

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Funktionen von *Trp53* in der
Homöostase des Bronchialepithels und
der Kontrolle pulmonaler
Entzündungsreaktionen als modellhafte
Perspektive auf die COPD**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan Michael Scharte

aus

Herrenberg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer Prof. Dr. S. Andreas

Ko-Betreuer: Prof. Dr. M. Dobbstein

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. S. Andreas

Ko-Referent:

Datum der mündlichen Prüfung: 10.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionen von *Trp53* in der Homöostase des Bronchialepithels und der Kontrolle pulmonaler Entzündungsreaktionen als modellhafte Perspektive auf die COPD" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Ätiologie der COPD	1
1.2 Pathogenese der COPD	3
1.2.1 Entzündungsmodell.....	3
1.2.2 Apoptose- und Seneszenzmodell.....	4
1.3 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen der COPD.....	5
1.4 Der Tumorsuppressor P53	8
1.4.1 Struktur von P53	9
1.4.2 Regulation von P53.....	11
1.4.3 Funktion von P53.....	13
1.5 Aufbau und Funktion des Bronchialepithels	15
1.5.1 Zelltypen des respiratorischen Epithels und ihre Regeneration	17
1.6 Herleitung der Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Tiermodelle.....	24
2.1.2 Lösungen und Puffer	27
2.1.3 Kits.....	31
2.1.4 Nukleinsäuren	31
2.1.5 Proteine.....	33
2.1.6 Software	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 <i>In-vivo</i> -Modelle.....	36
2.2.2 Präparation	37
2.2.3 Histologische Methoden	38
2.2.4 Mikroskopie.....	43
2.2.5 Biochemische Methoden.....	45
2.2.6 Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.7 Mukoziliäre Reinigungsuntersuchung.....	49
2.2.8 Statistische Auswertung.....	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Morphologische Beurteilung von <i>Trp53</i> -Nullmutanten Lungen	51
3.1.1 Mittlerer Alveolardurchmesser bei <i>Trp53</i> -Wildtypen und -Nullmutanten	51

3.2	Spontane und induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge von <i>Trp53</i> -Nullmutanten.....	54
3.2.1	Monozytäre Entzündungsreaktion in einem Emphysem-Modell.....	54
3.2.2	Protease-Antiprotease-Balance.....	56
3.2.3	Beurteilung der peribronchialen Fibrosierung.....	64
3.3	Struktur und Funktion des Bronchialepithels von <i>Trp53</i> -Knock-out-Mäusen	65
3.3.1	Anteil von Keulenzellen im Bronchialepithel.....	65
3.3.2	Anteil von Flimmerzellen im Bronchialepithel.....	67
3.3.3	Anteil von Becherzellen im Bronchialepithel	71
3.3.4	Mukoziliäre Reinigung in <i>Trp53</i> -defizienten Atemwegen.....	72
3.3.5	Expression von Differenzierungs- und Stammzellgenen in <i>Trp53</i> -Knock-out-Lungengewebe	75
3.4	Einflüsse von <i>Trp53</i> auf die Regeneration des Bronchialepithels.....	79
3.5	Einflüsse von <i>Trp53</i> -Effektorgenen auf die Zusammensetzung des Bronchialepithels	85
4	Diskussion.....	91
4.1	Spontane und induzierte Entzündungsreaktion	92
4.1.1	Zelluläre Entzündungsreaktion.....	93
4.1.2	Expression von Proteasen und Antiproteasen	96
4.2	Einfluss von P53 auf die Struktur und Funktion des Bronchialepithels	102
4.2.1	Struktur des Bronchialepithels abhängig vom <i>Trp53</i> -Status.....	102
4.2.2	Funktion des veränderten respiratorischen Epithels bei <i>Trp53</i> -Nullmutanten	108
4.2.3	Regeneration des Bronchialepithels unter dem Einfluss von <i>Trp53</i>	108
4.3	Funktion der P53 Effektorgene <i>Cdkn1a</i> und <i>miR-34a</i> auf die Struktur des Bronchialepithels	112
4.4	Forschungsperspektiven.....	113
5	Zusammenfassung.....	116
6	Anhang	118
7	Literaturverzeichnis	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des respiratorischen Epithels.....	16
Abbildung 2: Versuchsaufbau des Naphthalin-Regenerationsmodells.....	37
Abbildung 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Lungenschnitten junger und gealterter Mäuse.	53
Abbildung 4: Mittlerer Alveolardurchmesser junger und gealterter Mäuse.	53
Abbildung 5: Quantifizierung peribronchialer Makrophagen pro epitheliale Länge.....	55
Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Färbung für aktivierte periphere Makrophagen.	56
Abbildung 7: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von <i>Mmp12</i> , <i>Mmp13</i> und <i>Mmp9</i>	57
Abbildung 8: Western-Blot von Lungenlysaten für MMP12.	58
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12..	59
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 und azetyliertes- α -Tubulin.	60
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 und CYP4B1.	61
Abbildung 12: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von <i>Timp1</i> , <i>Timp2</i> und <i>Timp3</i>	62
Abbildung 13: Western-Blot von Lungenlysaten für TIMP1.....	63
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von TIMP1.....	64
Abbildung 15: Picro-Sirius-Rot-Färbung von Lungenschnitten.	65
Abbildung 16: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Bronchioli von Wildtypen und <i>Trp53</i> -Nullmutanten 16 Wochen alter Mauslungen.....	66
Abbildung 17: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals für SCGB1A1.....	67
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten junger und gealterter Mäuse.....	68
Abbildung 19: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals für azetyliertes- α -Tubulin.	69
Abbildung 20: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für <i>Dnal1</i> und Western Blot für DNAI1.	70
Abbildung 21: Schemazeichnung des Axonems von Kinozilien.	71
Abbildung 22: Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) von Lungenschnitten.	72
Abbildung 23: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von <i>Muc5B</i>	72
Abbildung 24: Mukoziliäre-Reinigungs-Untersuchung.	75
Abbildung 25: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von <i>TAp73</i> (A), Δ <i>Np73</i> (B) und <i>Foxj1</i> (C).....	77
Abbildung 26: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von <i>Krt5</i> (A), <i>Nanog</i> (B) sowie <i>Notch1</i> (C) und <i>Sox2</i> (D).....	79
Abbildung 27: Histologische Schnitte in HE-Färbung von Naphthalin-behandelten <i>Trp53</i> - Wildtyp und <i>Trp53</i> -Knock-out-Atemwegen.....	81
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung (A) und Quantifizierung (B) von azetyliertem- α - Tubulin und SCGB1A1 bei Naphtalin-behandelten Tieren.....	83
Abbildung 29: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für <i>Cyp2f2</i>	84
Abbildung 30: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für <i>Mcm3</i>	85
Abbildung 31: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung von azetyliertem α -Tubulin bei Wildtypen und <i>Cdkn1a</i> -Knock-out-Tieren.	87
Abbildung 32: Quantitative reverse Echtzeit-PCR in Taqman-Technik für <i>miR-34a</i>	88
Abbildung 33: HE-Färbung von <i>miR-34a</i> Wildtyp und Knock-out Lungen.	89
Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbung (A) von <i>miR-34a</i> -Wildtyp und <i>miR-34a</i> -Knock-out- Lungenschnitten mit Quantifizierung (B) und Western-Blot-Analyse (C).	90
Abbildung A.1: Vergleich des Umfangs der Bronchien in immunfluoreszenzmikroskopischen Bildern 16 Wochen alter Mauslungen.....	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die tierexperimentellen <i>Trp53</i> -Kohorten	26
Tabelle 2: Blockierlösung	27
Tabelle 3: DAB-Lösung.....	27
Tabelle 4: DEPC-Wasser.....	27
Tabelle 5: Eosin-Lösung.....	27
Tabelle 6: Phosphatpufferlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline), 10x	28
Tabelle 7: Ponceau-S-Lösung	28
Tabelle 8: RIPA-Puffer	28
Tabelle 9: SDS-Laufpuffer (10x).....	29
Tabelle 10: SDS-Sammelgel	29
Tabelle 11: SDS-Trenngel (10% Acrylamid).....	29
Tabelle 12: Transfer-Puffer	30
Tabelle 13: TRIS-Glycin-Puffer	30
Tabelle 14: Wasserstoffperoxidlösung	30
Tabelle 15: <i>Western</i> -Salze (10x)	30
Tabelle 16: Histochemische und biochemische Kits	31
Tabelle 17: Nukleinsäuren.....	31
Tabelle 18: Unspezifische Primer.....	31
Tabelle 19: Verwendete Primer und ihre Basensequenz	31
Tabelle 20: Taqman-Kits	33
Tabelle 21: Proteinmarker	33
Tabelle 22: Experimentell verwendete Antikörper und ihre Verdünnung.....	33
Tabelle 23: Enzyme	35
Tabelle 24: Dehydratationsschema von murinen Lungengewebeproben	38
Tabelle 25: Rehydratationsschema von murinem Lungengewebe für die Histologie	40
Tabelle A.1: Umfang der Bronchien von 16 Wochen alten <i>Trp53</i> -Wildtypen und - Nullmutanten.....	118
Tabelle A.2: Potentielle Bindungsstellen von P53 5' oberhalb des murinen <i>Timp1</i> -Gens (Allel 1)	119
Tabelle A.3: Potentielle Bindungsstellen von P53 3' unterhalb des murinen <i>Timp1</i> -Gens (Allel 1)	119
Tabelle A.4: Potentielle Bindungsstellen von P53 5' oberhalb des murinen <i>Timp1</i> -Gens (Allel 2)	120
Tabelle A.5: Potentielle Bindungsstellen von P53 3' unterhalb des murinen <i>Timp1</i> -Gens (Allel 2)	120

Abkürzungsverzeichnis

AGO	Argonaut-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BCL2	B-cell-lymphoma-Protein 2
CD	Differenzierungsgruppe
CDKN1A	Zyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1A; oft auch P21
CDKN2A	Zyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CYP2F2P	Zytochrom P450 Familie 2 Subfamilie F Mitglied 2, Pseudogen
CYP4B1	Zytochrom P450 Familie 4 Subfamilie B Mitglied 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAI1	Dynein-axonemale-intermediäre-Kette 1
DNALI1	Dynein-axonemale-leichte-intermediäre-Kette 1
FCS	Fötale Kälberserum
FEV ₁	Forciertes Exspiratorisches Volumen in einer Sekunde
FOXJ1	Forkhead-Box J1
HDAC1	Histon-Deazetylase 1
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
KIT	KIT Proto-Onkogen
KRT14	Keratin 14
KRT5	Keratin 5
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MDM4	<i>Murine double minute 4</i>
Mikro-RNA	Mikro-Ribonukleinsäure

<i>miR-34a</i>	Mikro-RNA-34a
<i>miR-34b/c</i>	Mikro-RNA-34b/c
MMP12	Matrix-Metallopeptidase 12 (auch Makrophagen-Metallopeptidase)
MMP9	Matrix-Metallopeptidase 9
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MUC5AC	Muzin-5AC
MUC5B	Muzin-5B
NE	Neutrophilen Elastase
NEB	Neuroendokrine Körper
NF κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NOTCH1	Notch-Rezeptor 1
PAI1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCD	Primäre Ziliäre Dyskinesie
PCL1	Polycomb-artig 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>RB</i>	Retinoblastoma-Gen
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer
RISC	RNA-induzierter Stilllegungskomplex
RNU6-1	<i>RNA, U6 small nuclear 1</i>
RPLP0	Ribosomales Protein, groß P0
SCGB1A1	Sekretoglobulin Familie 1A Mitglied 1 (human)
SCGB3A2	Sekretoglobulin Familie 2A Mitglied 3 (human)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SIRT1	NAD-abhängige Protein-Deazetylase Sirtuin-1
SOX2	Geschlechts-Determinierende Region Y-Box 2
SP-A	Surfactant-Protein A
SP-D	Surfactant-Protein D
TAD	Transaktivierende Domäne

TAP63	Transaktivierendes P63
TAP73	Transaktivierendes P73
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP1	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1
TIMP2	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2
TIMP3	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
TIMP4	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 4
TP53	Tumorprotein 53
TP63	Tumorprotein 63
TP73	Tumorprotein 73
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trp53	<i>Transformation related protein 53</i>
Trp63	<i>Transformation related protein 63</i>
Trp73	<i>Transformation related protein 73</i>
Δ NP63	Delta N P63
Δ NP73	Delta N P73

1 Einleitung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist weltweit die vierthäufigste Todesursache und verursachte 2010 rund 2,9 Millionen Todesfälle (Lozano et al. 2012). Die COPD ist klinisch durch eine unvollständig reversible Atemwegsobstruktion aufgrund einer chronischen Atemwegsentzündung in Kombination mit einer emphysematösen Degradation der alveolären Lungenabschnitte gekennzeichnet (Hogg 2004). Entsprechend definiert die *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD* die COPD als persistierende Atemflusslimitation nach Bronchodilatation mit einer relativen Einsekundenkapazität von unter 0,7 bei entsprechender klinischer Präsentation (Agusti et al. 2017). Klinisch präsentiert sich die COPD mit (Belastungs-)Dyspnoe, chronisch produktivem Husten, Giemen und Brustenge in variabler Ausprägung und ist von infektiös angestoßenen Exazerbationen gekennzeichnet, die eine stufenweise Reduktion der körperlichen Belastbarkeit bedingen (Kessler et al. 2011).

Im Folgenden werden die wichtigsten ätiologischen Faktoren und pathogenetischen Mechanismen der COPD sowie die klinischen Konsequenzen der Erkrankung dargestellt. Weiterhin werden Struktur, Regulation und Funktion des Tumorsuppressors P53 sowie seines murinen Homologs vorgestellt. Die Darstellung des Aufbaus und der Funktion des Bronchialepithels schafft im Anschluss einen Überblick über das Gewebe, in dem die Funktionen von P53 in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1 Ätiologie der COPD

Umfassende epidemiologische und experimentelle Untersuchungen haben Risikofaktoren identifiziert, die zur Entstehung und zum Progress der COPD beitragen. Zu den führenden exogenen Risikofaktoren zählt insbesondere das inhalative Tabakrauchen. Aber auch die Exposition gegenüber Passivrauch, Luftverschmutzung durch Straßenverkehr und Biomasseverbrennung sowie der Kontakt zu Pestiziden im Rahmen landwirtschaftlicher Tätigkeit bilden epidemiologisch belegte Risikofaktoren, die durch die Inhalation von exogenen Noxen gekennzeichnet sind (Salvi und Barnes 2009; Bagdonas et al. 2015). Demgegenüber stehen infektiöse Einflussfaktoren, die mit der Entwicklung einer COPD assoziiert sind: häufige tiefe Atemwegsinfektionen in der Kindheit und Tuberkulose-Infektionen zählen zu den diskutierten Hauptrisikofaktoren der COPD (Salvi und Barnes 2009; Eisner et al. 2010). Untersuchungen zu der Rolle von T-Lymphozyten in der

Ätiologie der COPD legen auch autoimmune Mechanismen nahe, für die sich jedoch wenig Evidenz und nur epidemiologische Assoziationen zur Rheumatoiden Arthritis finden lassen (Bagdonas et al. 2015; Dhital et al. 2018). Veränderungen im Mikrobiom stellen eine neue Perspektive in der Ursachenforschung der COPD dar, die allerdings nur spärlich belegt ist (Pragman et al. 2012; Sze et al. 2012; Zakharkina et al. 2013). Neben diesen Umweltfaktoren stellen auch konstitutionelle und genetische Prädispositionen wesentliche Ursachen der COPD dar, die das fakultative Auftreten der COPD bei Exponierten erklären.

