., Williams, G. N., Kikuchi, A., Freiberg, Y., Warburton, D., and Driscoll, B. 2011. Partial pneumectomy of telomerase null mice carrying shortened telomeres initiates cell growth arrest resulting in a limited compensatory growth response. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 300, 6, L898-909.
- [210] Jain, A., Olovsson, M., Burton, G. J., and Yung, H. 2012. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP(3) pathway: implications for placental pathophysiology in preeclampsia. *The American journal of pathology* 180, 6, 2309–2320.
- [211] Jain, R., Shaul, P. W., Borok, Z., and Willis, B. C. 2007. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 37, 1, 38–47.
- [212] Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., Cho, M.-H., Park, G.-H., and Lee, K.-H. 2007. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Experimental & molecular medicine* 39, 1, 8–13.

- [213] Ji, J., Hou, J., Xia, Y., Xiang, Z., and Han, X. 2021. NLRP3 inflammasome activation in alveolar epithelial cells promotes myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells during pulmonary fibrogenesis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1867, 5, 166077.
- [214] Jiang, C., Liu, G., Cai, L., Deshane, J., Antony, V., Thannickal, V. J., and Liu, R.-M. 2021. Divergent Regulation of Alveolar Type 2 Cell and Fibroblast Apoptosis by Plasminogen Activator Inhibitor 1 in Lung Fibrosis. *The American journal of pathology* 191, 7, 1227–1239.
- [215] Jiang, C., Liu, G., Luckhardt, T., Antony, V., Zhou, Y., Carter, A. B., Thannickal, V. J., and Liu, R.-M. 2017. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell* 16, 5, 1114–1124.
- [216] Jun, J.-I. and Lau, L. F. 2017. CCN2 induces cellular senescence in fibroblasts. *Journal of cell communication and signaling* 11, 1, 15–23.
- [217] Kaewtunjai, N., Wongpoomchai, R., Imsumran, A., Pompimon, W., Athipornchai, A., Suksamrarn, A., Lee, T. R., and Tuntiwechapikul, W. 2018. Ginger Extract Promotes Telomere Shortening and Cellular Senescence in A549 Lung Cancer Cells. *ACS omega* 3, 12, 18572–18581.
- [218] Kahaleh, M. B. 1991. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis and rheumatism* 34, 8, 978–983.
- [219] Kanagaki, S., Suezawa, T., Moriguchi, K., Nakao, K., Toyomoto, M., Yamamoto, Y., Murakami, K., Hagiwara, M., and Gotoh, S. 2021. Hydroxypropyl Cyclodextrin Improves Amiodarone-induced Aberrant Lipid Homeostasis of Alveolar Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 64, 4, 504–514.
- [220] Kaneko, M., Niinuma, Y., and Nomura, Y. 2003. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biological & pharmaceutical bulletin* 26, 7, 931–935.
- [221] Kang, J., Ferguson, D., Song, H., Bassing, C., Eckersdorff, M., Alt, F. W., and Xu, Y. 2005. Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. *Molecular and cellular biology* 25, 2, 661–670.
- [222] Kannengiesser, C., Borie, R., Ménard, C., Réocreux, M., Nitschké, P., Gazal, S., Mal, H., Taillé, C., Cadranel, J., Nunes, H., Valeyre, D., Cordier, J. F., Callebaut, I., Boileau, C., Cottin, V., Grandchamp, B., Revy, P., and Crestani, B. 2015. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 46, 2, 474–485.
- [223] Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O. K., Bakkenist, C., Kastan, M. B., Petrini, J. H. J., and Lange, T. de. 2004. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLOS Biology* 2, 8, E240.
- [224] Kaspar, R. L. and Gehrke, L. 1994. Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 beta mRNA show unequal IL-1 beta protein accumulation but similar polyribosome profiles. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153, 1, 277–286.
- [225] Kathleen Collins and James R Mitchell. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21, 4, 564–579.

- [226] Kaul, Z., Cesare, A. J., Huschtscha, L. I., Neumann, A. A., and Reddel, R. R. 2011. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO reports*, 13(1), 52-59. *EMBO reports* 13, 1, 52–59.
- [227] Kawano, M., Miyamoto, K., Kaito, Y., Sumimoto, H., and Tamura, M. 2012. Noxa1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics* 519, 1, 1–7.
- [228] Kelich, J., Aramburu, T., van der Vis, J. J., Showe, L., Kossenkov, A., van der Smagt, J., Massink, M., Schoemaker, A., Hennekam, E., Veltkamp, M., van Moorsel, C. H. M., and Skordalakes, E. 2022. Telomere dysfunction implicates POT1 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 219, 5.
- [229] Khubchandani, K. R. and Snyder, J. M. 2001. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1, 59–69.
- [230] Kikuchi, N., Ishii, Y., Morishima, Y., Yageta, Y., Haraguchi, N., Yamadori, T., Masuko, H., Sakamoto, T., Yanagawa, T., Warabi, E., Ishii, T., and Hizawa, N. 2011. Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45, 3, 600–609.
- [231] Kim, J.-K., Liu, J., Hu, X., Yu, C., Roskamp, K., Sankaran, B., Huang, L., Komives, E. A., and Qiao, F. 2017. Structural Basis for Shelterin Bridge Assembly. *Molecular Cell* 68, 4, 698-714.e5.
- [232] Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., Sheppard, D., and Chapman, H. A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 35, 13180–13185.
- [233] Kim, K.-H., Park, G.-T., Lim, Y.-B., Rue, S.-W., Jung, J.-C., Sonn, J.-K., Bae, Y.-S., Park, J.-W., and Lee, Y.-S. 2004. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 318, 4, 819–825.
- [234] Kim, M. K., Kang, M. R., Nam, H. W., Bae, Y.-S., Kim, Y. S., and Chung, I. K. 2008. Regulation of telomeric repeat binding factor 1 binding to telomeres by casein kinase 2-mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 20, 14144–14152.
- [235] Kim, S., Joe, Y., Jeong, S. O., Zheng, M., Back, S. H., Park, S. W., Ryter, S. W., and Chung, H. T. 2014. Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 $\beta$  production via activation of the NF- $\kappa$ B and inflammasome pathways. *Innate immunity* 20, 8, 799–815.
- [236] Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature genetics* 23, 4, 405–412.
- [237] Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., Lai, T.-P., Zhang, N., Wright, W. E., and Shay, J. W. 2016. Regulation of the Human Telomerase Gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLOS Biology* 14, 12, e2000016.
- [238] King, T. E., Pardo, A., and Selman, M. 2011. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* 378, 9807, 1949–1961.
- [239] Kinnula, V. L., Lehtonen, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Lakari, E., Pääkkö, P., Kang, S. W., Rhee, S. G., and Soini, Y. 2002. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 57, 2, 157–164.

- [240] Kitowska, K., Zakrzewicz, D., Königshoff, M., Chrobak, I., Grimminger, F., Seeger, W., Bulau, P., and Eickelberg, O. 2008. Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294, 1, L34-45.
- [241] Klingberg, F., Hinz, B., and White, E. S. 2013. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology* 229, 2, 298–309.
- [242] Kojima, H., Kunimoto, H., Inoue, T., and Nakajima, K. 2014. Interleukin-6 Induces Premature Senescence Involving Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 5. In *Tumor dormancy and cellular quiescence and senescence*, M. A. Hayat, Ed. Springer, Dordrecht [u.a.], 53–60. DOI=10.1007/978-94-007-7726-2\_6.
- [243] Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F., and Gauldie, J. 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107, 12, 1529–1536.
- [244] Korfei, M., Beck, D. von der, Henneke, I., Markart, P., Ruppert, C., Mahavadi, P., Ghanim, B., Klepetko, W., Fink, L., Meiners, S., Krämer, O. H., Seeger, W., Vancheri, C., and Guenther, A. 2013. Comparative proteome analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and organ donors. *Journal of Proteomics* 85, 109–128.
- [245] Korfei, M., Ruppert, C., Loeh, B., Mahavadi, P., and Guenther, A. 2016. The role of Endoplasmic Reticulum (ER) stress in pulmonary fibrosis. *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases* 3, 1, 243.
- [246] Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.-M., Seeger, W., Weaver, T. E., and Guenther, A. 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178, 8, 838–846.
- [247] Korfhagen, T. R., Bruno, M. D., Ross, G. F., Huelsman, K. M., Ikegami, M., Jobe, A. H., Wert, S. E., Stripp, B. R., Morris, R. E., Glasser, S. W., Bachurski, C. J., Iwamoto, H. S., and Whitsett, J. A. 1996. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 18, 9594–9599.
- [248] Kostura, M. J., Tocci, M. J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A. G., Chartrain, N. A., and Schmidt, J. A. 1989. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 14, 5227–5231.
- [249] Kotani, I., Sato, A., Hayakawa, H., Urano, T., Takada, Y., and Takada, A. 1995. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thrombosis Research* 77, 6, 493–504.
- [250] Kotorashvili, A., Mulugeta, S., Guttentag, S., and Beers, M. F. 042009. Pepsinogen C Is a Candidate Protease for Post-Translational Processing of Surfactant Protein C. In *D106. SURFACTANT AND COLLECTINS STRUCTURE AND FUNCTION: INSIGHTS INTO DISEASE MECHANISMS*. American Thoracic Society, A6265. DOI=10.1164/ajrcm-conference.2009.179.1\_MeetingAbstracts.A6265.
- [251] Kozlov, G. and Gehring, K. 2020. Calnexin cycle - structural features of the ER chaperone system. *The FEBS journal* 287, 20, 4322–4340.
- [252] Kropski, J. A., Mitchell, D. B., Markin, C., Polosukhin, V. V., Choi, L., Johnson, J. E., Lawson, W. E., Phillips, J. A., Cogan, J. D., Blackwell, T. S., and Loyd, J.

- E. 2014. A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest* 146, 1, e1-e7.
- [253] Kubota, S. and Takigawa, M. 2015. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)* 128, 3, 181–196.
- [254] Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, S., Sengupta, S., Kaur, A., and Bachhawat, A. K. 2012. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO reports* 13, 12, 1095–1101.
- [255] Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 3-4, 203–209.
- [256] La Fuente, J. de and Dokal, I. 2007. Dyskeratosis congenita: Advances in the understanding of the telomerase defect and the role of stem cell transplantation. *Pediatric Transplantation*, 11(6), 584-594. *Pediatric Transplantation* 11, 6, 584–594.
- [257] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259, 680–685.
- [258] Lam, M., Marsters, S. A., Ashkenazi, A., and Walter, P. 2020. Misfolded proteins bind and activate death receptor 5 to trigger apoptosis during unresolved endoplasmic reticulum stress. *eLife* 9.
- [259] Lancaster, L., Cottin, V., Ramaswamy, M., Wuyts, W. A., Jenkins, R. G., Scholand, M. B., Kreuter, M., Valenzuela, C., Ryerson, C. J., Goldin, J., Kim, G. H. J., Jurek, M., Decaris, M., Clark, A., Turner, S., Barnes, C. N., Achneck, H. E., Cosgrove, G. P., Lefebvre, É. A., Flaherty, K. R., Baratz, D., Ettinger, N., Layish, D., Epstein, M. D., Veeraraghavan, S., Golden, J., Bascom, R., Case, A., Zaman, T., Betensley, A., Antin-Ozerkis, D., Montessi, S., Fernandez, E., Boente, R., Sager, J., Hunninghake, G., Gibson, K., Srour, N., Dhar, A., Wuyts, W., Wielders, P., Veltkamp, M., Mostard, R., Janssen, R., Noordegraaf, A. V., Glaspole, I., Corte, T., Beckert, L., Brockway, B., Veale, A., Richeldi, L., and Harari, S. 2024. Bexotegrast in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The INTEGRIS-IPF Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 210, 4, 424–434.
- [260] Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.-M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *The EMBO Journal* 21, 10, 2383–2396.
- [261] Lasithiotaki, I., Giannarakis, I., Tsitoura, E., Samara, K. D., Margaritopoulos, G. A., Choulaki, C., Vasarmidi, E., Tzanakis, N., Voloudaki, A., Sidiropoulos, P., Siafakas, N. M., and Antoniou, K. M. 2016. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung. *The European respiratory journal* 47, 3, 910–918.
- [262] Lasky, J. A., Ortiz, L. A., Tonthat, B., Hoyle, G. W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A., and Friedman, M. 1998. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *The American journal of physiology* 275, 2, L365-71.
- [263] Lawson, W. E., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Xu, X. C., Newcomb, D. C., Jones, B. R., Roldan, J., Lane, K. B., Morrissey, E. E., Beers, M. F., Yull, F. E., and Blackwell, T. S. 2011. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 26, 10562–10567.

- [264] Lee, A. S. 1987. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences* 12, 20–23.
- [265] Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., and Glimcher, L. H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 23, 21, 7448–7459.
- [266] Lee, J., Reddy, R., Barsky, L., Scholes, J., Chen, H., Shi, W., and Driscoll, B. 2009. Lung alveolar integrity is compromised by telomere shortening in telomerase-null mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 296, 1, L57-70.
- [267] Lee, K. Y. 2019. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng* 2, 1, 1–5.
- [268] Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., and Derynck, R. 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO Journal* 26, 17, 3957–3967.
- [269] Lenz, A. G., Costabel, U., and Maier, K. L. 1996. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *The European respiratory journal* 9, 2, 307–312.
- [270] Lerner, A. G., Upton, J.-P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A., and Papa, F. R. 2012. IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metabolism* 16, 2, 250–264.
- [271] Leslie, K. O. 2012. Idiopathic pulmonary fibrosis may be a disease of recurrent, tractional injury to the periphery of the aging lung: a unifying hypothesis regarding etiology and pathogenesis. *Archives of pathology & laboratory medicine* 136, 6, 591–600.
- [272] Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., and Shacter, E. 1994. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology*, L. Packer, Ed. Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego, London, 346–357. DOI=10.1016/S0076-6879(94)33040-9.
- [273] LeVine, A. M., Bruno, M. D., Huelsman, K. M., Ross, G. F., Whitsett, J. A., and Korfhagen, T. R. 1997. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158, 9, 4336–4340.
- [274] LeVine, A. M., Gwozdz, J., Stark, J., Bruno, M., Whitsett, J., and Korfhagen, T. 1999. Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* 103, 7, 1015–1021.
- [275] Ley, B. and Collard, H. R. 2013. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical epidemiology* 5, 483–492.
- [276] Li, Q., Harraz, M. M., Zhou, W., Zhang, L. N., Ding, W., Zhang, Y., Eggleston, T., Yeaman, C., Banfi, B., and Engelhardt, J. F. 2006. Nox2 and Rac1 Regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dependent Recruitment of TRAF6 to Endosomal Interleukin-1 Receptor Complexes. *Molecular and cellular biology* 26, 1, 140–154.
- [277] Liang, H., Xu, C., Pan, Z., Zhang, Y., Xu, Z., Chen, Y., Li, T., Li, X., Liu, Y., Huangfu, L., Lu, Y., Zhang, Z., Yang, B., Gitau, S., Lu, Y., Shan, H., and Du, Z. 2014. The antifibrotic effects and mechanisms of microRNA-26a action in idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22, 6, 1122–1133.