Eine Reihe Genpolymorphismen, die möglicherweise eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Noxen bedingen können, sind bekannt. Die bekannteste genetische Prädisposition für die Entwicklung eines pulmonalen Emphysems ist dabei der hereditäre Mangel des Alpha-1-Antitrypsins (entsprechend einer Homozygotie für das Z-Allel des Gens Serpin-Familie-A-Mitglied-1 (*SERPINA1*; Stoller und Aboussouan 2005). Eine Assoziation der COPD mit Risikoallelen ist belegt für das Gen des Surfactant-Proteins D (*SFTPD*), welches Teil der primären Immunität der Lunge ist (Ou et al. 2015; Pérez-Rubio et al. 2016). Die Expression von *SFTPD* findet insbesondere in den Pneumozyten Typ II und in den Keulenzellen statt. Auch Polymorphismen in Genen, deren Genprodukte an der Biotransformation von Fremdstoffen beteiligt sind, finden eine Assoziation mit der COPD, so das Gen der Gluthation S-Transferase Mu 1 (*GSTM1*) und das Gen der Epoxid-Hydrolase 1 (*EPHX1*) (Castaldi et al. 2010; Penyige et al. 2010). Außerdem zeigen Genvarianten von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor (*TNF*), Chemokinrezeptoren wie C-X-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor-2 (*CXCR2*) oder Enzymen wie der Zyklooxygenase 2 (*COX2*) eine Assoziation mit der COPD (Arif et al. 2008; Castaldi et al. 2010; Lerner et al. 2016). Als Transkriptionsfaktoren sind Allele von Tumorprotein P53 (*TP53*) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (*PPAR-γ*) mit der COPD assoziiert (Arif et al. 2008; Penyige et al. 2010). Demgegenüber sind jedoch auch protektive Genvarianten bekannt, deren Auftreten bei COPD-Patienten signifikant seltener ist als bei gesunden Kontrollprobanden. Dazu gehören Varianten des Interleukin-6-Rezeptors (*IL6R*), des transformierenden Wachstumsfaktors B1 (*TGFB1*) ebenso wie Varianten der ADAM Metallopeptidase Domäne 19 (*ADAM19*) oder des Zytochroms P450 Familie 2 Subfamilie F Mitglied 2, Pseudogen (*CYP2F2P*) (Castaldi et al. 2010; Pérez-Rubio et al. 2016). Genetische Prädispositionen der COPD finden sich also in Genen, die an der Biotransformation von Fremdstoffen, an Entzündungsreaktionen und deren Kontrolle, an der zellulären Differenzierung (wie *ADAM19* und *TGFB1*) sowie an der Genexpressionsregulation beteiligt sind.

Aus diesen Untersuchungen lässt sich also ein Diathese-Stress-Modell ableiten, dass die Entstehung der COPD als ein Aufeinandertreffen von prädisponierender genetischer Ausstattung mit krankheitsauslösenden Noxen beschreibt. Gleichzeitig fehlt ein schlüssig belegtes Modell, das die Interaktion von Umwelteinflüssen mit den einzelnen prädisponierenden Faktoren erklärt. Besser verstanden sind hingegen die Krankheitsvorgänge und die funktionellen Konsequenzen bei der COPD, ohne jedoch ein vollumfängliches Bild der Pathogenese zeichnen zu können.

1.2 Pathogenese der COPD

Pathogenetisch werden in der aktuellen Literatur mehrere Konzepte des Umbaus der Atemwege und des Alveolargewebes bei der COPD diskutiert.

1.2.1 Entzündungsmodell

Die Entdeckung des hereditären Mangels (quantitativ oder qualitativ) des Alpha-1-Antitrypsins als modellhafte Erkrankung, bei der eine funktionelle Reduktion des wichtigsten physiologischen Inhibitors vieler endogener Proteasen besteht und zur frühen und bisweilen schweren Ausprägung eines Lungenemphysems führt, hat die Theorie des Ungleichgewichts von Proteasen und Antiproteasen als Ursache des Lungenemphysems wesentlich beeinflusst (Stoller und Aboussouan 2005). In der Folge konnte gezeigt werden, dass neben der Neutrophilen-Elastase (NE) die Makrophagen-Metallopeptidase (MMP-12) führend an der Entstehung des Lungenemphysems bei der COPD beteiligt ist, indem die elastischen Fasern der extrazellulären Matrix hydrolysiert werden und somit strukturelle Defekte am Lungengerüst entstehen (Hunninghake et al. 2009). Die Bedeutung weiterer Proteasen (wie MMP1, MMP2, MMP9, ADAM33 und ADAM17) und Antiproteasen (wie TIMP1 und TIMP2) ist inzwischen für die COPD belegt (Mocchegiani et al. 2011). Die Funktionen dieser Enzyme und Enzyminhibitoren scheint über den Umbau der extrazellulären Matrix hinaus zu gehen und auch Proliferation und Differenzierung von Zellen zu beeinflussen. So wurden für TIMP1 proliferationsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften in Pankreaskarzinomzellen und Adenokarzinomzellen der Lunge gezeigt (Rossi et al. 2011; Botta et al. 2013; Nalluri et al. 2015; Zhang et al. 2016).

Anders als bei der COPD ist bei dem hereditären Alpha-1-Antitrypsinmangel jedoch die emphysematöse Destruktion des Alveolarraums führend gegenüber der Obstruktion der Atemwege, was die Unvollständigkeit dieses Modells zur Erklärung der COPD andeutet.

1.2.2 Apoptose- und Seneszenzmodell

Neben dem Modell des Ungleichgewichts von entzündlich bedingter Enzymaktivität und dessen physiologischen Inhibitoren hat sich als weiterer Erklärungsansatz die verstärkte Apoptose von Alveolar- und Bronchialepithelzellen bei COPD-Patient*innen entwickelt. So konnten Yokohori und Kolleg*innen (2004) zeigen, dass die Apoptoserate ebenso wie die Proliferationsrate in Alveolarepithelzellen von Patient*innen mit Lungenemphysem signifikant höher ist als die von nicht-emphysematösen Lungenproben von Raucher*innen und Nichtraucher*innen. Dabei überwiegt trotz der verstärkten Proliferation die Apoptose von Alveolarepithelzellen, sodass sich bei Emphysepatient*innen eine negative Bilanz des Zellumsatzes ergibt (Imai et al. 2005). Imai und Kolleg*innen (2005) konnten weiterhin zeigen, dass die verstärkte Apoptose in Lungenproben von COPD-Patient*innen negativ mit der alveolären Oberfläche in diesen Proben korreliert. Dieses Modell erklärt den Rückgang funktionsfähigen Alveolargewebes mit einem globalen Zellverlust, der auch auf die verstärkte Expression des Tumorsuppressors *TP53* zurückgeführt wird (Hodge 2005; Morissette et al. 2008; Siganaki et al. 2010). Die Ursache für den verstärkten Zelluntergang in Alveolarepithelzellen von COPD-Patient*innen wird dabei in einer höheren Rate von DNA-Schäden mit konsekutiver Apoptose, Seneszenz und entzündlichem Genexpressionsmuster vermutet (Aoshiba et al. 2012). Auch in Zellkulturen von Bronchialepithelzellen konnte eine verstärkte Apoptose und erhöhte *TP53*-mRNA Expression bei COPD-Proben gezeigt werden (Gogebakan et al. 2014).

Auch der zeitlich stabile Zellzyklusarrest, die Zellseneszenz, kann durch das *TP53*-Netzwerk vermittelt werden. Die Seneszenz von pulmonalen Endothelzellen und von Alveolarepithelzellen scheint ein wichtiger Mechanismus der chronischen pulmonalen Entzündung und der Emphysementwicklung bei der COPD zu sein, der auch im Mausmodell nachvollzogen werden kann (Tsuji et al. 2006; Amsellem et al. 2011; Dagouassat et al. 2013; Sagiv et al. 2018). Die epitheliale Seneszenz bei der COPD ist dabei besonders durch eine verstärkte Expression der *TP53*-Effektoren *CDKN1A* und *CDKN2A* gekennzeichnet (Chiappara et al. 2013; Barnes et al. 2019). Beim Menschen konnte außerdem eine zentrale Funktion des Mechanistischen-Zieles-der-Rapamycin-Kinase (mTOR)-Signalwegs für diese Seneszenzinduktion bei der COPD gezeigt werden (Houssaini et al. 2018). Anders als bei dem irreversiblen Zellzyklusarrest, der Seneszenz, befinden sich Zellen bei der Quieszenz in einer zeitlich stabilen, aber reversiblen G_0 -Phase. Auch diese wird wesentlich durch P53 und *CDKN1A* induziert, hier ist zusätzlich PCL1 ein entscheidender Transkriptionsfaktor (Brien und Bracken 2015). Die Quieszenz ist eine

wichtige Voraussetzung für die Differenzierung von Zellen, so bei Keulenzellen (McConnell et al. 2016).

Diese Beobachtungen haben den wissenschaftlichen Fokus auf die Rolle von Apoptose-regulierenden Genen in der Pathogenese der COPD verschoben. Im Zentrum der Betrachtung stehen die Funktionen des Tumorsuppressor-Gens *TP53* sowie der antagonistischen Proto-Onkogenfamilie B-cell-lymphoma-Protein 2 (*BCL2*).

1.3 Pathophysiologische und klinische Konsequenzen der COPD

Wie oben beschrieben, entsteht die COPD wesentlich durch eine verstärkte pulmonale Entzündungsreaktion im Kontext der Inhalation schädlicher Partikel, allen voran das inhalative Tabakrauchen (Duffy und Criner 2019). Daneben sind eine Reihe weiterer Veränderungen an der Pathophysiologie der COPD beteiligt:

Die Infiltration der Atemwege und des Lumens der Bronchien mit Entzündungszellen ist ein typisches pathomorphologisches Korrelat der chronischen Bronchitis, die einen wichtigen Aspekt der COPD darstellt. Dabei dominieren neutrophile Granulozyten im Bronchiallumen und Makrophagen und CD8-positive T-Zellen in den Atemwegswänden und dem Parenchym (Wang et al. 2018). Diese Zellen nehmen durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen wie der Neutrophilen Elastase (NE) und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) durch die neutrophilen Granulozyten oder durch Sekretion von MMP12 durch Makrophagen eine zentrale Rolle in der entzündlichen Gewebeveränderung ein. Diese Entzündungsreaktion der Atemwege verläuft bei der COPD chronisch mit einer eingeschränkten Rückbildung der akut-entzündlichen Veränderungen, sodass es zu einem chronischen Gewebeschaden kommt (Vitenberga et al. 2019). Die Sekretion von Chemokinen (wie beispielsweise Interleukin 8) stellt eine weitere pathophysiologisch relevante Funktion der Entzündungszellinfiltration dar und verknüpft die entzündlichen Veränderungen bei der COPD mit der geweblichen Umstrukturierung der Atemwege und des Alveolarraums, die sich klinisch als Gasaustauschstörung und fixierte Atemflusslimitation präsentieren (Mukaida 2003; Nie et al. 2010; Lerner et al. 2016).

Auch die Komposition des bronchialen Epithels verändert sich bei der COPD und ist eine weitere Determinante der bronchialen Obstruktion. So kommt es bei der COPD zu einer Hyperplasie von Becherzellen in den Atemwegen und einer übermäßigen Sekretion von Muzinen, dabei insbesondere Muzin-5AC (MUC5AC) und Muzin-5B (MUC5B), die als Glykoproteine wichtige Bestandteile des Bronchialsekrets sind. Beide Veränderungen zusammen bewirken eine Akkumulation von Bronchialschleim, was einerseits die

bakterielle Besiedlung befördert und andererseits den ziliären Abtransport des Bronchialsekrets behindert (Raju et al. 2013; De Rose et al. 2018). Die Schlagfrequenz und Länge der Zilien der Flimmerzellen ist überdies bei moderater und schwerer COPD gegenüber Kontrollen vermindert, was die mukoziliäre Reinigung der Atemwege zusätzlich einschränkt (Yaghi et al. 2012). Auch unspezifische Immunfunktionen und Barrierefunktionen des Bronchialepithels sind bei der COPD reduziert (De Rose et al. 2018). Die zelluläre Zusammensetzung des Bronchialepithels ist also bedeutend für die Pathophysiologie der COPD, wobei auch hier nicht eindeutig differenziert werden kann, ob die beobachteten Veränderungen (Becherzell-Hyperplasie, plattenepitheliale Metaplasie) Ursachen oder Folgen des Krankheitsprozesses sind. Chand und Kolleg*innen (2014) konnten allerdings zeigen, dass ein Genpolymorphismus am Kodon 72 von *TP53* (der für Arginin statt für Prolin an dieser Stelle des P53-Proteins kodiert) mit einem signifikant höheren Risiko für eine chronische Bronchitis einhergeht und dass Zellkulturen aus humanen Bronchialepithelien mit diesem Polymorphismus signifikant mehr MUC5AC und MUC5B synthetisieren, was die bronchiale Hypersekretion als Teilursache der COPD in diesem Kollektiv nahelegt.

Weitere Veränderungen der Bronchioli bei der COPD sind eine peribronchiale Fibrose und eine Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur, die beide die expiratorische Atemflusslimitation mit bedingen (Wang et al. 2018). Die peribronchiale Fibrose entsteht dabei durch eine teilweise TGF β -vermittelte epithelial-mesenchymale Transition von Bronchialepithelzellen, einem Prozess, der entscheidend für die Metastasierung von Karzinomen ist (Gohy et al. 2015).

Die Ursachen der emphysematöse Destruktion des Alveolarraums wurden oben genauer beleuchtet, ihre klinischen Auswirkungen lassen sich in drei pathophysiologische Konsequenzen aufteilen. Erstens verändert sich die Atemmechanik, da durch die Degradation elastischer Fasern im alveolären Interstitium sich die elastischen Rückstellkräfte auf die terminalen Bronchioli reduzieren und es somit zum expiratorischen Kollaps der Bronchioli kommt, die die Patient*in als Giemen wahrnimmt. Gleichzeitig entsteht dadurch eine stufenweise Überblähung distaler Lungenabschnitte, die gleichsam zum Fortschreiten des Emphysems beiträgt und die Diaphragmaexkursion einschränkt. Zweitens reduziert sich die alveoläre Oberfläche, was zu einer Gasaustauschstörung mit Hypoxämie und Hyperkapnie führt. Drittens verkleinert sich mit der Verminderung der Anzahl der Alveolen gleichsam der Gesamtquerschnitt des pulmonalen Gefäßbettes, was

der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie mit entsprechenden rechtskardialen und rhythmogenen Auswirkungen Vorschub leistet (Vogelmeier et al. 2018).

Systemische Krankheitsmanifestationen der COPD stellen nicht nur einen wesentlichen Anteil der krankheitsassoziierten Morbidität und Mortalität bei der COPD dar, sondern sind für die Patienten auch von herausragender Bedeutung für die Lebensqualität. Zu den führenden systemischen Auswirkungen gehört eine generalisierte erhöhte Entzündungsaktivität, die unabhängig vom Rauchstatus die Rate ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse erhöht und eine katabole Stoffwechsellage mit Gewichtsverlust bedingt (Warwick et al. 2015). Aber auch die häufigere Insulinresistenz und normozytäre Anämie bei COPD-Patient*innen wird mit der chronischen systemischen Entzündungsaktivität in Verbindung gebracht (Barnes und Celli 2009). Darüber hinaus sind muskuläre Dysfunktion und Osteoporose wichtige und prognosebestimmende Komorbiditäten, die ebenso wie die höhere Rate von Depressionen auf direkte und indirekte Effekte des pulmonalen Krankheitsgeschehens zurückgeführt werden (Warwick et al. 2015). Bemerkenswert für spätere Ausführungen in dieser Arbeit ist die Assoziation zwischen der Einschränkung der forcierten Einsekundenkapazität FEV₁ und einem erhöhten Risiko des Bronchialkarzinoms, welche auch nach Adjustierung um die Rauchexposition bestehen bleibt (Wasswa-Kintu et al. 2005).