- [278] Libermann, T. A. and Baltimore, D. 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and cellular biology* 10, 5, 2327–2334.
- [279] Lin, S., Na, C. L., Akinbi, H. T., Apsley, K. S., Whitsett, J. A., and Weaver, T. E. 1999. Surfactant protein B (SP-B) *-/-* mice are rescued by restoration of SP-B expression in alveolar type II cells but not Clara cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 27, 19168–19174.
- [280] Liu, G., Park, S.-H., Imbesi, M., Nathan, W. J., Zou, X., Zhu, Y., Jiang, H., Parisiadou, L., and Gius, D. 2017. Loss of NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-2 Alters Mitochondrial Protein Acetylation and Dysregulates Mitophagy. *Antioxidants & redox signaling* 26, 15, 849–863.
- [281] Liu, J., Huang, K., Cai, G.-Y., Chen, X.-M., Yang, J.-R., Lin, L.-R., Yang, J., Huo, B.-G., Zhan, J., and He, Y.-N. 2014. Receptor for advanced glycation end-products promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling. *Cellular signalling* 26, 1, 110–121.
- [282] Liu, L., Qin, J., Guo, T., Chen, P., Ouyang, R., Peng, H., and Luo, H. 2020. Identification and functional characterization of a novel surfactant protein A2 mutation (p.N207Y) in a Chinese family with idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 8, 9, e1393.
- [283] Liu, S.-C., Hsu, C.-J., Chen, H.-T., Tsou, H.-K., Chuang, S.-M., and Tang, C.-H. 2012. CTGF increases IL-6 expression in human synovial fibroblasts through integrin-dependent signaling pathway. *PLOS ONE* 7, 12, e51097.
- [284] Liu, Y.-Y., Shi, Y., Liu, Y., Pan, X.-H., and Zhang, K.-X. 2018. Telomere shortening activates TGF- $\beta$ /Smads signaling in lungs and enhances both lipopolysaccharide and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Acta pharmacologica Sinica* 39, 11, 1735–1745.
- [285] Lu, M., Lawrence, D. A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A. S., Paton, A. W., Paton, J. C., Walter, P., and Ashkenazi, A. 2014. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* 345, 6192, 98–101.
- [286] Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S.-I., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. 2001. Negative Control of p53 by Sir2 $\alpha$  Promotes Cell Survival under Stress. *Cell* 107, 2, 137–148.
- [287] Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S. F., and Lee, A. S. 2003. Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *Journal of Biological Chemistry* 278, 39, 37375–37385.
- [288] M. Korfei, C. Ruppert, P. Mahavadi, M. Koch, and H. Witt. 2007. Abnormal accumulation of unprocessed surfactant protein (SP)-B and activation of the ER stress pathway in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP). *The American review of respiratory disease* 175, A735.
- [289] MacIsaac, S., Somboonviboon, D., Scallan, C., and Kolb, M. 2024. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an update on emerging drugs in phase II & III clinical trials. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 29, 2, 177–186.
- [290] MacNeil, D. E., Lambert-Lanteigne, P., Qin, J., McManus, F. P., Bonneil, E., Thibault, P., and Autexier, C. 2021. SUMOylation- and GAR1-Dependent Regulation of Dyskerin Nuclear and Subnuclear Localization. *Molecular and cellular biology* 41, 4.

- [291] Maher, T. M., Evans, I. C., Bottoms, S. E., Mercer, P. F., Thorley, A. J., Nicholson, A. G., Laurent, G. J., Tetley, T. D., Chambers, R. C., and McAnulty, R. J. 2010. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, 1, 73–82.
- [292] 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, 29, 22103–22113.
- [293] Malhotra, J. D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S. W., and Kaufman, R. J. 2008. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 47, 18525–18530.
- [294] Malik, A. and Kanneganti, T.-D. 2017. Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of cell science* 130, 23, 3955–3963.
- [295] Mandal, M., Olson, D. J., Sharma, T., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. 2001. Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 120, 1, 71–78.
- [296] Marcand, S., Gilson, E., and Shore, D. 1997. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 275, 5302, 986–990.
- [297] Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., and Ron, D. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* 18, 24, 3066–3077.
- [298] Marmai, C., Sutherland, R. E., Kim, K. K., Dolganov, G. M., Fang, X., Kim, S. S., Jiang, S., Golden, J. A., Hoopes, C. W., Matthay, M. A., Chapman, H. A., and Wolters, P. J. 2011. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 301, 1, L71-8.
- [299] Martino, M. B., Jones, L., Brighton, B., Ehre, C., Abdulah, L., Davis, C. W., Ron, D., O'Neal, W. K., and Ribeiro, C. M. P. 2013. The ER stress transducer IRE1 $\beta$  is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal immunology* 6, 3, 639–654.
- [300] Masi, S., Colucci, R., Duranti, E., Nannipieri, M., Anselmino, M., Ippolito, C., Tirota, E., Georgiopoulos, G., Garelli, F., Nericcio, A., Segnani, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Taddei, S., and Virdis, A. 2018. Aging Modulates the Influence of Arginase on Endothelial Dysfunction in Obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38, 10, 2474–2483.
- [301] Matos, L., Gouveia, A. M., and Almeida, H. 2015. ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 70, 8, 924–935.
- [302] Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D. M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., and Akira, S. 2009. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 458, 7242, 1185–1190.
- [303] Maundrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J.-C., and Arkinstall, S. 1997. Bcl-2 Undergoes Phosphorylation by c-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinases in the Presence of the Constitutively Active GTP-binding Protein Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 272, 40, 25238–25242.

- [304] Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., and Gerlo, S. 2014. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences* 39, 5, 245–254.
- [305] McConnell, B. B., Gregory, F. J., Stott, F. J., Hara, E., and Peters, G. 1999. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Molecular and cellular biology* 19, 3, 1981–1989.
- [306] 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, 4, 1249–1259.
- [307] Meares, G. P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S. E., Mobley, J. A., Corbett, J. A., and Benveniste, E. N. 2014. PERK-dependent activation of JAK1 and STAT3 contributes to endoplasmic reticulum stress-induced inflammation. *Molecular and cellular biology* 34, 20, 3911–3925.
- [308] Mellier, G., Huang, S., Shenoy, K., and Pervaiz, S. 2010. TRAILing death in cancer. *Molecular aspects of medicine* 31, 1, 93–112.
- [309] Mender, I. and Shay, J. W. 2015. Telomere Restriction Fragment (TRF) Analysis. *Bio-protocol* 5, 22.
- [310] Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., and Tschopp, J. 2012. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis* 3, e261.
- [311] Mercer, P. F., Johns, R. H., Scotton, C. J., Krupiczkoj, M. A., Königshoff, M., Howell, D. C. J., McAnulty, R. J., Das, A., Thorley, A. J., Tetley, T. D., Eickelberg, O., and Chambers, R. C. 2009. Pulmonary epithelium is a prominent source of proteinase-activated receptor-1-inducible CCL2 in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179, 5, 414–425.
- [312] Metka Lenassi and Ana Plemenitaš. 2006. The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis. *RO* 40, 1.
- [313] Mills, C. D. 2015. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology* 6, 212.
- [314] Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., and Hill, A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164, 12, 6166–6173.
- [315] Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., Kawaishi, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S. L., Nakayama, K., and Kuwano, K. 2011. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- $\beta$ -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 300, 3, L391-401.
- [316] Mitchell, J. R., Wood, E., and Collins, K. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 6761, 551–555.
- [317] Molyneaux, P. L., Cox, M. J., Willis-Owen, S. A. G., Mallia, P., Russell, K. E., Russell, A.-M., Murphy, E., Johnston, S. L., Schwartz, D. A., Wells, A. U., Cookson, W. O. C., Maher, T. M., and Moffatt, M. F. 2014. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 190, 8, 906–913.
- [318] Moore, B. B. and Moore, T. A. 2015. Viruses in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Etiology and Exacerbation. *Annals of the American Thoracic Society* 12 Suppl 2, Suppl 2, S186-92.

- [319] Mora, A. L., Torres-González, E., Rojas, M., Corredor, C., Ritzenthaler, J., Xu, J., Roman, J., Brigham, K., and Stecenko, A. 2006. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35, 4, 466–473.
- [320] Moretto, J., Girard, C., and Demougeot, C. 2019. The role of arginase in aging: A systematic review. *Experimental gerontology* 116, 54–73.
- [321] Morin, G. B. 1991. Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. *Nature* 353, 6343, 454–456.
- [322] Motz, K., Lina, I., Murphy, M. K., Drake, V., Davis, R., Tsai, H.-W., Feeley, M., Yin, L. X., Ding, D., and Hillel, A. 2021. M2 Macrophages Promote Collagen Expression and Synthesis in Laryngotracheal Stenosis Fibroblasts. *The Laryngoscope* 131, 2, E346-E353.
- [323] Mukherjee, S., Giamberardino, C., Thomas, J., Evans, K., Goto, H., Ledford, J. G., Hsia, B., Pastva, A. M., and Wright, J. R. 2012. Surfactant protein A integrates activation signal strength to differentially modulate T cell proliferation. *The Journal of Immunology* 188, 3, 957–967.
- [324] Mulugeta, S., Maguire, J. A., Newitt, J. L., Russo, S. J., Kotorashvili, A., and Beers, M. F. 2007. Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293, 3, L720-9.
- [325] Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M., and Beers, M. F. 2005. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 6, 521–530.
- [326] Munder, M., Eichmann, K., and Modolell, M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160, 11, 5347–5354.
- [327] Munger, J. S., Harpel, J. G., Giancotti, F. G., and Rifkin, D. B. 1998. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1. *Molecular biology of the cell* 9, 9, 2627–2638.
- [328] Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., and Sheppard, D. 1999. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin  $\alpha v \beta 6$  Binds and Activates Latent TGF  $\beta 1$ . *Cell* 96, 3, 319–328.
- [329] Murray, L. A., Habel, D. M., Hohmann, M., Camelo, A., Shang, H., Zhou, Y., Coelho, A. L., Peng, X., Gulati, M., Crestani, B., Sleeman, M. A., Mustelin, T., Moore, M. W., Ryu, C., Osafo-Addo, A. D., Elias, J. A., Lee, C. G., Hu, B., Herazo-Maya, J. D., Knight, D. A., Hogaboam, C. M., and Herzog, E. L. 2017. Antifibrotic role of vascular endothelial growth factor in pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 2, 16.
- [330] Nadav, E., Shmueli, A., Barr, H., Gonen, H., Ciechanover, A., and Reiss, Y. 2003. A novel mammalian endoplasmic reticulum ubiquitin ligase homologous to the yeast Hrd1. *Biochemical and biophysical research communications* 303, 1, 91–97.
- [331] Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., and Dijke, P. ten. 1997. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO Journal* 16, 17, 5353–5362.