Die COPD ist also ätiologisch, pathogenetisch und pathophysiologisch durch verstärktes pulmonales Entzündungsgeschehen in Atemwegen und Alveolarraum, Apoptose und Seneszenz der Alveolarepithelzellen und Veränderungen der zellulären Zusammensetzung und Funktion des Bronchialepithels gekennzeichnet. Oben wurde gezeigt, dass P53 in all diesen Prozessen Einflüsse hat, maßgeblich ist P53 insbesondere an der Apoptose- und Seneszenzinduktion der Alveolarepithelzellen beteiligt, doch auch die Funktion und Differenzierung des Bronchialepithels scheint von P53 beeinflusst zu sein. Die Interaktion von P53 mit pulmonalen Entzündungsmechanismen haben Madenspacher und Kolleg*innen (2013) gut herausgearbeitet; sie konnten zeigen, dass bei *Trp53*-defizienten Mäusen die Entzündungsantwort des Immunsystems in der Lunge auf bakterielle Infektionen derart verstärkt abläuft, dass schwere Schäden an Atemwegen und Alveolen verbleiben.

Die Funktionen von P53 in der Lunge sind also vielfältig und bisher unvollständig verstanden. Eine genaue Gegenüberstellung erfolgt in der Herleitung der Fragestellung dieser Arbeit, zuvor soll jedoch ein einordnender Überblick über den humanen Tumorsuppressor P53 gegeben werden.

1.4 Der Tumorsuppressor P53

Das Genprodukt von *TP53*, das Tumorprotein P53, ist das zentrale Protein in dem zellulären Netzwerk der Tumorsuppression. Das Produkt des murinen homologen Gens *Trp53* weist bezüglich der Proteinstruktur, der Genregulation und der zellulären Funktionen starke Ähnlichkeiten zum humanen P53 auf, sodass die folgende Darstellung auch für das murine P53 gilt.

Als Transkriptionsfaktor bindet P53 in Reaktion auf verschiedene zelluläre Stressoren sequenzspezifisch an die nukleäre DNA und arretiert durch die veränderte Genexpression den Zellzyklus, induziert Seneszenz oder induziert die Apoptose, um genetisch geschädigte Zellen an der weiteren Proliferation zu hindern (Kastan et al. 1991; Vogelstein et al. 2000). Dementsprechend unterliegt *TP53* in den meisten Tumoren inaktivierenden Mutationen oder Mutationen in anderen Genen des P53-Netzwerks verursachen veränderte Funktionen dieses Netzwerks (Kasthuber und Lowe 2017). Die funktionelle Vielfalt von P53 lässt sich modellhaft an dem Li-Fraumeni-Syndrom ablesen, bei dem autosomal-dominante Keimzellmutationen in einem *TP53*-Allel zu einer generalisierten Tumordisposition führen (Malkin et al. 1990; Valdez et al. 2017). Das Tumorspektrum bei dem hereditären Li-Fraumeni-Syndrom umfasst insbesondere Leukämien, Lymphome und Sarkome; aber auch die epidemiologisch häufigen soliden Tumoren wie das kolorektale Karzinom, das Mammakarzinom und das Bronchialkarzinom weisen hochfrequent Mutationen in *TP53* auf (Malkin et al. 1990; Hasegawa et al. 1995; Tennis et al. 2006; Gibbons et al. 2014). Der Zusammenhang von *TP53*-Genkopien und -Varianten mit der Lebenserwartung und der Körpergröße von Säugetieren stellt die herausragende Bedeutung von P53 in der genomischen Stabilität grundsätzlich heraus und lässt weitere Einflüsse von P53 auf die zelluläre Homöostase vermuten (Maier et al. 2004; Abegglen et al. 2015; Sulak et al. 2016). So werden neben der Funktion von P53 als Wächter des Genoms auch Einflüsse auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen und die Ausdifferenzierung von Geweben diskutiert (Lin et al. 2005; Li et al. 2013). Einen weiteren funktionalen Kontext stellt die antagonistische Interaktion von P53 mit dem zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktor Nukleärer-Faktor-Kappa-B (NF κ B) dar, der vielseitige Erklärungsansätze der Funktion von P53 in der Pathogenese der COPD zulässt (Gudkov et al. 2011).

Neben *TP53* gibt es weitere Gene, deren Genprodukt in Struktur und Funktion P53 ähnlich sind und deshalb als P53-Familie zusammengefasst werden. Die beiden anderen Mitglieder der P53-Familie werden als Tumorprotein 73 (*TP73*) und Tumorprotein 63

(*TP63*) bezeichnet und sind durch eine evolutionär konservierte duale Genstruktur gekennzeichnet: Durch einen internen Promotor entstehen regelhaft aminoterminal verkürzte Genprodukte von *TP73* und *TP63* (Δ NP73 und Δ NP63), die dominant negative Eigenschaften gegenüber dem vollständigen Transkript aufweisen (Khoury und Bourdon 2010). Durch alternatives Spleißen entstehen carboxyterminal verkürzte Varianten, die als α -, β - und γ -Formen (bei P73 zudem noch δ , ϵ , ζ , η -Form) bezeichnet werden (Murray-Zmijewski et al. 2006; Bourdon 2007). Åberg und Kolleg*innen (2017) konnten zeigen, dass die P53-Familie evolutionär aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen zu Beginn der Entwicklung mehrzelliger Organismen entstanden ist und sowohl durch die Duplikation des gesamten Genoms als auch durch die Vervielfältigung des P53/P63/P73-Vorläufers gebildet wurde. Während für P53 die Funktion als Tumorsuppressor am besten untersucht ist, zeigen die P53-Homologen P63 und P73 spezifische Funktionen in der Selbsterneuerung von Stammzellen (Δ NP63) und in der Differenzierung von Geweben (TAP73, TAP63), wobei für diese Arbeit insbesondere die Funktion von TAP73 als zentraler Regulator der Multizylogenese entscheidend ist (Danilova et al. 2008; Romano et al. 2009; Marshall et al. 2016; Nemajerova et al. 2016). Obgleich spezifische und bedeutende Funktionen der einzelnen Familienmitglieder der P53-Familie bekannt sind, lassen sich für alle P53-Familienmitglieder redundante Funktionen in der Tumorsuppression, durch die dominant negativen Isoformen (Δ N-Formen) aber auch onkogene Funktionen finden (McKeon 2004; Bourdon 2007). So konnte kürzlich für P73 eine Interaktion mit der Δ 133P53-Isoform gezeigt werden, die an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Marcel et al. 2012; Gong et al. 2018). Andererseits findet auch eine Interaktion von P63 und P73 mit häufigen P53-Mutanten statt, sodass auch onkogene Funktionen belegt sind (Stindt et al. 2015).

1.4.1 Struktur von P53

Das humane Gen *TP53* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und findet homologe Gene in den meisten sequenzierten Wirbeltieren (Matlashewski et al. 1984; Isobe et al. 1986; McBride et al. 1986). *TP53* besteht aus 11 Exons mit zwei bekannten Promotoren, wobei die Transkription von Promotor P1 das komplette *TP53* Transkript ergibt, wohingegen der Transkriptionsbeginn an Promotor P2 ein n-terminal trunkeertes Genprodukt (Δ 133P53) hervorbringt (Lamb und Crawford 1986; Murray-Zmijewski et al. 2006). Neben den alternativen Transkriptionsstartpunkten sind n-terminale alternative Spleiß-Varianten bekannt, die die Vielfalt der Genprodukte weiter erhöhen: Alternatives Spleißen am Intron 2 bringt die Proteinvariante Δ 40P53 hervor, der Teile der

transaktivierenden Domäne (TAD) fehlen (Murray-Zmijewski et al. 2006). Dennoch können diese trunkierten Versionen von P53 abhängig vom Kontext anderer Transkriptionsfaktoren transkriptionell aktiv sein und sogar kompetitiv antagonistisch zum Wildtyp-P53 auftreten (Zhu et al. 1998; Ghosh et al. 2004). Alternatives Spleißen am Intron 9 führt bei allen oben genannten n-terminalen Varianten zu c-terminal verkürzten P53-Transkripten, denen die Tetramerisierungsdomäne fehlt und als P53 β und P53 γ bezeichnet werden (Murray-Zmijewski et al. 2006).

Das P53-Protein in seiner transkriptionell aktiven Form ist ein Homo-Tetramer. Strukturell ist P53 aus vier Abschnitten aufgebaut. Die aminoterminal TAD ist reich an sauren Aminosäuren und dient der Bindung von Kofaktoren, die wesentlich über den Effekt der sequenzspezifischen Bindung von P53 an der DNA mitentscheiden (Joerger und Fersht 2008). Zu diesen Interaktionen an der TAD zählt auch die Bindung von *Murine double minute 2* (MDM2) und *Murine double minute 4* (MDM4) an P53, die eine Degradation von P53 im Proteasom durch Ubiquitynylierung vermitteln (Joerger und Fersht 2008). Die anschließende Prolin-reiche Region interagiert ebenfalls mit nukleären Proteinen, welche die Stabilität und die Transkriptionsaktivität von P53 beeinflussen (Venot et al. 1998; Toledo et al. 2007; Kamada et al. 2016). Zentral im P53-Protein befindet sich die DNA-bindende Domäne, die sequenzspezifisch an DNA-Abschnitte binden kann und damit die Funktion von P53 als Transkriptionsfaktor wesentlich bestimmt. Dementsprechend finden sich in dieser Region des kodierenden *TP53* Gens die meisten Mutationen in Tumoren (Toledo und Wahl 2006; Kamada et al. 2016). Die Tetramerisierungsdomäne des P53 Proteins vermittelt eine zweistufige Zusammenlagerung von P53 zunächst zu einem Dimer und bei hohen Proteinkonzentrationen danach zu einem Tetramer (Mateu und Fersht 1998; Joerger und Fersht 2008). Die Tetramerstruktur ist wesentlich für die spezifische Bindung an der DNA, für posttranslationale Modifikationen und für die Interaktion mit Kofaktoren verantwortlich (Kamada et al. 2016). Die Zusammenlagerung von vier P53 Proteinen zu einem Tetramer ermöglicht eine hochaffine Bindung an die P53-spezifischen Bindungsmuster der DNA, weil diese Bindungsmuster aus je vier gleichen Sequenzabschnitten bestehen, die von den jeweiligen DNA-bindenden Domänen gebunden werden können (McLure und Lee 1998; Malecka et al. 2009). Das carboxyterminale Ende von P53 interagiert unspezifisch mit der DNA und verändert so ebenfalls die transkriptionelle Aktivität von DNA-gebundenem P53 (Weinberg et al. 2004).

1.4.2 Regulation von P53

Als molekulare Schnittstelle vieler zellulärer Signalwege, die zwischen Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz der Zelle entscheidet, sind die Genexpression und insbesondere die Proteinstabilität von P53 eng und komplex reguliert.

P53 unterliegt einer Reihe posttranslationaler Modifikationen, zu denen die Ubiquitynylierung durch MDM2 mit der dadurch anschließenden Degradation im Proteasom gehört (Chao 2015). Abhängig von dem P53-aktivierenden Signalweg verursachen verschiedene posttranslationale Modifikationen eine Aktivierung von P53. Die Aktivierung des Ataxie-Teleangiektasie-Mutiert (ATM)-Serin/Threonin-Kinase-Signalwegs führt zu einer Phosphorylierung von P53 an spezifischen Aminosäureresten und stellt damit einen wesentlichen Faktor für die Translokation von phosphoryliertem P53 in den Zellkern dar (Sakaguchi et al. 1998; Sakaguchi et al. 2000; Saito et al. 2003). Die Aktivierung von P53 durch den CDKN2A-Signalweg hingegen bedingt eine Azetylierung von P53 in der DNA-bindenden Region (Mellert et al. 2007). Weitere Modifikationen von P53 sind bekannt, die funktionellen Bedeutungen dieser Modifikationen sind jedoch nur teilweise verstanden (Meek und Anderson 2009). Die Vielfalt der Modifikationen von P53 deutet jedoch auf die verschiedenen Funktionen von P53 im jeweiligen zellulären Kontext hin.

Abhängig von der Phase des Zellzyklus und zellulären Stressoren variiert die P53 Konzentration, wird aber auf einem niedrigen Niveau gehalten. Die Mechanismen der funktionellen Inaktivierung von P53 sind dabei mannigfaltig. MDM2 stellt einen zentralen Regulator der Proteinstabilität von P53 dar. Als Ubiquitin-E3-Ligase vermittelt MDM2 den Abbau von P53 im Proteasom und bedingt so niedrige nukleäre Konzentrationen von P53 (Tao und Levine 1999). Die Bindung von MDM2 an die TAD von P53 vermittelt außerdem den Export aus dem Zellkern und reduziert so zusätzlich die transkriptionelle Aktivität von P53 (Ashcroft und Vousden 1999). Ein weiterer Weg der Inaktivierung von P53 stellt die MDM2-unabhängige Ubiquitynylierung von P53 durch E6, ein Protein der Humanen Papillomaviren (HPV), mit dem E6-Assoziierten-Protein (E6AP) dar (Scheffner et al. 1993). Dieser pathologische Abbau von P53 bei HPV-infizierten Zellen scheint einen Schlüsselmechanismus der HPV-assoziierten Tumoren darzustellen. Auch die c-Jun-terminale-Kinase (JNK) kann einen Abbau von P53 induzieren und damit die P53-Stabilität regulieren (Fuchs et al. 1998a), wobei das gleiche Enzym bei Zellstress durch Phosphorylierung von P53 auch dessen Akkumulation vermitteln kann (Fuchs et al. 1998b; Buschmann et al. 2001). Eine Reihe weiterer Proteine regulieren die Funktion und Stabilität von P53: So hydrolysiert beispielsweise das Kalzium-abhängige Enzym Caplain P53

unabhängig vom Proteasom, das Parkin-artige-Zytoplasmatische-Protein (PARC) bindet P53 im Zytosol und verhindert somit den Zellkernimport und die Transkriptionsaktivität von P53 (Kubbutat und Vousden 1997; Zhang et al. 1997; Nikolaev et al. 2003; Mulhall et al. 2010). Die Phosphorylierung bestimmter Serin-Residuen des P53 Proteins durch Kinasen wie die NIMA-ähnliche-Kinase 2 (NEK2) und Aurora-Kinase A (AURKA) können einen verstärkten Abbau von P53 durch den MDM2-Weg verursachen und damit eine Feinregulation der P53-Menge ermöglichen (Wang und Prives 1995; Katayama et al. 2004; Choi et al. 2018). Auch posttranslationelle Veränderungen (wie Phosphorylierungen) von MDM2 können indirekt eine verstärkte Ubiquitylierung von P53 mit konsekutiven Abbau verursachen (Mayo und Donner 2001).

P53 wird in Reaktion auf Schädigungen der Zelle stabilisiert. Die wichtigsten Stimuli der P53-Akkumulation sind DNA-Schäden, pH- und Temperaturveränderungen, metabolische Aberrationen, Hypoxie und die Aktivierung von Onkogenen (Ashcroft und Vousden 1999). Der wichtigste Mechanismus der P53-Aktivierung ist dabei, wie oben bereits angedeutet, die Phosphorylierung von P53 an aminoterminalen Serinresten in der TAD. Diese Phosphorylierung als ein zentraler Weg der P53 Aktivierung wird besonders durch den ATM-ATR-Signalweg bei Doppel- und Einzelstrangbrüchen der DNA aktiviert (Canman et al. 1998; Khanna et al. 1998; Tibbetts et al. 1999). Gleichzeitig kann dieser Signalweg auch eine Phosphorylierung von MDM2 vermitteln und so zusätzlich den Abbau von P53 reduzieren (Gannon et al. 2012; Li und Wahl 2012). Neben Phosphorylierungen stellen Azetylierungen, Methylierungen und eine Reihe weiterer Modifikationen funktionsverändernde Regulationsmechanismen von P53 dar (Carr et al. 2012). Azetylierungen von P53 entstehen besonders in der DNA-bindenden Region und in der carboxyterminalen Domäne und beeinflussen das Bindeverhalten von P53 an die DNA, die differenzielle Induktion von Zielgenen sowie die Bindung von Kofaktoren. Zwei Gruppen von Azetyltransferasen übertragen Essigsäure-Gruppen auf P53: die p300/CREB-bindendes-Protein (CBP)/p300/CBP-assoziiertes Faktor (PCAF)-Gruppe und die Histon-Azetyltransferase KAT5 (Tip60)/Histon-Azetyltransferase KAT8 (MOF)/Histon-Azetyltransferase KAT6A (MOZ)-Gruppe (Liu et al. 1999; Reed und Quelle 2015). Die Azetylierung von P53 ist entscheidend an der Induktion der Apoptose und Einleitung von Seneszenz beteiligt. Gleichzeitig können Deazetylasen wie die Histon-Deazetylase 1 (HDAC1) und NAD-abhängige-Protein-Deazetylase-Sirtuin-1 (SIRT1) die Azetylierung von P53 rückgängig machen und damit ebenfalls in das komplexe Netzwerk der P53-abhängigen Zellzykluskontrolle eingreifen (Brooks und Gu 2011). Eine indirekte Stabilisation von P53 entsteht auch durch die Inhibition von MDM2 durch den Zyklin-

abhängige-Kinase-Inhibitor 2A (CDKN2A) (Kamijo et al. 1998; Pomerantz et al. 1998; Stott et al. 1998). Überdies kann auch „ribosomaler Zellstress“ durch ribosomale Proteine die Interaktion von MDM2 mit P53 stören, sodass auch hier durch verminderte P53-Degradation eine P53-abhängige Veränderung der Genexpression vermittelt wird (Meek 2015).

Die enge und vielschichtige Regulation der P53-Stabilität und -Lokalisation beeinflusst auch die unten gezeigten Effekte von P53 und macht deutlich, dass P53 an einer Reihe biologischer Prozesse über die reine Tumorsuppression hinaus beteiligt ist.

1.4.3 Funktion von P53

P53 reguliert als zentraler tumorsuppressiver Transkriptionsfaktor ein weites Spektrum von Genen, deren bekanntesten Vertreter hier dargestellt werden sollen. Die differenzielle Induktion der P53-Effektoren im Kontext von Zellzyklus und weiteren Kofaktoren bedingen dabei die vielfältigen Effekte von P53 und sind deshalb entscheidend für die Gradwanderung zwischen physiologischer und pathologischer Zellfunktion. Die funktionellen Konsequenzen der Akkumulation und Aktivierung von P53 im Zellkern lassen sich grob als Zellzyklusarrest, Quieszenz (Zellruhe), Seneszenz und Apoptose beschreiben. Wichtigster Effektor von P53 in der Einleitung des Zellzyklusarrestes ist der Zyklin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1A (CDKN1A), durch den P53 den Zellzyklus bei DNA-Schäden in der G₁-Phase anhalten kann und dadurch die Reparatur von DNA-Schäden möglich wird (Harper et al. 1993). Der Zellzyklusarrest durch P53-Aktivität ermöglicht eine effektive Reparatur von DNA-Schäden auch, weil P53 direkt DNA-Reparaturgene induziert (Kastan et al. 1991; Williams und Schumacher 2016). Die zeitlich stabile Zellruhe in der G₀-Phase, die zelluläre Quieszenz, ist ein wichtiger Mechanismus zur Unterhaltung der Stammzellreserve und wird von P53 durch den Effektor PCL1 wesentlich beeinflusst (Brien und Bracken 2015). Zur Einleitung zellulärer Seneszenz sind Interaktionen mit dem Retinoblastoma-Gen (*RB*) beschrieben, während die Induktion der Apoptose wesentlich durch die vermehrte Expression von pro-apoptotischen Genen der *BCL-2* Familie vermittelt wird (Kastanhuber und Lowe 2017). Auch die Einleitung zellulärer Differenzierung wurde als Funktionen von reaktiviertem P53 in Tumorzellen gezeigt (Messina et al. 2012). Die P53-vermittelten Zellreaktionen sind dabei nicht nur durch die transkriptionelle Aktivierung von Genen verursacht, sondern auch durch transkriptionelle Repression antagonistischer Gene wie B-cell-lymphoma-Protein 3 (*BCL3*) (Rocha et al. 2003). Neben der klassischen Funktion von P53 als Transkriptionsfaktor, der sequenzspezifisch an responsive DNA-Muster bindet und die Transkription

proteinkodierender DNA-Abschnitte induziert, ist in den vergangenen Jahren die biologische Bedeutung von Mikro-RNAs in dem P53-Netzwerk deutlich geworden.

Mikro-RNAs sind kurze, nicht-proteinkodierende RNA-Segmente, die evolutionär hoch konserviert sind und die teilweise mit eigenem Promotor ausgestattet sind, teilweise durch Transkription des Wirtsgenes exprimiert werden (Bartel 2009). Die nur 18 bis 25 Nukleotide langen, reifen Mikro-RNAs binden zusammen mit dem Protein Argonaut (AGO) als RNA-induzierter-Stillegungskomplex (RISC) zytosolisch an die mRNA und hemmen so nach dem Prinzip der RNA-Interferenz die Translation der mRNA und leiten die Degradation der mRNA ein (Bartel 2009). Diese posttranskriptionelle Regulation der Proteinexpression geschieht dabei ebenfalls sequenzspezifisch, indem eine kurze Sequenz der Mikro-RNA (als *seed*-Sequenz bezeichnet) komplementär an die 3' untranslatierte Region der mRNA bindet (Schwarz et al. 2003). Durch die Kürze dieser Bindungssequenz von nur sieben bis acht, unter Umständen sechs Basen können einzelne Mikro-RNAs die Translation einer Vielzahl von Transkripten hemmen (Bartel 2009). Die erste entdeckte und bisher am besten beschriebene Mikro-RNA, die Teil des P53-Netzwerks ist, sind die *Mikro-RNA-34a* (*miR-34a*) und die eng verwandten *Mikro-RNA-34b/c* (*miR-34b/c*) (Luo et al. 2018). *MiR-34a* und *miR-34b/c* werden direkt von P53 induziert und können durch posttranskriptionelle Repression die Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie Zyklin E und Zyklin-abhängige-Kinase 4 (CDK4) und 6 (CDK6) hemmen (Chang et al. 2007; Luo et al. 2018). Abhängig vom P53-stabilisierenden Stimulus werden verschiedene Mikro-RNAs hochreguliert, sodass dieses P53-responsive Mikro-RNA Muster wesentlich ist für die zelluläre Reaktion auf Zellstress und dementsprechend mit über Zellzyklusarrest und Apoptose entscheidet (Chang et al. 2013). P53-responsive Mikro-RNAs greifen auch in die Stabilität von P53 selbst ein (durch Repression von MDM4) und bedingen so eine positive Rückkopplung innerhalb des tumorsuppressiven P53-Netzwerks (Luo et al. 2018). P53 beeinflusst auch das Prozessieren von Mikro-RNAs, sodass die funktionelle Beziehung zwischen P53 und einigen Mikro-RNAs über einfache Effektoren von P53 hinaus gehen (Suzuki et al. 2009; Chang et al. 2013; Krell et al. 2015; Goeman et al. 2017).

Neben der Funktion von P53 als Transkriptionsfaktor vieler Zielgene und Mikro-RNAs nimmt P53 auch eine wichtige Position in der epigenetischen Chromatin-Modulation ein (Mishra et al. 2015). Eine neu entdeckte, noch unvollständig verstandenes Element im P53-Netzwerk sind lange nicht kodierende RNAs (lncRNA), in verschiedenen Ebenen der Genexpression eingreifen können und deren Funktionsprinzip sich nicht auf RNA-Interferenz beschränkt (Chaudhary und Lal 2017).

Das P53-Netzwerk agiert also neben der klassischen Induktion von proteinkodierenden Genen auch durch nachgeschaltete Feinregulation mittels RNA-Interferenz und Chromatin-Modulation, was die Effekte einer P53-Aktivierung oder –Inaktivierung vervielfältigen und weitere Funktionen neben der Tumorsuppression vermuten lassen. Zusätzlich sind der gewebliche Kontext und der Zelltyp entscheidend für die P53-abhängige Genregulation, sodass im folgenden Kapitel Aufbau und Funktion des Bronchialepithels einführend dargestellt werden.

1.5 Aufbau und Funktion des Bronchialepithels

Das respiratorische Epithel der konduktiven Atemwege besteht aus einem pseudostratifizierten mehrreihigen Epithel, das durch seinen spezialisierten Aufbau die eingeatmete Luft anfeuchten, reinigen und chemosensibel überprüfen kann (Abbildung 1). Der mukoziliären Reinigung kommt dabei eine besondere pathophysiologische Bedeutung bei der COPD zu. Die spezialisierten Zelltypen des respiratorischen Epithels der oberen und großen Atemwege sind dabei multizilierte Flimmerzellen, Becherzellen, Basalzellen, neuroendokrine Zellen und Bürstenzellen (Crystal et al. 2008). Weiter nach distal bis in die *Bronchioli terminales* und *Bronchioli respiratorii* und die *Ductus alveolares* verlieren sich zunächst die Becherzellen und werden durch Keulenzellen¹ ersetzt. Der Anteil der Flimmerzellen nimmt nach distal ebenfalls ab (Toskala et al. 2005). Die neuroendokrinen Zellen sind gruppiert und häufig an bronchialen Aufzweigungen angeordnet und stellen Stammzellnischen der distalen Atemwege dar (Song et al. 2012). Die Bürstenzellen nehmen die Funktion von Chemosensoren ein und sind an der Entstehung des Hustenreizes bei Inhalation reizender Stoffe beteiligt (Reid et al. 2005). Die Basalzellen dienen der Zellerneuerung in den großen Atemwegen und stellen damit gewebespezifische Progenitorzellen dar. Die Alveolen werden von Pneumozyten des Typs 1 und 2 ausgekleidet, wobei die flachen Pneumozyten Typ 1 die weitaus größte Oberfläche der Alveolen bedecken, während die Pneumozyten Typ 2 der Surfactant-Produktion und der Zellerneuerung der Alveolen dienen (Adamson und Bowden 1975; Uhal 1997).

¹ Keulenzellen wurden bis in die 2010er Jahre nach ihrem Entdecker Max Clara als „Clara-Zellen“ bezeichnet. Die histologische Entdeckung dieses sekretorischen Zelltyps in den distalen Atemwegen machte der überzeugte Nationalsozialist Max Clara an Lungenproben hingerichteter KZ-Häftlinge, an denen er auch einzelne Versuche zu Lebzeiten kurz vor der Exekution durchführte (Winkelmann und Noack 2010). Auch wenn in weiten Teilen der internationalen Literatur der Terminus „Clara-Zellen“ lange gebräuchlich war, wird in dieser Arbeit bewusst dieses nationalsozialistische Eponym nicht verwendet. Vergleiche dazu auch die offizielle Stellungnahme der European Respiratory Society (Woywodt et al. 2010).

Das Epithel der Atemwege ist von einer zweischichtigen Schleimschicht bedeckt, bei der die obere, visköse Schicht dem Einfangen von inhalierten Partikeln dient und die darunter liegende, flüssigere Schicht eine Bewegung der Zilien der Flimmerzellen erlaubt, sodass ein kontinuierlicher Transport der partikeltragenden Schicht nach oral erfolgt (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Die visköse Schleimschicht ist sowohl das Produkt der Becherzellen als auch der seromukösen Bronchialdrüsen, die zumeist zwischen der Muskelschicht und der knorpeligen und bindegewebigen Adventitia der Bronchien zu liegen kommen (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). In den distalen Atemwegen wird der Bronchialschleim außerdem von den Keulenzellen gebildet und enthält neben schleimbildenden Glykoproteinen auch antiinfektiv wirkende Surfactant-Proteine (wie Surfactant-Protein-A und -D (SP-A und SP-D)) und immunmodulierende Proteine (wie Sekretoglobulin-Familie 1A Mitglied 1 (SCGB1A1)) (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Das Bronchialepithel unterliegt einer ständigen Regeneration, die essentiell für eine adäquate Reaktion auf Umwelteinflüsse ist und bei der Fehlfunktionen in engem Zusammenhang mit der Pathophysiologie der COPD gebracht wurden (Puchelle et al. 2006). Gleichzeitig ist der Zellumsatz des gesunden Bronchialepithels deutlich langsamer als in anderen epithelialen Organen, so konnte für die Flimmerzellen des Bronchialepithels der Maus eine durchschnittliche Halbwertszeit von 17 Monaten gezeigt werden (Rawlins und Hogan 2008). Dieser langsame Zellumsatz macht die enorme notwendige Steigerung der Proliferationsrate nach schweren Schädigungen des Epithels deutlich und verschärft die Frage nach der Regulation der Regeneration des Bronchialepithels.

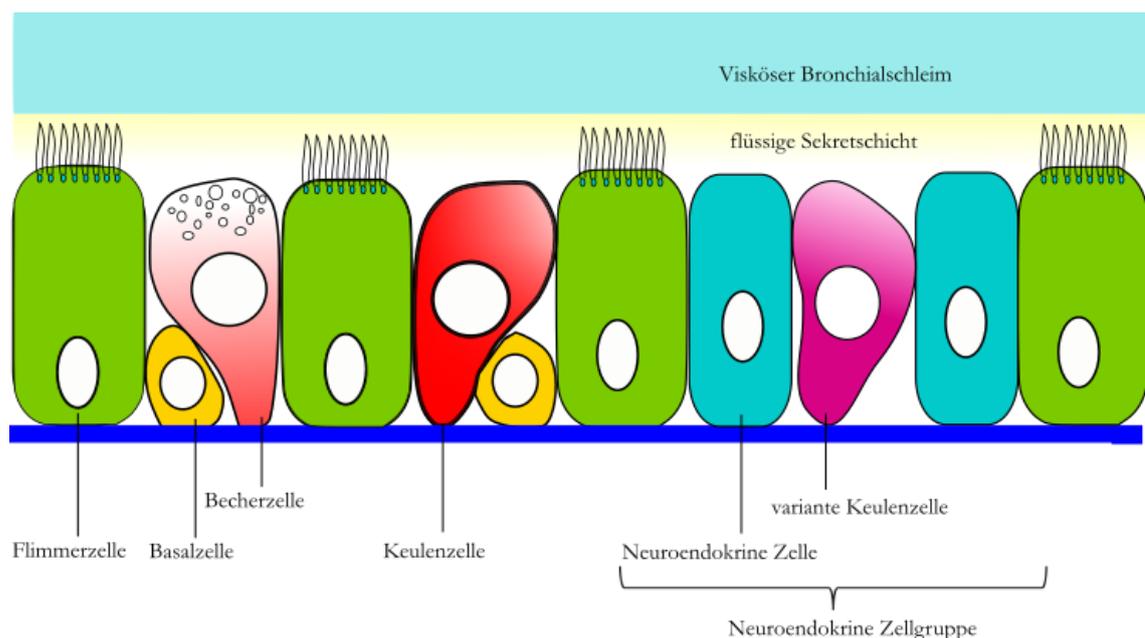


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des respiratorischen Epithels.