- [332] Nakazato, H., Oku, H., Yamane, S., Tsuruta, Y., and Suzuki, R. 2002. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$  at the translational level. *European Journal of Pharmacology* 446, 1-3, 177–185.
- [333] Nakerakanti, S. and Trojanowska, M. 2012. The Role of TGF- $\beta$  Receptors in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal* 6, 156–162.
- [334] Nesselin, L. L., Melton, K. R., Ikegami, M., Na, C.-L., Wert, S. E., Rice, W. R., Whitsett, J. A., and Weaver, T. E. 2005. Partial SP-B deficiency perturbs lung function and causes air space abnormalities. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 288, 6, L1154-61.
- [335] Ng, Y.-S., Rohan, R., Sunday, M. E., deMello, D. E., and D'Amore, P. A. 2001. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev. Dyn.* 220, 2, 112–121.
- [336] Nho, R. S., Hergert, P., Kahm, J., Jessurun, J., and Henke, C. 2011. Pathological alteration of FoxO3a activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix. *The American journal of pathology* 179, 5, 2420–2430.
- [337] Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & development* 16, 11, 1345–1355.
- [338] Nisimoto, Y., Diebold, B. A., Cosentino-Gomes, D., Constantino-Gomes, D., and Lambeth, J. D. 2014. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry* 53, 31, 5111–5120.
- [339] Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Glassberg, M. K., Kardatzke, D., King, T. E., Lancaster, L., Sahn, S. A., Szwarzberg, J., Valeyre, D., and Du Bois, R. M. 2011. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *The Lancet* 377, 9779, 1760–1769.
- [340] Nobuhiko Kayagaki, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O'Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, Benjamin Haley, Merone Roose-Girma, Qui T. Phung, Peter S. Liu, Jennie R. Lill, Hong Li, Jiansheng Wu, Sarah Kummerfeld, Juan Zhang, Wyne P. Lee, Scott J. Snipas, Guy S. Salvesen, Lucy X. Morris, Linda Fitzgerald, Yafei Zhang, Edward M. Bertram, Christopher C. Goodnow, and Vishva M. Dixit. 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 7575, 666–671.
- [341] Nogee, L. M., Garnier, G., Dietz, H. C., Singer, L., Murphy, A. M., deMello, D. E., and Colten, H. R. 1994. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93, 4, 1860–1863.
- [342] Noguchi, T., Ishii, K., Fukutomi, H., Naguro, I., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. 2008. Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAPK pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12, 7657–7665.
- [343] Nureki, S.-I., Tomer, Y., Venosa, A., Katzen, J., Russo, S. J., Jamil, S., Barrett, M., Nguyen, V., Kopp, M., Mulugeta, S., and Beers, M. F. 2018. Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *J Clin Invest* 128, 9, 4008–4024.
- [344] Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S.-K., Hartlerode, A., Stegmüller, J., Hafner, A., Loerch, P., Wright, S. M., Mills, K. D., Bonni, A., Yankner, B. A., Scully, R., Prolla, T. A., Alt, F. W., and Sinclair, D. A. 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 5, 907–918.

- [345] Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. 2006. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *The Journal of Cell Biology* 172, 3, 383–393.
- [346] Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO Journal* 24, 6, 1243–1255.
- [347] Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., and Iwawaki, T. 2010. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 $\alpha$ . *Nucleic acids research* 38, 18, 6265–6273.
- [348] Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. 1988. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 141, 5, 1543–1549.
- [349] Okuda, K., Bardeguet, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Skurnick, J., Awad, G., and Aviv, A. 2002. Telomere length in the newborn. *Pediatric research* 52, 3, 377–381.
- [350] Olivari, S., Cali, T., Salo, K. E. H., Paganetti, P., Ruddock, L. W., and Molinari, M. 2006. EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 4, 1278–1284.
- [351] Olzmann, J. A., Kopito, R. R., and Christianson, J. C. 2013. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, 9.
- [352] Ono, S., Tanaka, T., Ishida, M., Kinoshita, A., Fukuoka, J., Takaki, M., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kohno, S., Hayashi, T., Senba, M., Yasunami, M., Kubo, Y., Yoshida, L. M., Kubo, H., Ariyoshi, K., Yoshiura, K., and Morimoto, K. 2011. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *European Respiratory Journal* 38, 4, 861–869.
- [353] O'Reilly, M. A., Weaver, T. E., Pilot-Matias, T. J., Sarin, V. K., Gazdar, A. F., and Whitsett, J. A. 1989. In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1011, 2-3, 140–148.
- [354] O'Reilly, S., Ciechomska, M., Cant, R., and van Laar, J. M. 2014. Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein. *J. Biol. Chem.* 289, 14, 9952–9960.
- [355] Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., and Campisi, J. 2009. Cell surface-bound IL-1 $\alpha$  is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 40, 17031–17036.
- [356] Oromendia, A. B., Dodgson, S. E., and Amon, A. 2012. Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes & development* 26, 24, 2696–2708.
- [357] Otto-Verberne, C. J., Have-Opbroek, A. A. ten, Willems, L. N., Franken, C., Kramps, J. A., and Dijkman, J. H. 1991. Lack of type II cells and emphysema in human lungs. *The European respiratory journal* 4, 3, 316–323.
- [358] Palacios, J. A., Herranz, D., Bonis, M. L. de, Velasco, S., Serrano, M., and Blasco, M. A. 2010. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *The Journal of Cell Biology* 191, 7, 1299–1313.

- [359] Pan, L. H., Yamauchi, K., Uzuki, M., Nakanishi, T., Takigawa, M., Inoue, H., and Sawai, T. 2001. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *The European respiratory journal* 17, 6, 1220–1227.
- [360] Pan, T., Zhou, Q., Miao, K., Zhang, L., Wu, G., Yu, J., Xu, Y., Xiong, W., Li, Y., and Wang, Y. 2021. Suppressing Sart1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: a promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis. *Theranostics* 11, 3, 1192–1206.
- [361] Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., and Zglinicki, T. von. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology* 6, 347.
- [362] Peacock, A. J., Dawes, K. E., Shock, A., Gray, A. J., Reeves, J. T., and Laurent, G. J. 1992. Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 7, 5, 492–499.
- [363] Peng, H., Yeh, F., Lin, J., Best, L. G., Cole, S. A., Lee, E. T., Howard, B. V., and Zhao, J. 2017. Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with leukocyte telomere length in American Indians: findings from the Strong Heart Family Study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 15, 6, 1078–1085.
- [364] Pérez-Rivero, G., Ruiz-Torres, M. P., Rivas-Elena, J. V., Jerkic, M., Díez-Marques, M. L., Lopez-Novoa, J. M., Blasco, M. A., and Rodríguez-Puyol, D. 2006. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation* 114, 4, 309–317.
- [365] Philipot, D., Guérit, D., Platano, D., Chuchana, P., Olivotto, E., Espinoza, F., Dorandeu, A., Pers, Y.-M., Piette, J., Borzi, R. M., Jorgensen, C., Noel, D., and Brondello, J.-M. 2014. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 16, 1, R58.
- [366] Povedano, J. M., Martinez, P., Flores, J. M., Mulero, F., and Blasco, M. A. 2015. Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Reports*, 12(2), 286-299. *Cell Reports* 12, 2, 286–299.
- [367] Povedano, J. M., Martinez, P., Serrano, R., Tejera, Á., Gómez-López, G., Bobadilla, M., Flores, J. M., Bosch, F., and Blasco, M. A. 2018. Therapeutic effects of telomerase in mice with pulmonary fibrosis induced by damage to the lungs and short telomeres. *eLife* 7.
- [368] Prola, A., Da Pires Silva, J., Guilbert, A., Lecru, L., Piquereau, J., Ribeiro, M., Mateo, P., Gressette, M., Fortin, D., Boursier, C., Gallerne, C., Caillard, A., Samuel, J.-L., François, H., Sinclair, D. A., Eid, P., Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Lemaire, C. 2017. SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 $\alpha$  deacetylation. *Cell Death Differ* 24, 2, 343–356.
- [369] Prowse, K. R. and Greider, C. W. 1995. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11, 4818–4822.
- [370] Psathakis, K., Mermigkis, D., Papatheodorou, G., Loukides, S., Panagou, P., Polychronopoulos, V., Siafakas, N. M., and Bouros, D. 2006. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Journal of Clinical Investigation* 36, 5, 362–367.
- [371] 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., Motoyama, N.,

- Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., and Strasser, A. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 7, 1337–1349.
- [372] 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., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D. M., Johkoh, T., Kim, D. S., King, T. E., Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N. L., Nicholson, A. G., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R. F., Griss, B. S., Protzko, S. L., and Schönemann, H. J. 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, 6, 788–824.
- [373] Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S. K., Morell, F., Flaherty, K. R., Wells, A., Martinez, F. J., Azuma, A., Bice, T. J., Bouros, D., Brown, K. K., Collard, H. R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R. G., Johkoh, T., Kazerooni, E. A., Kitaichi, M., Knight, S. L., Mansour, G., Nicholson, A. G., Pipavath, S. N. J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W. D., Walsh, S., and Wilson, K. C. 2018. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine* 198, 5, e44-e68.
- [374] Raghu, G., Rochweg, B., Zhang, Y., Garcia, C. A. C., Azuma, A., Behr, J., Brozek, J. L., Collard, H. R., Cunningham, W., Homma, S., Johkoh, T., Martinez, F. J., Myers, J., Protzko, S. L., Richeldi, L., Rind, D., Selman, M., Theodore, A., Wells, A. U., Hoogsteden, H., and Schönemann, H. J. 2015. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine* 192, 2, e3-19.
- [375] Rahman, I., Biswas, S. K., and Kode, A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* 533, 1-3, 222–239.
- [376] Rahman, S. and Islam, R. 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal* 9, 1, 11.
- [377] Rajavel, M., Mullins, M. R., and Taylor, D. J. 2014. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance. *Biochimica et biophysica acta* 1844, 9, 1550–1559.
- [378] Rajendrasozhan, S., Yang, S.-R., Kinnula, V. L., and Rahman, I. 2008. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177, 8, 861–870.
- [379] Ramazani, Y., Knops, N., Elmonem, M. A., Nguyen, T. Q., Arcolino, F. O., van den Heuvel, L., Levchenko, E., Kuypers, D., and Goldschmeding, R. 2018. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69, 44–66.
- [380] Rana, T., Jiang, C., Banerjee, S., Yi, N., Zmijewski, J. W., Liu, G., and Liu, R.-M. 2023. PAI-1 Regulation of p53 Expression and Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells. *Cells* 12, 15, 2008.
- [381] Rana, T., Jiang, C., Liu, G., Miyata, T., Antony, V., Thannickal, V. J., and Liu, R.-M. 2020. PAI-1 Regulation of TGF- $\beta$ 1-induced Alveolar Type II Cell Senescence, SASP Secretion, and SASP-mediated Activation of Alveolar Macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 62, 3, 319–330.

- [382] Rayess, H., Wang, M. B., and Srivatsan, E. S. 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 130, 8, 1715–1725.
- [383] Reaper, P. M., Di Fagagna, F. d., and Jackson, S. P. 2004. Activation of the DNA Damage Response by Telomere Attrition: A Passage to Cellular Senescence. *Cell Cycle* 3, 5, 541–544.
- [384] Redza-Dutordoir, M. and Averill-Bates, D. A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1863, 12, 2977–2992.
- [385] Reimertz, C., Kögel, D., Rami, A., Chittenden, T., and Prehn, J. H. M. 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *The Journal of Cell Biology* 162, 4, 587–597.
- [386] Ren, H., Birch, N. P., and Suresh, V. 2016. An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport. *PloS one* 11, 10, e0165225.
- [387] Renzoni, E., Srihari, V., and Sestini, P. 2014. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: review of recent findings. *F1000 Prime Reports* 6, 69.
- [388] Richeldi, L., Du Bois, R. M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K. K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K. R., Hansell, D. M., Inoue, Y., Kim, D. S., Kolb, M., Nicholson, A. G., Noble, P. W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Disse, B., and Collard, H. R. 2014. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 370, 22, 2071–2082.
- [389] Rock, J. R., Barkauskas, C. E., Cronic, M. J., Xue, Y., Harris, J. R., Liang, J., Noble, P. W., and Hogan, B. L. M. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 52, E1475-83.
- [390] Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., and Campisi, J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11, 8, 973–979.
- [391] Rodríguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M., and Lamas, S. 2003. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circulation research* 92, 12, 1288–1295.
- [392] Rojas, A., Padidam, M., Cress, D., and Grady, W. M. 2009. TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 7, 1165–1173.
- [393] Rottoli, P., Magi, B., Cianti, R., Bargagli, E., Vagaggini, C., Nikiforakis, N., Pallini, V., and Bini, L. 2005. Carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 5, 10, 2612–2618.
- [394] Rousseau, D., Cannella, D., Boulaire, J., Fitzgerald, P., Fotedar, A., and Fotedar, R. 1999. Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 18, 30, 4313–4325.
- [395] Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H.-W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., and DePinho, R. A. 1999. Longevity, Stress Response, and Cancer in Aging Telomerase-Deficient Mice. *Cell* 96, 5, 701–712.

- [396] Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. 2014. ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *The Journal of Cell Biology* 204, 6, 869–879.
- [397] Ryan, R. M., Mineo-Kuhn, M. M., Kramer, C. M., and Finkelstein, J. N. 1994. Growth factors alter neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *The American journal of physiology* 266, 1 Pt 1, L17-22.
- [398] Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F. L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J., Walkey, C., Maser, R. S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y. A., Shukla, S. A., Jaskelioff, M., Martin, E. S., Heffernan, T. P., Protopopov, A., Ivanova, E., Mahoney, J. E., Kost-Alimova, M., Perry, S. R., Bronson, R., Liao, R., Mulligan, R., Shirihai, O. S., Chin, L., and DePinho, R. A. 2011. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 7334, 359–365.
- [399] Saito, A., Horie, M., and Nagase, T. 2018. TGF- $\beta$  Signaling in Lung Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 19, 8.
- [400] Saito, F., Tasaka, S., Inoue, K.-I., Miyamoto, K., Nakano, Y., Ogawa, Y., Yamada, W., Shiraishi, Y., Hasegawa, N., Fujishima, S., Takano, H., and Ishizaka, A. 2008. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38, 5, 566–571.
- [401] Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal* 17, 9, 2596–2606.
- [402] Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 6303, 732–735.
- [403] Saleh, D., Furukawa, K., Tsao, M. S., Maghazachi, A., Corrin, B., Yanagisawa, M., Barnes, P. J., and Giaid, A. 1997. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 16, 2, 187–193.
- [404] Samper, E., Flores, J. M., and Blasco, M. A. 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in Terc<sup>-/-</sup> mice with short telomeres. *EMBO reports* 2, 9, 800–807.
- [405] Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D. L., Brooks, R. W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y. S., Tchkonja, T., Robbins, P. D., Aubry, M. C., Passos, J. F., Kirkland, J. L., Tschumperlin, D. J., Kita, H., and LeBrasseur, N. K. 2017. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nature Communications* 8, 14532.
- [406] Schmutz, I. and Lange, T. de. 2016. Shelterin. *Current biology : CB* 26, 10, R397-9.
- [407] Schremmer, B., Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. 2007. Peroxiredoxins in the lung with emphasis on peroxiredoxin VI. *Sub-cellular biochemistry* 44, 317–344.
- [408] Schröder, M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 6, 862–894.
- [409] Scotton, C. J., Krupiczkoj, M. A., Königshoff, M., Mercer, P. F., Lee, Y. C. G., Kaminski, N., Morser, J., Post, J. M., Maher, T. M., Nicholson, A. G., Moffatt, J. D., Laurent, G. J., Derian, C. K., Eickelberg, O., and Chambers, R. C. 2009.

- Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* 119, 9, 2550–2563.
- [410] Seimetz, M., Sommer, N., Bednorz, M., Pak, O., Veith, C., Hadzic, S., Gredic, M., Parajuli, N., Kojonazarov, B., Kraut, S., Wilhelm, J., Knoepp, F., Henneke, I., Pichl, A., Kanbagli, Z. I., Scheibe, S., Fysikopoulos, A., Wu, C.-Y., Klepetko, W., Jaksch, P., Eichstaedt, C., Grünig, E., Hinderhofer, K., Geiszt, M., Müller, N., Rezende, F., Buchmann, G., Wittig, I., Hecker, M., Hecker, A., Padberg, W., Dorfmueller, P., Gattenlöhner, S., Vogelmeier, C. F., Günther, A., Karnati, S., Baumgart-Vogt, E., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Seeger, W., Schröder, K., Grimminger, F., Brandes, R. P., and Weissmann, N. 2020. NADPH oxidase subunit NOXO1 is a target for emphysema treatment in COPD. *Nature metabolism* 2, 6, 532–546.
- [411] Selman, M., Carrillo, G., Estrada, A., Mejia, M., Becerril, C., Cisneros, J., Gaxiola, M., Pérez-Padilla, R., Navarro, C., Richards, T., Dauber, J., King, T. E., Pardo, A., and Kaminski, N. 2007. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PloS one* 2, 5, e482.
- [412] Selman, M. and Pardo, A. 2006. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 4, 364–372.
- [413] Seluanov, A., Chen, Z., Hine, C., Sasahara, T. H. C., Ribeiro, A. A. C. M., Catania, K. C., Presgraves, D. C., and Gorbunova, V. 2007. Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. *Aging Cell* 6, 1, 45–52.
- [414] Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, N.Y.)* 219, 4587, 983–985.
- [415] Senturk, S., Mumcuoglu, M., Gursoy-Yuzugullu, O., Cingoz, B., Akcali, K. C., and Ozturk, M. 2010. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52, 3, 966–974.
- [416] Sepulveda, D., Rojas-Rivera, D., Rodríguez, D. A., Groenendyk, J., Köhler, A., Lebeau-pin, C., Ito, S., Urrea, H., Carreras-Sureda, A., Hazari, Y., Vasseur-Cognet, M., Ali, M. M. U., Chevet, E., Campos, G., Godoy, P., Vaisar, T., Bailly-Maitre, B., Nagata, K., Michalak, M., Sierralta, J., and Hetz, C. 2018. Interactome Screening Identifies the ER Luminal Chaperone Hsp47 as a Regulator of the Unfolded Protein Response Transducer IRE1 $\alpha$ . *Molecular Cell* 69, 2, 238-252.e7.
- [417] Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L., and Lange, T. de. 2009. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 1, 90–103.
- [418] Shahar, I., Fireman, E., Topilsky, M., Grief, J., Schwarz, Y., Kivity, S., Ben-Efraim, S., and Spirer, Z. 1999. Effect of endothelin-1 on  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblasts proliferation in interstitial lung diseases. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 11, 759–775.
- [419] Shammas, M. A. 2011. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14, 1, 28–34.
- [420] Shang, D., Hong, Y., Xie, W., Tu, Z., and Xu, J. 2020. Interleukin-1 $\beta$  Drives Cellular Senescence of Rat Astrocytes Induced by Oligomerized Amyloid  $\beta$  Peptide and Oxidative Stress. *Frontiers in neurology* 11, 929.
- [421] Shay, J. W. and Bacchetti, S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 33, 5, 787–791.

- [422] Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D., and Funk, W. D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current Biology* 9, 17, 939–945.
- [423] Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. 2002. ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell* 3, 1, 99–111.
- [424] Sheng, G., Chen, P., Wei, Y., Yue, H., Chu, J., Zhao, J., Wang, Y., Zhang, W., and Zhang, H.-L. 2019. Viral Infection Increases the Risk of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Meta-Analysis. *Chest*.
- [425] Sherr, C. J. and DePinho, R. A. 2000. Cellular Senescence. *Cell* 102, 4, 407–410.
- [426] Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T. A. 2011. Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature* 474, 7351, 343–349.
- [427] Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. 1997. DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell* 91, 3, 325–334.
- [428] Shindo-Okada, N., Takeuchi, K., Han, B.-S., and Nagamachi, Y. 2002. Establishment of cell lines with high and low metastatic potential from A549 human lung adenocarcinoma. *Japanese journal of cancer research : Gann* 93, 1, 50–60.
- [429] Shulenin, S., Noguee, L. M., Annilo, T., Wert, S. E., Whitsett, J. A., and Dean, M. 2004. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 350, 13, 1296–1303.
- [430] Sillen, M. and Declerck, P. J. 2021. A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *International journal of molecular sciences* 22, 5, 2721.
- [431] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 1, 76–85.
- [432] Smith, S. and Lange, T. de. 2000. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Current Biology* 10, 20, 1299–1302.
- [433] Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and Lange, T. de. 2000. Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1659-1668. *Molecular and cellular biology* 20, 5, 1659–1668.
- [434] Song, J. W., Hong, S.-B., Lim, C.-M., Koh, Y., and Kim, D. S. 2011. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome. *The European respiratory journal* 37, 2, 356–363.
- [435] Sonnylal, S., Xu, S., Jones, H., Tam, A., Sreeram, V. R., Ponticos, M., Norman, J., Agrawal, P., Abraham, D., and Crombrughe, B. de. 2013. Connective tissue growth factor causes EMT-like cell fate changes in vivo and in vitro. *Journal of cell science* 126, Pt 10, 2164–2175.
- [436] Srinivas, N., Rachakonda, S., and Kumar, R. 2020. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers* 12, 3.
- [437] Statz, C., Meng, J., Venz, R., Bland, M., Robida-Stubbs, S., Patel, K., Petrovic, D., Emsley, R., Liu, P., Morantte, I., Haynes, C., Mair, W. B., Longchamp, A., Filipovic, M. R., Blackwell, T. K., and Ewald, C. Y. 2022. ATF-4 and hydrogen sulfide signalling mediate longevity in response to inhibition of translation or mTORC1. *Nat Commun* 13, 1, 967.
- [438] Stevenson, J., Huang, E. Y., and Olzmann, J. A. 2016. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annual review of nutrition* 36, 511–542.

- [439] Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R. K. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 17, 2122–2133.
- [440] Sundararaj, K. P., Wood, R. E., Ponnusamy, S., Salas, A. M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., and Ogretmen, B. 2004. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 7, 6152–6162.
- [441] Sundquist, W. I. and Klug, A. 1989. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 6251, 825–829.
- [442] Swigris, J. J. and Brown, K. K. 2010. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 24, 1, 49–54.
- [443] Synthego. 2022. *Everything You Need To Know About A549 Cells*. <https://www.synthego.com/a549-cells>. Accessed 5 July 2022.
- [444] Takahashi, N., Harada, M., Hirota, Y., Nose, E., Azhary, J. M., Koike, H., Kunitomi, C., Yoshino, O., Izumi, G., Hirata, T., Koga, K., Wada-Hiraike, O., Chang, R. J., Shimasaki, S., Fujii, T., and Osuga, Y. 2017. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep* 7, 1, 10824.
- [445] Takai, K. K., Kibe, T., Donigian, J. R., Frescas, D., and Lange, T. de. 2011. Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Molecular Cell* 44, 4, 647–659.
- [446] Takimoto, R. and El-Deiry, W. S. 2000. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* 19, 14, 1735–1743.
- [447] Tan, T. and Chu, G. 2002. p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Molecular and cellular biology* 22, 10, 3247–3254.
- [448] Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, 10, a016295.
- [449] Tang, X., Chen, X.-F., Wang, N.-Y., Wang, X.-M., Liang, S.-T., Zheng, W., Lu, Y.-B., Zhao, X., Hao, D.-L., Zhang, Z.-Q., Zou, M.-H., Liu, D.-P., and Chen, H.-Z. 2017. SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation* 136, 21, 2051–2067.
- [450] 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, 6, 2633–2640.
- [451] Tanjore, H., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Zoz, D. F., Abdolrasulnia, R., Lawson, W. E., and Blackwell, T. S. 2011. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* 286, 35, 30972–30980.
- [452] Teixeira, M., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. 2004. Telomere Length Homeostasis Is Achieved via a Switch between Telomerase-Extendible and -Nonextendible States. *Cell*, 117(3), 323–335. *Cell* 117, 3, 323–335.
- [453] Thomas, A. C. and Mattila, J. T. 2014. "Of mice and men": arginine metabolism in macrophages. *Frontiers in immunology* 5, 479.