1.5.1 Zelltypen des respiratorischen Epithels und ihre Regeneration

1.5.1.1 Flimmerzellen

Die Flimmerzellen sind charakteristische differenzierte, postmitotische Zellen des respiratorischen Epithels, die mit ihren multiplen Kinozilien an der apikalen Zelloberfläche den Bronchialschleim nach oral transportieren (Rawlins und Hogan 2008). Die Kinozilien der Flimmerzellen zeigen den typische ultrastrukturellen Aufbau eines beweglichen Ziliums aus einem zentralen Mikrotubulus-Skelett (bestehend aus neun kreisförmig angeordneten Mikrotubuli-Dubletten und einem zentralen Mikrotubulus-Paar, vergleiche dazu auch Abbildung 21) und assoziierten Motorproteinen, welche das Zilium bewegen (Vertii et al. 2016). Die Motorproteine sind als innere und äußere Dyneinarme angeordnet und ermöglichen die ATP-abhängige Biegung des Ziliums mit anschließendem schnellen Rückschlag, sodass eine progressive Bewegung des Bronchialschleims entsteht (Ishikawa 2017). Die Flimmerzellen tragen zwischen 30 und 300 Kinozilien auf ihrer apikalen Zelloberfläche, deren koordinierter Schlag den Bronchialschleim transportiert (Spassky und Meunier 2017). Die Kinozilien sind an Basalkörpern im apikalen Zytoplasma angeheftet, deren ultrastruktureller Aufbau derer von Zentriolen stark ähnelt (Vertii et al. 2016). Dementsprechend wird auch die Biogenese der Basalkörper von ähnlichen Regulationsmechanismen gesteuert wie die Zentriolen-Duplikation im Zellzyklus (Al Jord et al. 2014). Die Differenzierung von Flimmerzellen unterliegt einer komplexen Regulation, wobei die Unterdrückung des NOTCH-Signalweges entscheidend ist (Marcet et al. 2011; Lafkas et al. 2015; Spassky und Meunier 2017). An eben dieser Suppression nimmt die Mikro-RNA-449 (*miR-449*) Teil (Lizé et al. 2010; Marcet et al. 2011). Darüber hinaus ist TAP73 ein zentraler Regulator in der Multiziliogenese und kooperiert mit *miR-449* in der Entwicklung von Flimmerepithelien (Marshall et al. 2016; Nemaierova et al. 2016; Wildung et al. 2018). Flimmerzellen entstehen in den größeren Atemwegen aus den Basalzellen, in den kleinen Bronchioli aus sogenannten varianten Keulenzellen mit Progenitoreigenschaften (Hong et al. 2004; Rawlins et al. 2009). In die Differenzierung von Flimmerzellen sind also Mitglieder der P53-Familie eng eingebunden, ohne dass eine unmittelbare Funktion von P53 beschrieben wurde.

1.5.1.2 Keulenzellen

Keulenzellen bilden die zweite häufige Zellpopulation in den kleinen Atemwegen. Beim Menschen finden sich Keulenzellen besonders in den terminalen und respiratorischen Bronchioli, bei der Maus bilden Keulenzellen den wichtigsten sekretorischen Zelltyp bis in

die Hauptbronchien. Die typischerweise keulenförmigen Zellen nehmen eine Reihe wichtiger Aufgaben wahr: Die Sekretion von Bestandteilen des Bronchialschleims (wie SCGB1A1 und Surfactant-Proteine), die Metabolisierung inhalierter Fremdstoffe durch Zytochrome (wie CYP450 2F2) und der Ersatz von apoptotischen oder nekrotischen Epithelzellen (Hogan et al. 2014). Keulenzellen können in den kleinen Bronchioli durch Zellteilung sowohl den Bestand der Keulenzellen selbst als auch den von Flimmerzellen erhalten, in den proximalen Bronchien entstehen sie aus Basalzellen, können sich aber ebenfalls zu Flimmerzellen differenzieren (Rawlins et al. 2009). Für die Vorläuferzeleigenschaft der Keulenzellen ist eine Subpopulation verantwortlich, die nach schweren Schädigungen des Epithels proliferiert und sich teilweise zu Flimmerzellen differenziert (Giangreco et al. 2002; Rawlins et al. 2009). Diese Keulenzellen, die wenig detoxifizierende Zytochrome exprimieren und an den gruppierten neuroendokrinen Zellen (Neuroendokrine Körper, NEB) vorkommen, exprimieren Sekretoglobulin-Familie 3A Mitglied 2 (SCGB3A2) und Uroplakin 3A und werden als variante Keulenzellen bezeichnet (Giangreco et al. 2002; Reynolds et al. 2002; Guha et al. 2012). Neben der Rolle der Keulenzellen als gewebespezifische Progenitorzellen in den distalen Atemwegsepithelien mehren sich jedoch auch die Nachweise spezialisierter, peripheren Stammzellen an den bronchoalveolären Übergängen (Kim CFB et al. 2005; Kumar et al. 2011). Diese exprimieren unter der Kontrolle des NOTCH-Signalweges Δ NP63 und Keratin 5 (KRT5) (Vaughan et al. 2015). Kajstura und Kolleg*innen (2011) zeigen im Menschen sogar KIT Proto-Onkogen (KIT) positive multipotente Stammzellen, die sich zu respiratorischen Epithelien und zu Pulmonalgefäßen differenzieren können und von denen aus dann P63 und KRT5 positive Basalzellen abstammen. Als verbindenden Befund in dem wissenschaftlichen Streit um die Regeneration der distalen Bronchioli kann gelten, dass auch differenzierte Keulenzellen nach der Depletion KRT5-positiver Stammzellen in den Atemwegen sich wieder zu Stammzellen dedifferenzieren können und zeitlich stabil ein voll differenziertes Bronchialepithel hervorbringen (Tata et al. 2013). Als weiteres Konzept der Zellregeneration in den distalen Atemwegen schlagen Ortega-Martínez und Kolleg*innen (2015) Stammzellen vor, die aus dem Knochenmark über den Blutstrom in die Lunge migrieren. Weitere Hinweise auf diese Form der zellulären Erneuerung in der Lunge fehlen aber. Die zelluläre Differenzierung zu sekretorischen Keulenzellen oder Flimmerzellen bedarf sowohl im homöostatischen Zellumsatz als auch nach größeren epithelialen Schäden einer Balance zwischen beiden Zelltypen. Der NOTCH-Signalweg ist dabei ein zentraler Differenzierungsmechanismus, denn eine hohe Aktivität dieses Signalwegs bedingt eine Differenzierung von Basalzellen zu Keulen- und Becherzellen, während die

Inhibition dieses Weges eine Differenzierung zu Flimmerzellen ermöglicht (Rock et al. 2011). Im Mausmodell konnte die therapeutische Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die NOTCH-Liganden JAG1 und JAG2 zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition des NOTCH-Signalweges direkt zu einer massiven Transdifferenzierung von Keulenzellen zu Flimmerzellen führt (Lafkas et al. 2015).

1.5.1.3 Basalzellen

Die Basalzellen kommen in den großen Atemwegen (bei der Maus nur bis in die Hauptbronchien, beim Menschen bis weit in die distalen Atemwegsgenerationen) vor und dienen als epitheliale Vorläuferzellen (Hong et al. 2004). Sie kommen im unteren Kompartiment des pseudostratifizierten Epithels vor und erreichen so die Oberfläche des Epithels nicht. Sie haben Stammzeleigenschaften und können sich zu allen Zelltypen des Bronchialepithels differenzieren und werden bei der Luft-Flüssigkeits-Interphasen-Kultur (ALI) genutzt, um die *in-vitro*-Differenzierung des respiratorischen Epithels studieren zu können (Rock et al. 2009). Basalzellen exprimieren die aminoterminal verkürzte Isoform von P63 (Δ NP63), die dominant negative Effekte auf die P53-Effektoren ausübt und so den Zellzyklus der Basalzellen unterhält (Chilosi und Doglioni 2001). Weitere wesentliche Marker der Basalzellen sind Keratin 5 und 14 (KRT5, KRT14) (Cole et al. 2010; Akram et al. 2016). Für die Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen ist darüber hinaus die Geschlechts-determinierende-Region-Y-Box 2 (SOX2) unter der Kontrolle des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (FGFR2) notwendig (Balasooriya et al. 2017). Veränderungen an den Basalzellen sind besonders für die Entwicklung der COPD von Bedeutung. Rauchen verändert die Transkription einer Reihe von Genen besonders in den Basalzellen, sodass Basalzellen besonders frühe Veränderungen bei der Exposition gegenüber Zigarettenrauch zeigen (Ryan et al. 2014). Diese Veränderungen scheinen einem Genexpressionsmuster ähnlich, welches der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) entspricht (Sohal et al. 2010; Sohal 2018). Die Becherzell-Metaplasie und relative Reduktion von Flimmerzellen bei der frühen COPD ist ebenso eine Folge veränderter Basalzellfunktion, weil Basalzellen von COPD-Patienten eine geringere Proliferationsrate und eine Differenzierung zu sekretorischen Zellen aufweisen (Ghosh et al. 2018).

1.5.1.4 Becherzellen

Becherzellen stellen den hauptsächlichsten sekretorischen Zelltyp der Trachea und großen Bronchien dar. Ihr Sekretionsprodukt beinhaltet Muzine (wie MUC5AC und MUC5B) und bildet die visköse obere Schicht des Bronchialsekrets. Die Hyperplasie der Becherzellen des

Bronchialepithels ist eine frühe und typische Veränderung der COPD und stellt eine Ursache der fixierten Atemwegsstenose durch den erhöhten viskösen Widerstand in der Expiration dar (Hogg 2004). Becherzellen entstehen durch die Ausdifferenzierung von Basalzellen oder die Transdifferenzierung von Keulenzellen (Evans et al. 2004). Diese Transdifferenzierung kann direkt von Tabakrauch induziert werden und nimmt daher eine herausragende Position in der Entstehung der COPD ein (Gensch et al. 2004). Ähnlich wie die Differenzierungskontrolle der Keulenzellen kann auch die Differenzierung von Becherzellen durch die Aktivierung des NOTCH-Signalweges eingeleitet werden (Guseh et al. 2009). Der Transkriptionsfaktor SAM-punktierte-Domänen-enthaltender-Ets-artiger-Faktor (SPDEF) gilt als zentraler Regulator der Differenzierung von Becherzellen (Chen et al. 2009). SPDEF wird dabei indirekt von P53 durch dessen Antagonismus gegenüber BCL-2 reguliert, sodass Polymorphismen im P53-Gen einen Einfluss auf den Anteil der Becherzellen haben kann (Chand et al. 2014).

1.5.1.5 Neuroendokrine Zellen

Neuroendokrine Zellen kommen im Bronchialepithel gruppiert als Neuroendokrine Körper (NEB) vor allem an Aufzweigungen der Bronchien vor und sind durch eine basale autonome Innervation sowie einen apikalen Bürstensaum gekennzeichnet (Song et al. 2012). Sie enthalten Vesikel mit biogenen Aminen wie Serotonin und Transmitterpeptiden wie Substanz P und nehmen an der Regulation des Tonus der Bronchialmuskulatur, der Regulation des Pulmonalkreislaufs sowie der Sauerstoff-Wahrnehmung teil (Song et al. 2012). Song und Kolleg*innen (2012) zeigen auch, dass die neuroendokrinen Zellen des Bronchialepithels Keulenzellen und Flimmerzellen hervorbringen können, allerdings ohne dass die Zellverteilung von Flimmerzellen und Keulenzellen nach der spezifischen Depletion der neuroendokrinen Zellen verändert wäre. Die Bedeutung dieses Differenzierungsvorgangs bleibt also *in vivo* fraglich.

1.6 Herleitung der Fragestellung

Die Funktionen von P53 sowohl in der Erhaltung der normalen Funktion der Lunge als auch dessen Rolle in der Pathogenese der COPD bleiben, wie bisher dargestellt, widersprüchlich.

Klinisch findet sich auf Proteinebene mehr P53 in Alveolarzellen (insbesondere in Pneumozyten Typ II), aber auch in Bronchialepithelzellen und T-Zellen bei Patient*innen mit COPD (Hodge 2005; Morissette et al. 2008; Sigasaki et al. 2010; Gogebakan et al.

2014). Gleichzeitig zeigt sich eine verstärkte Apoptose sowohl der Alveolarzellen als auch der bronchialen Epithelzellen bei Lungenproben von COPD-Patient*innen, was eine proapoptotische Funktion von P53 auch in der Pathogenese der COPD nahe legt (Yokohori et al. 2004; Gogebakan et al. 2014). Diese proapoptotische Aktivität von P53 scheint im Falle der COPD durch DNA-Schäden bedingt zu sein (Aoshiba et al. 2012). Allerdings zeigen Pneumozyten des Typs II trotz der erhöhten P53-Expression eine verstärkte Proliferation, sodass hier ein Verlust der Zellzykluskontrolle durch P53 vermutet werden kann (Yokohori et al. 2004; Imai et al. 2005). Polymorphismen in *MDM2* und *TP53*, die einen geringeren P53-Abbau beziehungsweise eine höhere antiproliferative Potenz aufweisen, zeigen Assoziationen zur Schwere des Emphysems bei COPD-Patient*innen (Mizuno et al. 2017). Auch der häufigste bekannte Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist direkt mit der proapoptotischen Funktion von P53 verknüpft: Zigarettenrauch kann P53 in Pneumozyten Typ II induzieren und durch die Stabilisierung der mRNA von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI1) direkt die Apoptose in diesen Zellen auslösen (Shetty et al. 2012). P53 kann also durch die Induktion der Apoptose von Alveolar- und Bronchialepithelzellen zur Parenchymdestruktion bei der COPD beitragen.

Im Bronchialepithel zeigt sich zugleich die protektive Bedeutung von P53 für die Kontrolle des Zellzyklus und die Differenzierung insbesondere von Keulenzellen: Der Verlust von P53 in Keulenzellen führt zum beschleunigten Zellzyklus und zellulären Aberationen wie Mehrkernigkeit und vermehrten Zentrosomen (Armit et al. 2002). McConnell und Kolleg*innen (2016) konnten erst kürzlich zeigen, dass das spezifische Ausschalten von *Trp53* in Keulenzellen von Mäusen zu einer vermehrten Proliferation (*in vivo* und *in vitro*) der Keulenzellen und zu einer verminderten Differenzierung hin zu Flimmerzellen in den Bronchioli führt. Dieses Bild gleicht den zellulären Veränderungen im Bronchialepithel von COPD-Patienten: eine Hyperplasie der sekretorischen Zellen zulasten der Flimmerzellen sind typische frühe Veränderungen der COPD (Hogg 2004). Das Gleichgewicht zwischen sekretorischen Keulenzellen mit Vorläufer-Eigenschaften und Flimmerzellen wird in diesem Modell mit dem CDKN1A(P21)-vermittelten Zellzyklusarrest erklärt und die Differenzierungsfunktion von P53 als entscheidend für die Homöostase des Bronchialepithels bezeichnet (Lin et al. 2005; Jain et al. 2012; McConnell et al. 2016). Demgegenüber konnten Zhou und Kolleg*innen (2011) zeigen, dass die verstärkte Seneszenz von Keulenzellen zu reduziertem regenerativen Potential des Bronchialepithels und in der Folge zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt. Der Einfluss der Seneszenz von Keulenzellen auf die bronchiale Entzündungsreaktion als eine biologische Folge der Aktivierung von P53 zeigen Sagiv und Kolleg*innen (2018): Der

zellienenspezifische Knock-out von *Trp53* in den Keulenzellen der Maus führt zu einer reduzierten Seneszenz und reduzierter Entzündungsreaktion nachdem das Epithel Lipopolysacchariden ausgesetzt wurde. P53 ist also wichtig für die Balance der Zelltypen im Epithel der kleinen Atemwege; die P53 bedingte Seneszenz von Keulenzellen hemmt aber die regenerative Funktion der Keulenzellen und fördert chronische bronchiale Entzündungen. Aus der oben skizzierten Diskussion um den Ursprung der zellulären Regeneration des Bronchialepithels der kleinen Atemwege stellt sich also die Frage, welche Auswirkungen auf die zelluläre Zusammensetzung des Epithels ein Fehlen von P53 in allen Zellen des Bronchialepithels hat. Gleichzeitig fehlt eine Synthese beider Befunde, die einerseits die P53-bedingte Seneszenz als Ursache für verminderte Regeneration und verstärkte Entzündungsreaktionen am Bronchialepithel und andererseits die P53-vermittelte Differenzierung und Balance der Zelltypen erklärt. Konkret stellt sich die Frage, wie die Funktion des bronchialen Epithels durch P53 beeinflusst wird. Für beides werden die P53-abhängigen Effektoren *Ckdn1a* und *miR-34* verantwortlich gemacht, sodass auch ihre singuläre Funktion in der Differenzierung, Regeneration und Funktion des Bronchialepithels Gegenstand dieser Arbeit ist.

Im Gegensatz zu den Befunden von Sagiv und Kolleg*innen (2018) stellen Madenspracher und Kolleg*innen (2013) fest, dass P53 die Entzündungsreaktion der primären zellulären Immunität des Lungengewebes reduziert und damit entzündlich bedingte Gewebeschäden vorbeugt. *Trp53* defiziente Mäuse zeigen nach Installation gramnegativer Bakterien eine deutlich verstärkte Makrophagen- und Neutrophilenaktivität, deren entzündlicher Effekt einen Lungenphänotyp erzeugt, welcher der COPD ähnlich ist (Liu et al. 2009). Ganz ähnlich zeigen Chrusciel und Kolleg*innen (2016), dass P53 defiziente Alveolarmakrophagen in einem Modell des pulmonalen Emphysems deutlich mehr MMP12 exprimieren als Wildtyp-Makrophagen, wobei humanes MMP12 das führende ursächliche Enzym des Lungenemphysems bei COPD-Patient*innen ist.

In den Entzündungszellen der Lunge konnte also eine entzündungshemmende Eigenschaft von P53 gezeigt werden, während im Bronchialepithel P53 eine indirekt entzündungsfördernde Funktion zugeschrieben wird. Daraus ergibt sich allerdings weiterhin die Frage, welchen Einfluss P53 auf die Entzündungsreaktion der Bronchialepithelzellen hat.

Insgesamt kondensiert sich die forschungsleitende Frage folgendermaßen:

- Welche Funktionen erfüllt P53 im Erhalt der Lungengesundheit?

Bezogen auf die pathogenetischen Hauptmechanismen der COPD lässt sich diese Frage genauer ausformulieren:

- Welchen Einfluss hat P53 auf das Entzündungsgeschehen in den Atemwegen?
- Beeinflusst P53 den Aufbau und die Funktion des Bronchialepithels und welchen Anteil daran haben *Ckdn1a* und *miR-34*?

Angesichts der kontroversen Befunde aus tierexperimentellen Untersuchungen und epidemiologischen Studien ergibt sich darüber hinaus folgende Fragestellung, unter welcher die eigenen experimentellen Ergebnisse und die bestehende Literatur reflektiert werden soll:

- Stellt das globale Fehlen von P53 in der Maus ein adäquates genetisches Modell der COPD dar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodelle

Wie in der Einleitung erwähnt, folgen das humane und das murine P53-Netzwerk denselben Prinzipien und operieren über evolutionär konservierte Mechanismen. Daher wird die Maus (*Mus musculus*) als verbreiteter Modellorganismus in dieser Arbeit genutzt und ihr Lungenphänotyp beim konstitutiven Knock-out von *Trp53*, *Cdkn1a* und *miR-34a* untersucht.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt sieben Kohorten männlicher und weiblicher Mäuse verwendet. Der genetische Hintergrund aller experimentellen Kohorten ist der C57BL/6N Inzuchtstamm (Charles River), für den eine Reihe künstlicher Nullmutationslinien vorliegen. In jeder Kohorte wurde durch Kreuzung von, für das betreffende Gen, heterozygoten Männchen und Weibchen Tiere erzeugt, die homozygot das Wildtyp-Gen tragen, homozygot für die entsprechende Nullmutation sind (Knock-out) oder ebenfalls heterozygote Anlagenträger sind. Durch die enge Inzucht Kreuzung über mindestens 11 Generationen weisen alle untersuchten Tiere eine hohe genetische Homogenität auf, sodass phänotypische Unterschiede auf die jeweils untersuchten Gene (durch Vergleich zwischen der Wildtyp- und der Nullmutationsvariante) zurückgeführt werden können. Die Tiere wurden nach der Geburt durch eine Ohrmuschelbiopsie (welche im Rahmen des Identifizierungscodes angelegt wurde) PCR-basiert genotypisiert und danach in die jeweilige experimentelle Gruppe eingeteilt. Alle Tiere, bis auf die Tiere der *Cdkn1a*-Kohorte, lebten in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen (ZTE) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF-Bedingungen). Für diese SPF-Haltung erhielten die Tiere in den luftdichten Haltungskäfigen eine gefilterte und getrennte Belüftung, autoklaviertes Wasser und autoklavierte Futtermittel *ad libitum* sowie autoklaviertes Einstreu. Die Tiere lebten unter einem regelmäßigen, zwölfstündig wechselnden Rhythmus aus Helligkeit und Dunkelheit. Die Tiere wurden regelmäßig pflegerisch untersucht und die Pathogenfreiheit durch Stichproben tierärztlich sichergestellt. Die allgemeine geschlechtergetrennte Haltung ermöglichte die gezielte Zucht und die Reinhaltung der einzelnen Nullmutationslinien. Die

Haltung und Zucht der Mausstämme erfolgte insgesamt nach den Richtlinien der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und den Vorgaben des niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Dezernat Tierschutzdienst).

2.1.1.1 *Trp53*-Knock-out Linie

In dieser Studie wurden fünf *Trp53*-Knock-out/Wildtyp Kohorten verwendet. Die *Trp53*-Nullmutationslinie ist seit 1994 bekannt und wurde erstmals von Tyler Jacks publiziert, bei der durch homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen die *Trp53* Gensequenz von Exon 2 bis Exon 7 durch die *neo*-(Neomycin-Resistenzgen)-Genexpressionskassette ersetzt wurde (Jacks et al. 1994). Das Alter, die Geschlechterverteilung sowie die Genotypen sind in Tabelle 1 systematisch dargestellt. Die Referenzkohorte sind dabei 16 Wochen alte, männliche und weibliche Mäuse, von denen vier homozygot für *Trp53* in der Wildtyp-Variante und vier homozygot für *Trp53*-Knock-out sind. Die Wildtyp-Kohorte besteht aus drei Männchen und einem Weibchen, die *Trp53*-Knock-out-Kohorte besteht aus vier Männchen. Für die Mukoziliäre-Reinigungs-Untersuchung wurden je fünf 15 Wochen alte *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out Männchen untersucht. Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 2.2.7 dargestellt. Für das Emphysemmodell mittels intratrachealer Elastase-Inhalation wurden fünf *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out Tiere genutzt (je vier Männchen und ein Weibchen). Das Vorgehen ist in 2.2.1.1 beschrieben. Die gealterte Kohorte besteht aus je drei Wildtyp und drei *Trp53*-Knock-out Tieren, die alle männlich waren. Für das epitheliale Regenerationsmodell mittels Naphthalin-Injektion wurden 24 Mäuse, je zwölf pro Genotyp, genutzt. Eine Beschreibung des Regenerationsmodells findet sich in Abschnitt 2.2.1.2.

Tabelle 1: Übersicht über die tierexperimentellen *Trp53*-Kohorten

	Alter (Wochen)	Wildtypen		<i>Trp53</i> -Nullmutanten	
		Weiblich	Männlich	Weiblich	Männlich
Referenzkohorte	16	1	3	0	4
Mukoziliäre- Reinigungs-Kohorte	15	0	5	0	5
Emphysemmodell	14	1	4	1	4
Gealterte Kohorte	26	0	3	0	3
Regenerationsmodell	15	0	12	0	12

2.1.1.2 *Cdkn1a* Knock-out Linie

Auch die *Cdkn1a*-Knock-out Linie ist vor dem C57BL6/N-Hintergrund durch enge Inzucht genetisch homogen. Hier wurden vier Wildtypen und fünf *Cdkn1a*-Nullmutanten Tiere verglichen. Die Tiere waren 32 Wochen alt, sodass kein direkter Vergleich zwischen den *Trp53*-Knock-out und den *Cdkn1a*-Knock-out Tieren wegen der zusätzlichen unabhängigen Variablen Alter möglich ist. Auch waren bei der *Cdkn1a*-Linie deutlich weniger männliche Tiere verfügbar, sodass für die experimentelle Kohorte nur vier männliche Nullmutanten zur Verfügung standen. Zusätzlich fand die Zucht und Tierhaltung dieser Kohorte nicht unter SPF-Bedingungen statt, sodass die Pathogenbelastung weniger gut kontrolliert war als bei den übrigen Kohorten.

2.1.1.3 *miR-34a* Knock-out Linie

Die *miR-34a*-Knock-out Linie wurde vor dem C57BL6/N-Hintergrund gezüchtet. Die Tiere wurden in einem Alter von 15 Wochen untersucht. Auch in dieser Kohorte wurden, um hormonelle Einflüsse auf die Expression von Sekretoglobulin (*Scgb1a1*) auszuschließen, nur die männlichen Tiere untersucht. Damit ergab sich eine Gruppengröße von drei Wildtyp- und drei *miR-34a*-Knock-out Tieren.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Blockierlösung.

Chemikalie	Menge
PBS	899 μ l
FCS	100 μ l
Octoxinol 9	1 μ l

Tabelle 3: DAB-Lösung.

Chemikalie	Menge
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	1 g
PBS	40 ml

Tabelle 4: DEPC-Wasser.

Chemikalie	Menge
Destilliertes Wasser	100 ml
Diethyldicarbonat	0,1 g unter Rühren über Nacht lösen, anschließend autoklavieren.

Tabelle 5: Eosin-Lösung.

Chemikalie	Menge
Eosin G	0,3 g
Destilliertes Wasser	300 g
Essigsäure	3 Tropfen

Tabelle 6: Phosphatpufferlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline), 10x.

Chemikalie	Menge
NaCl	236,9 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
CaCl ₂	1,2 mM
MgCl ₂	1,1 mM

Tabelle 7: Ponceau-S-Lösung.

Chemikalie	Menge
Ponceau S	0,5 g
Essigsäure, 100%	1 ml
Destilliertes Wasser	auffüllen auf 100 ml

Tabelle 8: RIPA-Puffer.

Chemikalie	Menge
TRIS-HCl-Puffer	20 mM, pH 7,5
EDTA	9,5 mM
Triton X100	1 %
SDS	0,1 %
Natriumdeoxycholat	1 %
Protease Inhibitor	2 Tabletten

Tabelle 9: SDS-Laufpuffer (10x).

Chemikalie	Menge
TRIS-Puffer	151 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
Destilliertes Wasser	5 l

Tabelle 10: SDS-Sammelgel.

Chemikalie	Menge
Destilliertes Wasser	10,5 ml
30 %ige Acrylamidlösung	2,5 ml
TRIS-Puffer, 1mol/l, pH 6,8	1,9 ml
SDS-Lösung, 10%	150 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10%	150 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15 µl

Tabelle 11: SDS-Trenngel (10% Acrylamid).

Chemikalie	Menge
Destilliertes Wasser	20 ml
30 %ige Acrylamidlösung	16,5 ml
TRIS-Puffer, 1mol/l, pH 8,8	12,5 ml
SDS-Lösung, 10%	500 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10%	500 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	20 µl

Tabelle 12: Transfer-Puffer.

Chemikalie	Menge
<i>Western</i> -Salze (10x)	200 ml
Methanol	300 ml
Destilliertes Wasser	1500 ml

Tabelle 13: TRIS-Glycin-Puffer.

Chemikalie	Menge
TRIS-Puffer, pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

Tabelle 14: Wasserstoffperoxidlösung.

Chemikalie	Menge
PBS	67,5 ml
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	7,5 ml

Tabelle 15: *Western*-Salze (10x).

Chemikalie	Menge
TRIS	60,55 g
Glycin	288 g
SDS	0,02 %
Destilliertes Wasser	2 l
Einstellen auf pH 8,3 mittels Essigsäure oder Natriumhydroxidlösung (1%).	

2.1.3 Kits

Tabelle 16: Histochemische und biochemische Kits.

Kitbezeichnung	Hersteller
<i>Prico-Sirius-Red Staining Kit</i>	Emergo Europe, Den Haag, Niederlande
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.4 Nukleinsäuren

Tabelle 17: Nukleinsäuren.

Nukleinsäure	Herstellerbezeichnung
Desoxyadenosintriphosphat, 25µmol/l	Promega, U1420
Desoxythymintriphosphat, 25µmol/l	Promega, U1420
Desoxycytosintriphosphat, 25µmol/l	Promega, U1420
Desoxyguanintriphosphat, 25µmol/l	Promega, U1420

2.1.4.1 Primer

Tabelle 18: Unspezifische Primer.

Primer	Hersteller
Oligo dT ₂₃ VN Primer	Metabion
Zufällige Nonamere	Metabion

Tabelle 19: Verwendete Primer und ihre Basensequenz.

Primerbezeichnung (alle murin)	Basensequenz
<i>36B4</i> vorwärts	GCAGATCGGGTACCCAACTGTTG
<i>36B4</i> rückwärts	CAGCAGCCGCAAATGCAGATG
<i>Mmp9</i> vorwärts	AAGGAGTTCTCTGGTGTGCC
<i>Mmp9</i> rückwärts	CTGCACGGTTGAAGCAAAGA

Primerbezeichnung (alle murin)	Basensequenz
<i>Mmp12</i> vorwärts	GGGCTGCTCCCATGAATGAC
<i>Mmp12</i> rückwärts	CCAGAGTTGAGTTGTCCAGTTG
<i>Mmp13</i> vorwärts	CTA TCC CTT GAT GCC ATT ACC AG
<i>Mmp13</i> rückwärts	ATC CAC ATG GTT GGG AAG TTC
<i>Timp1</i> vorwärts	AGAGACACACCAGAGCAGATAC
<i>Timp1</i> rückwärts	CACTGCGGTTCTGGGACTTG
<i>Timp2</i> vorwärts	TCAGAGCCAAAGCAGTGAGC
<i>Timp2</i> rückwärts	GCCGTGTAGATAAACTCGATGTC
<i>Timp3</i> vorwärts	CTTCTGCAACTCCGACATCGT
<i>Timp3</i> rückwärts	GGGGCATCTTACTGAAGCCTC
<i>Dnali1</i> vorwärts	AGAGACACACCAGAGCAGATAC
<i>Dnali1</i> rückwärts	CACTGCGGTTCTGGGACTTG
<i>Muc5B</i> vorwärts	ATGGGCAGCAGAACTGGAG
<i>Muc5B</i> rückwärts	TGTAAGGCGCTCATGCTAGG
<i>TAp73</i> vorwärts	AGCAGAATGAGCGGCAGCGTT
<i>TAp73</i> rückwärts	TGTTGGACTCCTCGCTGCCTGA
Δ <i>Np73</i> vorwärts	CAATTAGCAGCCTGGTCTCTGCCTGAC
Δ <i>Np73</i> rückwärts	GGTAGGCTGGAGAGTGGACAGGTTC
<i>Foxj1</i> vorwärts	CCATGCAGACCCCACCTGGCA
<i>Foxj1</i> rückwärts	GGGCAAAGGCAGGGTGGATGT
<i>Krt5</i> vorwärts	TCGAAACACCAAGCACGAGA
<i>Krt5</i> rückwärts	CTCCGTAGCCAGAAGAGACAC
<i>Nanog</i> vorwärts	CACCCACCCATGCTAGTCTT
<i>Nanog</i> rückwärts	ACCCTCAAACCTCCTGGTCCT
<i>Sox2</i> vorwärts	GAGTGGAAACTTTTGTCCGAGA
<i>Sox2</i> rückwärts	GAAGCGTGTACTTATCCTTCTTCAT
<i>Notch1</i> vorwärts	AGGGTGGTCAGGAAAATCATGT
<i>Notch1</i> rückwärts	AGGCACTGGCCACCATTG

Primerbezeichnung (alle murin)	Basensequenz
<i>Cyp2f2</i> vorwärts	ATGACCACACACAACCTGCT
<i>Cyp2f2</i> rückwärts	CCACCACACGGTCAATCTCT
<i>Mcm3</i> vorwärts	CGCAGGAAGAATGAAAAGAGGG
<i>Mcm3</i> rückwärts	CTGAGGAAGCAGGAAGTGAGAGTC

2.1.4.2 Taqman Mikro-RNA Kits

Tabelle 20: Taqman-Kits

Bezeichnung der Mikro-RNA	miRBase-Bezeichnung	Assay-Bezeichnung	Hersteller
RNU6-1	715680	001973	Thermo Scientific
mmu-mir-34a-5p	MIMAT0000542	000426	Thermo Scientific

2.1.5 Proteine

2.1.5.1 Proteinmarker

Tabelle 21: Proteinmarker

Proteinmarker	Hersteller
Vorgefärbte Proteinleiter, 10-180 kDa	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.5.2 Antikörper

Tabelle 22: Experimentell verwendete Antikörper und ihre Verdünnung.