- [454] Thomas, A. Q., Lane, K., Phillips, J., Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D. A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., Roberts, R., Haines, J., Stahlman, M., and Loyd, J. E. 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, 9, 1322–1328.
- [455] Thuerlauf, D. J., Marcinko, M., Belmont, P. J., and Glembotski, C. C. 2007. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *The Journal of biological chemistry* 282, 31, 22865–22878.
- [456] Timashev, L. A. and Lange, T. de. 2020. Characterization of t-loop formation by TRF2. *Nucleus (Austin, Tex.)* 11, 1, 164–177.
- [457] Tirasophon, W., Welihinda, A. A., and Kaufman, R. J. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & development* 12, 12, 1812–1824.
- [458] Tokieda, K., Whitsett, J. A., Clark, J. C., Weaver, T. E., Ikeda, K., McConnell, K. B., Jobe, A. H., Ikegami, M., and Iwamoto, H. S. 1997. Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *The American journal of physiology* 273, 4, L875–82.
- [459] Tominaga, K. and Suzuki, H. I. 2019. TGF- $\beta$  Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *International journal of molecular sciences* 20, 20.
- [460] Toussaint, O., Medrano, E., and Zglinicki, T. von. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental gerontology* 35, 8, 927–945.
- [461] Tsai, C.-C., Wu, S.-B., Kau, H.-C., and Wei, Y.-H. 2018. Essential role of connective tissue growth factor (CTGF) in transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced myofibroblast transdifferentiation from Graves' orbital fibroblasts. *Sci Rep* 8, 1, 7276.
- [462] Tuan, T. L., Zhu, J. Y., Sun, B., Nichter, L. S., Nimni, M. E., and Laug, W. E. 1996. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 may account for the altered fibrinolysis by keloid fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* 106, 5, 1007–1011.
- [463] Uciechowski, P. and Dempke, W. C. M. 2020. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology* 98, 3, 131–137.
- [464] Ueno, T., Linder, S., Na, C.-L., Rice, W. R., Johansson, J., and Weaver, T. E. 2004. Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *The Journal of biological chemistry* 279, 16, 16178–16184.
- [465] Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., and Oakes, S. A. 2012. IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science (New York, N.Y.)* 338, 6108, 818–822.
- [466] van Iwaarden, J. F., van Strijp, J. A., Ebskamp, M. J., Welmers, A. C., Verhoef, J., and van Golde, L. M. 1991. Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *The American journal of physiology* 261, 2 Pt 1, L204-9.
- [467] van Moorsel, C. H. M., van Oosterhout, M. F. M., Barlo, N. P., Jong, P. A. de, van der Vis, J. J., Ruven, H. J. T., van Es, H. W., van den Bosch, J. M. M., and Grutters, J. C. 2010. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, 11, 1419–1425.

- [468] Vander Ark, A., Cao, J., and Li, X. 2018. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. *Cellular signalling* 52, 112–120.
- [469] Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. 2006. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes & development* 20, 10, 1256–1261.
- [470] Varela, E., Muñoz-Lorente, M. A., Tejera, A. M., Ortega, S., and Blasco, M. A. 2016. Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat Commun* 7, 1, 11739.
- [471] Voorhout, W. F., Veenendaal, T., Haagsman, H. P., Weaver, T. E., Whitsett, J. A., van Golde, L. M., and Geuze, H. J. 1992. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *The American journal of physiology* 263, 4 Pt 1, L479-86.
- [472] Vuorinen, K., Ohlmeier, S., Leppäranta, O., Salmenkivi, K., Myllärniemi, M., and Kinnula, V. L. 2008. Peroxiredoxin II expression and its association with oxidative stress and cell proliferation in human idiopathic pulmonary fibrosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 56, 10, 951–959.
- [473] Waldman, T., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer research* 55, 22, 5187–5190.
- [474] Walne, A. J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., Al-Qurashi, F., Aljurf, M., and Dokal, I. 2007. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 16, 13, 1619–1629.
- [475] Wang, D., Haviland, D. L., Burns, A. R., Zsigmond, E., and Wetsel, R. A. 2007. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11, 4449–4454.
- [476] Wang, F., Podell, E. R., Zaug, A. J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T. R., and Lei, M. 2007. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 7127, 506–510.
- [477] Wang, F., Yao, S., and Xia, H. 2020. SIRT1 is a key regulatory target for the treatment of the endoplasmic reticulum stress-related organ damage. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 130, 110601.
- [478] Wang, F., Zhu, M., and Luo, F. 2024. INTEGRIS-IPF: A New Hope for Tomorrow. *Am J Respir Crit Care Med* 210, 4, 374–375.
- [479] Wang, J., Xue, T., Ye, H., Sang, C., Wu, S., and Li, S. 2021. Study of the common activating mechanism of apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells. *Respiratory physiology & neurobiology* 284, 103584.
- [480] Wang, J.-H., Zhao, L., Pan, X., Chen, N.-N., Chen, J., Gong, Q.-L., Su, F., Yan, J., Zhang, Y., and Zhang, S.-H. 2016. Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis via the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *Lab Invest* 96, 8, 839–852.
- [481] Wang, S., Wang, Z., Su, H., Chen, F., Ma, M., Yu, W., Ye, G., Cen, S., Mi, R., Wu, X., Deng, W., Feng, P., Zeng, C., Shen, H., and Wu, Y. 2021. Effects of long-term culture on the biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular therapy. Nucleic acids* 26, 557–574.

- [482] Wang, X. Z. and Ron, D. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science (New York, N.Y.)* 272, 5266, 1347–1349.
- [483] Wang, Y., Feinstein, S. I., Manevich, Y., Ho, Y.-S., and Fisher, A. B. 2006. Peroxiredoxin 6 gene-targeted mice show increased lung injury with paraquat-induced oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 8, 1-2, 229–237.
- [484] Wang, Y., Kuan, P. J., Xing, C., Cronkhite, J. T., Torres, F., Rosenblatt, R. L., DiMaio, J. M., Kinch, L. N., Grishin, N. V., and Garcia, C. K. 2009. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *The American Journal of Human Genetics* 84, 1, 52–59.
- [485] Wang, Y., Wehling-Henricks, M., Samengo, G., and Tidball, J. G. 2015. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell* 14, 4, 678–688.
- [486] Wang, Y., Yang, J., Hong, T., Chen, X., and Cui, L. 2019. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. *Ageing research reviews* 55, 100961.
- [487] Warnken, M., Haag, S., Matthiesen, S., Juergens, U. R., and Racké, K. 2010. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 381, 4, 297–304.
- [488] Wasnick, R., Korfei, M., Piskulak, K., Henneke, I., Wilhelm, J., Mahavadi, P., Dartsch, R. C., Beck, D. von der, Koch, M., Shalashova, I., Weiss, A., Klymenko, O., Askevold, I., Fink, L., Witt, H., Hackstein, H., El Agha, E., Bellusci, S., Klepetko, W., Königshoff, M., Eickelberg, O., Schermuly, R. T., Braun, T., Seeger, W., Ruppert, C., and Guenther, A. 2023. Notch1 Induces Defective Epithelial Surfactant Processing and Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 207, 3, 283–299.
- [489] Watanabe, Y., Lee, S. W., Detmar, M., Ajioka, I., and Dvorak, H. F. 1997. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* 14, 17, 2025–2032.
- [490] Weber, D., Davies, M. J., and Grune, T. 2015. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox biology* 5, 367–380.
- [491] Weinacker, A., Chen, A., Agrez, M., Cone, R. I., Nishimura, S., Wayner, E., Pytela, R., and Sheppard, D. 1994. Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 269, 9, 6940–6948.
- [492] West, M. D., Shay, J. W., Wright, W. E., and Linskens, M. H. 1996. Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Experimental gerontology* 31, 1-2, 175–193.
- [493] Westhoff, J. H., Schildhorn, C., Jacobi, C., Hömme, M., Hartner, A., Braun, H., Kryzer, C., Wang, C., Zglinicki, T. von, Kränzlin, B., Gretz, N., and Melk, A. 2010. Telomere shortening reduces regenerative capacity after acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 2, 327–336.
- [494] Wiggins, K. A., Parry, A. J., Cassidy, L. D., Humphry, M., Webster, S. J., Goodall, J. C., Narita, M., and Clarke, M. C. H. 2019. IL-1 $\alpha$  cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* 18, 3, e12946.