Antikörperbezeichnung	Hersteller	Klonbezeichnung	Verdünnung
Monoklonaler Ratte Anti-CD68	Abcam	ab53444	1:100
Polyklonaler Ziege Anti-CD206	NovusBiological	AF 2535	1:100
Monoklonaler Maus	Santa Cruz	sc-390863	1:200

Antikörperbezeichnung	Hersteller	Klonbezeichnung	Verdünnung
Anti-MMP12			(Immunfluoreszenz) 1:300 (Western Blot)
Polyklonaler Kaninchen Anti- β -Aktin	Abcam	ab8227-50	1:2 000
Polyklonaler Kaninchen Anti-CYP4B1	Antikörper online.de	ABIN2777006	1:300
Monoklonaler Maus Anti-azetyliertes- α -Tubulin	Sigma	T 6793	1:200
Monoklonaler Maus Anti-TIMP1 (für Western Blot)	Invitrogen	MA1-773	1:600
Polyklonaler Ziegen Anti-TIMP1 (für Immunhistochemie)	R&D Systems	AF980	1:100
Polyklonaler Kaninchen Anti-SCGB1A1	Santa Cruz	sc-25555	1:300
Polyklonaler Kaninchen Anti-DNAI1	Atlas Antibodies	HPA 021649	1:1 000
Polyklonaler Ziege Anti-DNALI1	Santa Cruz	sc-160296	1:200
Alexa Fluor 594 Anti-Ziege (Esel)	Molecular Probes	A-11058	1:500
Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen (Ziege)	Molecular Probes	A11012	1:500
Alexa Fluor 594 Anti-Maus (Ziege)	Molecular Probes	A11005	1:500
Alexa Fluor 488 Anti-Maus (Ziege)	Molecular Probes	A21202	1:500
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen (Ziege)	Molecular Probes	A-11034	1:500
Alexa Fluor 555 Anti-	Invitrogen	A21434	1:500

Antikörperbezeichnung	Hersteller	Klonbezeichnung	Verdünnung
Ratte (Ziege)			
Anti-Ziege HRP-konjugiert (Esel)	Jackson	115-035-044	1:10 000
Anti-Kaninchen HRP-konjugiert (Esel)	Jackson ImmunoResearch	711-036-152	1:10 000
Anti-Maus HRP-konjugiert (Esel)	Jackson ImmunoResearch	715-036-150	1:10 000
Anti-Ziege biotinyliert (Esel)	Abcam	ab6884	1:200

2.1.5.3 Enzyme

Tabelle 23: Enzyme

Enzym	Hersteller mit Bezeichnung
Proteinase K (20x konzentriert)	New England Biolabs, P8107S
Pankreatische Elastase (Schwein)	Sigma-Aldrich, E1250
M-MuLV Reverse Transkriptase	New England Biolabs, M0253 L
Rekombinanter RNase Inhibitor	New England Biolabs, M0314 S
HRP-Streptavidin	Sigma-Aldrich, RABHRP3

2.1.6 Software

Für die quantitative Auswertung mikroskopischer Bilder von histologischen, immunhistochemischen und Immunfluoreszenzfärbungen werden die Aufnahmen im TIFF-Format aus dem Aufnahmeprogramm des Mikroskops exportiert (ZEN, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von ImageJ (Version 1.51j8, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Die Ergebnisse werden von ImageJ als Excel-Tabelle ausgegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit GraphPad Prism Version 6.00 für Windows (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA), ebenso die Erstellung der graphischen Datendarstellung. Die Auswertung von Western Blot-Signalen erfolgt mithilfe der Image Lab-Software von Bio Rad Laboratories (Hercules, USA), die speziell für die Chemilumineszenzdetektoren von BioRad entwickelt ist. Die

quantitativen Echtzeit-PCR wird durch die vom Hersteller mitgelieferte Software des „DNA Engine Peltier Thermal Cyclers“ (BioRad Laboratories, Hercules, USA) ausgewertet.

2.2 Methoden

2.2.1 *In-vivo*-Modelle

2.2.1.1 Pulmonales Emphysemmodell

Als Krankheitssimulation eines pulmonalen Emphysems werden fünf Wildtypen und fünf *Trp53*-Nullmutanten (je vier Männchen und ein Weibchen) behandelt und anschließend untersucht. Die Tiere im Alter von 14 Wochen werden inhalativ durch Zugabe von Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethylether) in einem Induktionsgefäß in die Anästhesie eingeleitet. Nach klinisch ausreichender Narkosetiefe werden die Mäuse mithilfe eines 20 Gage peripheren Venenverweilkatheters intubiert und die Narkose mittels eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches aufrechterhalten. Durch eine kurzzeitige Diskonnektion der maschinellen Beatmung konnte eine Dosis von einer Einheit porziner pankreatischer Elastase gelöst in sterilem Phosphatpuffer (PBS) mit Luft vermengt intratracheal zerstäubt und appliziert werden. Nach erfolgreicher Ausleitung aus der Inhalationsnarkose werden die Tiere schonend gewärmt und 21 Tage nach der Behandlung durch eine erneute Isofluran-Narkose mit anschließender zervikaler Dislokation euthanasiert und untersucht. Dieser Tierversuch wurde von Laurent Boyer und seinen Mitarbeiter*innen an der Université Paris-Est Créteil nach den örtlichen Vorschriften zum Tierschutz durchgeführt; die Analyse der Lungenproben erfolgte durch den Verfasser dieser Dissertationsschrift.

2.2.1.2 Regenerationsmodell des Bronchialepithels

Zur spezifischen Schädigung des Bronchialepithels mit einer anschließenden Regenerationsphase wird eine Kohorte von 24 Mäusen untersucht. Zur Konditionierung der Tiere und für eine bessere Verträglichkeit der Behandlung im Sinne des Tierwohls wird bei den Tiere über eine Woche vor Beginn der Behandlung mit zusätzlichen Fütterungen eine gleichmäßige Gewichtszunahme bei beiden Genotypen erzielt. Unmittelbar vor der Injektion werden die Tiere gewogen. Anschließend wird eine Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht einer 3-prozentigen Sonnenblumenöl-Naphthalin Lösung (Konzentration 30 mg/ml) mit einer 26-Gage-Kanüle und einer 0,1 ml-Spritze intraperitoneal injiziert

(Bicyclo[4.4.0]deca-1,3,5,7,9-pentene, Merck, Deutschland). Die Tiere werden durch weitere Zufütterung und tägliche Gewichtskontrollen sowie klinische Beurteilung versorgt. Zu den Analysezeitpunkten an den Tagen 1, 3, 7 und 14 werden je drei *Trp53*-Wildtyp und drei *Trp53*-Knock-out Tiere entnommen, durch eine CO₂-Insufflation in den Käfig narkotisiert und anschließend per zervikaler Dislokation getötet. Die anschließende Untersuchung der Gewebeproben verläuft wie in Abschnitt 2.2.2 dargestellt. Dieser Versuch ist unter der Antragsnummer G17-28 dem niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit angezeigt und in dieser Form genehmigt worden. Ein zeitliches Ablaufschema des Naphthalin-Experiments ist in Abbildung 2 zu sehen.

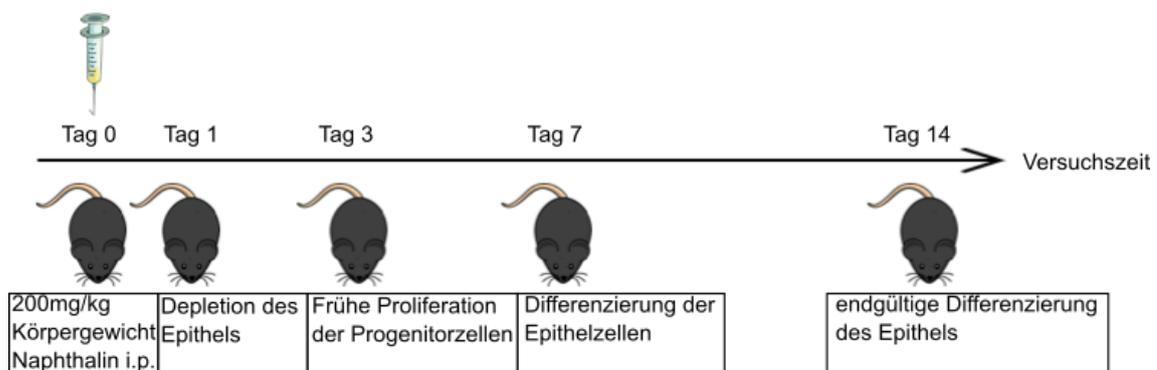


Abbildung 2: Versuchsaufbau des Naphthalin-Regenerationsmodells.

2.2.2 Präparation

Zur Präparation werden die Versuchstiere mittels einer zweiminütigen CO₂-Insufflation in den Haltungskäfig narkotisiert, die Narkosetiefe klinisch überprüft und anschließend der Kopf der Tiere mit einem Präparierbesteck auf der Unterlage fixiert und durch einen schnellen, ruckartigen Zug an der Basis des Schwanzes zervikal disloziert. Sodann erfolgt die Öffnung von Thorax und Abdomen, ohne dabei die inneren Organe zu verletzen. Durch eine zügige Durchtrennung des rechten und linken Hauptbronchus sowie der Lungengefäße an den *Hili* werden beide Lungenflügel unter kleinstmöglichen Einblutungen und ohne direkten Druck auf das Lungenparenchym entnommen und in sterilen Phosphatpuffer (PBS) gelegt. Anschließend wird die *Trachea* direkt unterhalb des *Larynx* abgesetzt und ebenfalls in sterilen Phosphatpuffer gelegt. Unter Sicht wird vorsichtig am rechten Lungenflügel der Oberlappen abgetrennt und in sterile Kunststoff-Probenröhrchen mit Keramikugeln verbracht. Bei allen untersuchten Tieren dient, zur besseren Vergleichbarkeit, der rechte Lungenoberlappen der RNA-Isolation mit anschließender Analyse (siehe Abschnitt 2.2.6.1). Der rechte Lungenunterlappen wird ebenfalls unter Sicht

abgetrennt, in Kunststoffprobenröhrchen mit Keramikugeln gebracht und dient bei allen Versuchstieren der Proteinisolation und -untersuchung. Beide Probenröhrchen werden sofort nach der Explantation in flüssigem Stickstoff (ca. -196°C) tiefgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert. Der *Lobus medius pulmonis dextri* sowie der *Lobus accessorius pulmonis dextri* werden, zusammen mit dem linken Lungenflügel, in beschriftete Einbettungskassetten gelegt und über Nacht in einer vierprozentigen Formaldehydlösung fixiert. Die *Trachea* wird in dem sterilen Phosphatpufferbad vom laryngealen Ende her mit einer 26 Gage Kanüle mit aufgesetzter 1 ml Feindosierungsspritze (gefüllt mit PBS) kanüliert und vorsichtig mit PBS gespült, um bei Explantation eingeschwemmtes Blut aus der Trachea zu entfernen. Auch die Trachea wird anschließend in eine Einbettungskassette gelegt und über Nacht in einer vierprozentigen Formaldehydlösung fixiert.

Bei jeder Präparation wird zusätzliche die Schwanzspitze des jeweiligen Tieres biopsiert, um eine Kontrollgenotypisierung durchzuführen.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Einbettung der Gewebeproben

Nach der oben beschriebenen Fixation des Gewebes erfolgt das Auswaschen des Formaldehyds aus den Proben durch eine einstündige Waschung der Gewebe (in den Einbettungskassetten) mit fünfmaligem Wechsel des Phosphatpuffers. Die anschließende Dehydratation des Gewebes erfolgt durch Inkubation der Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem in Tabelle 24 dargestellten Schema. Die Inkubation erfolgt auf einem Laborrüttler, um eine stete Durchmischung der Dehydratationslösungen zu ermöglichen.

Tabelle 24: Dehydratationsschema von murinen Lungengewebeproben

Dehydratationslösung	Inkubationszeit
Ethanol, 50%	zweimal 15 Minuten
Ethanol, 70%	zweimal 15 Minuten
Ethanol, 80%	zweimal 30 Minuten
Ethanol, 90%	zweimal 45 Minuten
Ethanol, 100%	zweimal 45 Minuten

Dehydrationslösung	Inkubationszeit
Isopropanol, 100%	über Nacht
Isopropanol 75%, Xylol 25%	60 Minuten
Isopropanol 50%, Xylol 50%	60 Minuten
Isopropanol 25%, Xylol 75%	60 Minuten
Xylol, 100%	über Nacht
Paraffin 62°C (flüssig)	über drei Tage

Nach der Dehydratation erfolgt die Einbettung der Gewebeproben, bei der die Gewebeproben vorsichtig den Einbettungskassetten entnommen werden, in eine Metallkassette gelegt und mit flüssigem Paraffin übergossen werden. Zur sicheren Probenidentifizierung wird die beschriftete Einbettungskassette an der Probe durch flüssiges Paraffin fixiert. Die Konstruktion härtete anschließend auf einer Kühlplatte vollständig aus und wird dann aus der Metallkassette entnommen.

2.2.3.2 Zuschneiden der Gewebeproben

Die auf 4 °C vorgekühlten Gewebe-Paraffin-Blöcke werden in einem Mikrotom zunächst grob zugeschnitten, anschließend werden 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Dabei werden je drei Schnitte auf einem Objektträger fixiert, um so serielle Schnittfärbungen und Negativ-Kontrollen bei Immunfärbungen durchführen zu können. Die Paraffinschnitte werden anschließend über Nacht bei 52 °C inkubiert und somit an den Objektträgern fixiert.

2.2.3.3 Rehydratation

Für die Färbung der Gewebeschnitte werden die Objektträger in Glaskörbe sortiert und in Glasküvetten in einer absteigenden Alkoholreihe unter steten Schüttelbewegungen auf dem Laborrüttler rehydriert. Die Rehydratationslösungen sowie die Inkubationszeiten sind in Tabelle 25 zu sehen.