- [495] Willis, B. C., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., Du Bois, R. M., and Borok, Z. 2005. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *The American journal of pathology* 166, 5, 1321–1332.
- [496] Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J., and Hinz, B. 2007. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 179, 6, 1311–1323.
- [497] Wohlford-Lenane, C. L., Durham, P. L., and Snyder, J. M. 1992. Localization of surfactant-associated protein C (SP-C) mRNA in fetal rabbit lung tissue by in situ hybridization. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 6, 2, 225–234.
- [498] Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A., and Ryffel, B. 2014. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 349, 2, 209–220.
- [499] Wolters, P. J., Collard, H. R., and Jones, K. D. 2013. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual review of pathology* 9, 157–179.
- [500] Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 5619, 650–653.
- [501] Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 6488, 341–347.
- [502] Wright, J. R. 2005. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nature reviews. Immunology* 5, 1, 58–68.
- [503] Wright, J. R. and Youmans, D. C. 1995. Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *The American journal of physiology* 268, 5 Pt 1, L772-80.
- [504] Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18, 2, 173–179.
- [505] Wu, L., Multani, A. S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J. M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S. M., Deng, Y., Behringer, R. R., and Chang, S. 2006. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126, 1, 49–62.
- [506] Wyatt, H. D. M., West, S. C., and Beattie, T. L. 2010. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res* 38, 17, 5609–5622.
- [507] Xiao, L., Du, Y., Shen, Y., He, Y., Zhao, H., and Li, Z. 2012. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 17, 7, 2667–2674.
- [508] Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M. S., and Songyang, Z. 2007. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445, 7127, 559–562.
- [509] Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 6456, 701–704.
- [510] Xu, D., Neville, R., and Finkel, T. 2000. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Letters* 470, 1, 20–24.
- [511] Xu, M., Axhemi, A., Malgowska, M., Chen, Y., Leonard, D., Srinivasan, S., Jankowsky, E., and Taylor, D. J. 2021. Active and Passive Destabilization of G-Quadruplex DNA by the Telomere POT1-TPP1 Complex. *Journal of Molecular Biology* 433, 7, 166846.
- [512] Xu, M., Kiselar, J., Whited, T. L., Hernandez-Sanchez, W., and Taylor, D. J. 2019. POT1-TPP1 differentially regulates telomerase via POT1 His266 and as a

- function of single-stranded telomere DNA length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 47, 23527–23533.
- [513] Yamaguchi, H. and Wang, H.-G. 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44, 45495–45502.
- [514] Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A. W., Paton, J. C., and Kitamura, M. 2009. Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *The Journal of Immunology* 183, 2, 1480–1487.
- [515] Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 6163, 411–415.
- [516] Yanagisawa, S., Baker, J. R., Vuppusetty, C., Koga, T., Colley, T., Fenwick, P., Donnelly, L. E., Barnes, P. J., and Ito, K. 2018. The dynamic shuttling of SIRT1 between cytoplasm and nuclei in bronchial epithelial cells by single and repeated cigarette smoke exposure. *PLOS ONE* 13, 3, e0193921.
- [517] Yang, J., Shultz, R. W., Mars, W. M., Wegner, R. E., Li, Y., Dai, C., Nejak, K., and Liu, Y. 2002. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 110, 10, 1525–1538.
- [518] Yao, C., Guan, X., Carraro, G., Parimon, T., Liu, X., Huang, G., Mulay, A., Soukiasian, H. J., David, G., Weigt, S. S., Belperio, J. A., Chen, P., Jiang, D., Noble, P. W., and Stripp, B. R. 2021. Senescence of Alveolar Type 2 Cells Drives Progressive Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 203, 6, 707–717.
- [519] Ye, J. Z.-S., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., and Lange, T. de. 2004. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45, 47264–47271.
- [520] Yeager, M. E., Belchenko, D. D., Nguyen, C. M., Colvin, K. L., Ivy, D. D., and Stenmark, K. R. 2012. Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46, 1, 14–22.
- [521] Yebra, M., Parry, G. C., Strömblad, S., Mackman, N., Rosenberg, S., Mueller, B. M., and Cheresch, D. A. 1996. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 271, 46, 29393–29399.
- [522] Yi, Y.-S. 2017. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology* 152, 2, 207–217.
- [523] Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *The FEBS journal* 274, 3, 630–658.
- [524] Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 273, 50, 33741–33749.
- [525] Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. 2003. A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Developmental Cell* 4, 2, 265–271.

- [526] Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107, 7, 881–891.
- [527] Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 20, 18, 6755–6767.
- [528] Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 2001. PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Molecular Cell* 7, 3, 673–682.
- [529] Yu, L., Quinn, M. T., Cross, A. R., and Dinauer, M. C. 1998. Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14, 7993–7998.
- [530] Yu, Q. and Stamenkovic, I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 2, 163–176.
- [531] Yu, X., Buttgereit, A., Lelios, I., Utz, S. G., Cansever, D., Becher, B., and Greter, M. 2017. The Cytokine TGF- $\beta$  Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity* 47, 5, 903-912.e4.
- [532] Yuan, Z., Zhang, X., Sengupta, N., Lane, W. S., and Seto, E. 2007. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Molecular Cell* 27, 1, 149–162.
- [533] Zaman, T. and Lee, J. S. 2018. Risk factors for the development of idiopathic pulmonary fibrosis: A review. *Current pulmonology reports* 7, 4, 118–125.
- [534] Zeng, Z., Cheng, S., Chen, H., Li, Q., Hu, Y., Wang, Q., Zhu, X., and Wang, J. 2017. Activation and overexpression of Sirt1 attenuates lung fibrosis via P300. *Biochemical and biophysical research communications* 486, 4, 1021–1026.
- [535] Zglinicki, T. von, Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. 1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Experimental cell research* 220, 1, 186–193.
- [536] Zhang, S.-M., Wei, C.-Y., Wang, Q., Wang, L., Lu, L., and Qi, F.-Z. 2021. M2-polarized macrophages mediate wound healing by regulating connective tissue growth factor via AKT, ERK1/2, and STAT3 signaling pathways. *Molecular biology reports* 48, 9, 6443–6456.
- [537] Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M. O. 1999. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes & development* 13, 18, 2388–2399.
- [538] Zhang, Y., Chen, L.-Y., Han, X., Xie, W., Kim, H., Yang, D., Liu, D., and Songyang, Z. 2013. Phosphorylation of TPP1 regulates cell cycle-dependent telomerase recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 14, 5457–5462.
- [539] Zhang, Y., Li, T., Pan, M., Wang, W., Huang, W., Yuan, Y., Xie, Z., Chen, Y., Peng, J., Li, X., and Meng, Y. 2022. SIRT1 prevents cigarette smoking-induced lung fibroblasts activation by regulating mitochondrial oxidative stress and lipid metabolism. *J Transl Med* 20, 1, 222.
- [540] Zhang, Y., Noth, I., Garcia, J. G., and Kaminski, N. 2011. A Variant in the Promoter of MUC5B and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 364, 16, 1576–1577.

- [541] Zhang, Z., Schlamp, F., Huang, L., Clark, H., and Brayboy, L. 2020. Inflammaging is associated with shifted macrophage ontogeny and polarization in the aging mouse ovary. *Reproduction (Cambridge, England)* 159, 3, 325–337.
- [542] Zhao, L., Yee, M., and O'Reilly, M. A. 2013. Transdifferentiation of alveolar epithelial type II to type I cells is controlled by opposing TGF- $\beta$  and BMP signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305, 6, L409-18.
- [543] Zhao, Y., Lyons, C. E., Xiao, A., Templeton, D. J., Sang, Q. A., Brew, K., and Hussaini, I. M. 2008. Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: a potential role in glioblastoma invasion. *Biochemical and biophysical research communications* 369, 4, 1215–1220.
- [544] Zhou, Y., Murthy, J. N., Zeng, D., Belardinelli, L., and Blackburn, M. R. 2010. Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLOS ONE* 5, 2, e9224.
- [545] Zhu, C., Yu, Y., Montani, J.-P., Ming, X.-F., and Yang, Z. 2017. Arginase-I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling. *BMC Res Notes* 10, 1, 82.
- [546] Zilfou, J. T. and Lowe, S. W. 2009. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, 5, a001883-a001883.