Tabelle 25: Rehydratationsschema von murinem Lungengewebe für die Histologie

Rehydratationslösung	Inkubationszeit
Xylol, 100 %	3 Stunden, stündlicher Wechsel des Mediums
Xylol 50 %, Isopropanol 50 %	30 Minuten
Isopropanol 100 %	10 Minuten
Ethanol 100 %	10 Minuten
Ethanol 90 %	5 Minuten
Ethanol 70 %	5 Minuten
destilliertes Wasser	einige Sekunden
PBS	bis zur weiteren Verarbeitung

2.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die rehydrierten Gewebeproben werden für sieben Minuten in gefilterte Hämalaulösung in einer Glasküvette gestellt und anschließend kurz mit Leitungswasser gespült. Der Färbeerfolg wird anschließend mit einem Lichtmikroskop überprüft und die Objektträger vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Die Objektträger werden danach für fünf Minuten in eine Eosinlösung getaucht und ebenfalls vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült. Auch hier wird der Färbeerfolg mikroskopisch gesichert. Nach erfolgreicher Färbung werden die Objektträger für fünf Minuten in 70 % Ethanol, für eine Minute in 90 % Ethanol, für eine Minute in 100 % Ethanol, für fünf Minuten in 100 % Isopropanol, für wenige Sekunden in 50 % Isopropanol und 50 % Xylol und anschließend für zweimal zehn Minuten in 100 % Xylol dehydriert. Die gefärbten Schnitte werden mithilfe von synthetischem Einschlussmittel (Roti® Histokitt) und Deckgläsern geschützt und dauerhaft mikroskopierbar gemacht.

2.2.3.5 Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Zur Anfärbung von Kohlenhydraten (beispielsweise in Polysacchariden) mittels der Perjodsäure-Schiff-Reaktion werden die rehydrierten Objektträger für fünf Minuten in einer 0,5 prozentigen Perjodsäurelösung inkubiert. Dabei werden die Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten zu Aldehydgruppen oxidiert. Nach gründlichem Abwaschen der

Objektträger mit destilliertem Wasser inkubieren die Objektträger für 25 Minuten in Schiff-Reagenz, wobei die entstandenen Aldehydgruppen mit den im Reagenz enthaltenen fuchsinschwefligen Säuren zu rotem Farbstoff reagieren. Anschließend erfolgen eine Gegenfärbung mit Hämalaun wie oben beschrieben und eine Dehydratation wie bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Auch die PAS-Färbungen werden mit synthetischem Einschlussmittel und Deckgläsern dauerhaft konserviert.

2.2.3.6 Kollagenfärbung

Als spezifische Färbemethode für Kollagen wird die Prico-Sirius-Rot/Fast-Green-Färbung nach den Vorgaben des Herstellers (Emergo Europe, Den Haag, Niederlande) durchgeführt. Hierbei werden abweichend von den übrigen histologischen Untersuchungen 5 µm dicke Gewebeschnitte genutzt.

2.2.3.7 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Darstellung der Expression von Zielproteinen im Lungengewebe werden die rehydrierten Gewebeschnitte für 30 Minuten mit einer fünfprozentigen Proteinase K-Lösung behandelt (gelöst in TE-Puffer mit pH 8). Durch diese enzymatische Behandlung der Gewebe können die Epitope der Proteine im Gewebe freigelegt werden, um von spezifischen Erstantikörpern gebunden zu werden. Anschließend erfolgt eine Spülung mit destilliertem Wasser und mit Phosphatpuffer. Zur Sättigung von endogenen Peroxidasen werden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, werden die Gewebeproben danach mit circa 100 µl einer Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Nach einer zweimaligen Waschung der Objektträger mit Phosphatpuffer werden die spezifischen Erstantikörper in Phosphatpuffer gelöst (Verdünnungen gemäß Tabelle 22), auf die Gewebeproben aufgebracht (je ca. 100 µl) und bei 4 °C über Nacht wird die Bindung der Erstantikörper an die Zielproteine ermöglicht. Nach gründlicher Reinigung mit Phosphatpuffer wird der biotinylierte Zweitantikörper in Phosphatpuffer mit einem zehnprozentigen FCS-Zusatz gelöst auf die Gewebeschnitte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird der Zweitantikörper mit Phosphatpuffer dreimalig abgewaschen und eine 1:1000 Verdünnung einer HRP-Streptavidinlösung auf die Proben gegeben. Innerhalb der einstündigen Inkubationszeit bindet das an die Meerrettichperoxidase gekoppelte Streptavidin hochaffin an das Biotin, welches an den Zweitantikörper geheftet ist. Dieser hat zuvor spezifisch das speizientypische F_c-Fragment

des Erstantikörpers gebunden. Nachdem die überschüssige HRP-Streptavidinlösung gründlich mit Phosphatpuffer abgewaschen worden ist, wird eine 1:50 mit PBS verdünnte DAB-Lösung mit zusätzlich 50 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Peroxidase-katalysierte Oxidation von DAB durch das Wasserstoffperoxid verläuft innerhalb der zehnminütigen Inkubationszeit, sodass eine kräftige bräunliche Färbung an den spezifischen Bindungsstellen der Erstantikörper zu sehen ist. Die Entwicklungslösung wird kurz mit destilliertem Wasser abgewaschen und eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun wie oben beschrieben durchgeführt. Auch die immunhistochemischen Färbungen werden wie die HE-Färbungen dehydriert (siehe Abschnitt 2.2.3.4) und mit synthetischem Einschlussmittel und Deckgläsern konserviert. Als Negativkontrolle wird bei jeder Färbung eine der drei Gewebeproben auf einem der Objektträger statt mit einer Erstantikörperlösung mit Phosphatpuffer über Nacht inkubiert.

2.2.3.8 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzfärbungen werden die Gewebe nach der Rehydrierung lokalisiert und anschließend die Epitope der Zielproteine freigelegt. Für die Markerproteine CD68 und CD206 werden die Bindungsstellen der Erstantikörper durch eine 30-minütige Inkubation der Gewebeschnitte in einer fünfprozentigen Proteinase-K-Lösung bei einem pH von 8 freigelegt. Die Markerproteine SCGB1A1, azetyliertes α -Tubulin, MMP12 sowie CYP4B1 werden dreimal für je fünf Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle in einer 10 mmol/l Zitronensäurepufferlösung mit einem pH von 6 aufgekocht. Nach der jeweiligen Antigenpräparation werden unspezifische Bindungen der Antikörper durch eine Inkubation mit der Blockier-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur minimiert und anschließend die Blockier-Lösung mit Phosphatpuffer abgewaschen. Danach wird der entsprechende Erstantikörper gemäß der Verdünnung in Tabelle 22 in einen neuen Ansatz der Blockier-Lösung gemischt und auf jeden der zu untersuchenden Gewebeschnitte gegeben. Nach einer nächtlichen Inkubation bei 4 °C werden die Gewebe dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und der spezifische Zweitantikörper in einem neuen Blockier-Lösungsansatz gemäß Tabelle 22 verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird auch der Zweitantikörper mit PBS dreimal abgewaschen und eine 1:2000 Verdünnung von DAPI in PBS für fünf Minuten auf die Proben pipettiert. Nachdem die DAPI-Lösung mit PBS abgewaschen wurde, wird den Geweben Fluoreszenz-Einbettungsmedium (DAKO) zugegeben und Deckgläser aufgesetzt. Die mikroskopische Begutachtung und Fluoreszenzmessungen erfolgen innerhalb weniger Tage, um Messungenauigkeiten durch Ausbleichen der Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Bis zur Mikroskopie werden die

Objektträger bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Je Experiment wird ein zusätzlicher Gewebeschnitt als Negativkontrolle genutzt und wie die zu untersuchenden Schnitte behandelt; anstatt mit Erstantikörperlösung inkubiert dieser Schnitt jedoch über Nacht mit Blockierlösung und zeigt entsprechend kein spezifisches Fluoreszenzsignal.

2.2.4 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Beurteilung der konventionell gefärbten Proben werden die Schnitte in 20-facher Vergrößerung mikroskopiert und repräsentative Bildausschnitte mithilfe der integrierten Kamera aufgenommen (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Je gefärbtem Schnitt werden mindestens fünf Bilder aufgenommen und dabei darauf geachtet, in allen Bildern vollständige Anschnitte von Bronchien verschiedener Größe darzustellen. Die morphologische Beurteilung von HE-Färbungen erfolgt anhand der Weite des Alveolarraums, etwaiger entzündlicher Infiltrationen, der Ausprägung des interstitiellen Bindegewebes sowie der morphologischen Betrachtung des bronchialen Epithels.

Die Mikroskopie der immunhistochemischen Bilder erfolgt analog, wobei hier vor der Betrachtung der einzelnen Schnitte die Negativkontrolle untersucht wird, um die Spezifität der Färbung zu überprüfen. Auch die Auswertung der immunhistochemischen Bilder erfolgt qualitativ und erlaubt die topische Zuordnung der Proteinexpression zu Geweben und Zelltypen.

Für die Mikroskopie der Immunfluoreszenzfärbungen wird in 20-facher Vergrößerung zunächst ebenfalls die Negativkontrolle in dem DAPI-Kanal (358 nm Wellenlänge des anregenden Lichtes) untersucht und anhand der Anordnung der Zellkerne ein Bronchus aufgesucht. Anschließend wird die Wellenlänge des anregenden Lichtes auf die jeweiligen Absorptionsmaxima der Zweitantikörper umgestellt und so die Spezifität der Färbung überprüft. Zur Einstellung der optimalen Belichtungszeit werden anschließend von allen Schnitten der Kohorte kurzzeitig Bronchien unter dem Fluoreszenzmikroskop eingestellt und für alle untersuchten Fluoreszenzkanäle die automatische optimale Belichtungszeit ermittelt (automatische Einstellung durch das ZEN-Programm (Zeiss)). Die optimalen Belichtungszeiten aller Schnitte werden notiert und der Mittelwert für jeden Fluoreszenzkanal errechnet, um eine möglichst ideale, aber vergleichbare Belichtung für die Akquisition der Fluoreszenzbilder auszuwählen. Dann werden in jedem histologischen Schnitt im DAPI-Kanal (und deshalb ohne Verzerrung durch Kenntnis der Signalstärke der Bronchien) mindestens fünf Bronchien im Querschnitt aufgesucht und mit der voreingestellten Belichtungszeit in allen untersuchten Fluoreszenzkanälen abgelichtet. Die

Bilder werden in dem ZEN-Programm in das TIFF-Format konvertiert und anschließend exportiert.

2.2.4.1 Quantifizierung des Alveolarraums

Zur Quantifizierung der Weite des Alveolarraumes wird die sterologische Methode des *Mean Linear Intercept* genutzt. Dabei werden in maßstabsvermerkten Bildern von HE-Färbungen in dem Bildauswertungsprogramm ImageJ durch gut erhaltenes Alveolargewebe Testlinien gelegt. Die Testlinien werden zufällig im Bild verteilt, es wird jedoch darauf geachtet, keine Bronchien oder Blutgefäße mit der Testlinie zu schneiden. Entlang der Testlinien werden nun alle Kreuzungen mit Alveolarsepten gezählt. Die gemessene Länge der Testlinie wird anschließend durch die Anzahl der Kreuzungen geteilt und somit der mittlere Abstand der Alveolarsepten berechnet. Je Bild werden mindestens drei Testlinien vermessen, um eine repräsentative Ausmessung der Alveolen zu erhalten. Je Tier werden mindestens drei Bilder der HE-Färbung ausgewertet, um einen Durchschnitt des gesamten linken Lungenflügels (basaler wie apikaler Abschnitte) zu erhalten.

2.2.4.2 Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen

Die Immunfluoreszenzbilder werden zur Quantifizierung der Signale kanalgetrennt (also getrennt nach Wellenlänge des anregenden Lichtes) in ImageJ geöffnet und als 8-bit Bild (schwarz-weiß) dargestellt. Dadurch wird nur das Fluoreszenzsignal eines angefärbten Antigens dargestellt. Anschließend wird die Zirkumferenz der Bronchien auf Höhe der Basalmembran manuell umfahren. Der so gemessene Umfang des Bronchus wird zunächst zwischengespeichert. Nach der Löschung aller Signale außerhalb der Bronchusumgrenzung wird ein Grenzwert eingestellt, der für alle Bilder innerhalb einer Färbekohorte gleich ist. Der Grenzwert bestimmt die Mindestintensität des Fluoreszenzsignals, unterhalb derer ein Fluoreszenzsignal nicht dargestellt wird. Dieser wird so adjustiert, dass die jeweilige zu untersuchende mikroskopische Struktur sicher zu identifizieren ist (beispielsweise ein klarer Bürstensaum bei der Quantifizierung von Kinozilien). Somit entsteht eine dichotome Darstellung von Antikörpersignal *versus* kein Signal. Anschließend wird die Fläche aller jetzt noch dargestellten Partikel gemessen. Der Quotient aus der Partikelfläche und dem Bronchusumfang kann als Maß für die jeweils quantifizierte Struktur (Keulenzellen, Flimmerzellen) normiert auf die Länge des untersuchten Epithels aufgefasst werden. Für die Quantifizierung der bronchialen Makrophagen werden die übereinandergelegten Fluoreszenzkanäle in ImageJ geöffnet, der Bronchus auf Höhe der Basalmembran umfahren und die Länge des Umfangs zwischengespeichert. Die doppelt angefärbten

Makrophagen im Bronchus bzw. mit direktem Kontakt zur Basalmembran werden gezählt und ihre Anzahl durch den Bronchusumfang geteilt.

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolation

Bei allen Versuchstierkohorten wird der rechte Lungenunterlappen zur Proteinisolation genutzt. Dem tiefgefrorenen Gewebe (ca. -80°C) werden zur Proteinisolation 400 μl RIPA-Puffer und 200 μl Harnstofflösung (8 mol/l, Endkonzentration des Harnstoffs 2,7 mol/l) zugesetzt und das Gewebe in den verschlossenen Proberöhrchen mit Keramikugeln für zehn Sekunden bei 5.000 Umdrehungen/Minute homogenisiert. Das Gewebehomogenisat wird abzentrifugiert und ein Aliquot für die Proteinkonzentrationsmessung abgenommen. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgt nach den Angaben des Herstellers des BCA-Tests (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die so gemessene Proteinkonzentration der einzelnen Proben wird für die folgende *Western-Blot*-Analyse vermerkt. Anschließend wird die Stammlösung (unverdünnt) für zehn Minuten bei 4°C intermittierend ultraschallbehandelt, um Proteinaddukte und DNA-Vernetzungen aufzulösen. Vor der erneuten Tiefkühlagerung wird den Proben sechsfach konzentrierter Tris-Glycin-Puffer in einem Verhältnis von 1:6 zugesetzt und die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Proteinseparation und -detektion

Für die Proteinseparation per *Western Blot* werden zunächst Gelkammern mit SDS-Polyacrylamid (10 %, Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1.2) ausgegossen und im oben zuliegen kommenden Sammelgel Kammern für die Probenbestückung mit einem Gelkamm ausgespart. Die vorbereiteten Gele werden in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Laufkammern (in Elektrophoresepuffer) eingespannt mit einem Proteingrößen-Marker geladen. Die Proteinproben werden für zwei Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend ungelöster Zellebris durch Zentrifugieren entfernt. Je Probe werden 40 μg Gesamtprotein geladen und die Puffermengendifferenz ausgeglichen. Die Elektrophorese wird zunächst mit einer Spannung von 100 V begonnen, bis alle Proben den Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel erreichen. Dann wird die Spannung auf 150 V erhöht und die Elektrophorese fortgeführt, bis die Lauffront des gefärbten Puffers das untere Ende des Trenngels erreicht. Das Trenngel wird für den Transfer auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht und der enge Kontakt durch beidseitige mehrlagige

Filterpapiere und Schwämme sichergestellt. Der Proteintransfer wird im vorgekühlten Transferpuffer unter Eiswasserkühlung (mit positiver Polarität auf der Nitrozelluloseseite und negativer Polarität auf der Gelseite für 60 Minuten bei 100 V durchgeführt).

Nach dem Transfer werden die Proteine als Positivkontrolle unspezifisch auf der Nitrozellulosemembran angefärbt. Dazu wird die Membran für fünf Minuten in Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend für weitere fünf Minuten in einprozentiger Essigsäurelösung kontrastiert. Der erfolgreiche Transfer zeigt dabei klar getrennte, gerade Laufreihen je Probe sowie intensiver gefärbte Proteinbanden (bei Lysaten aus Mauslungen typischerweise bei 70, 42 und 35 kDa). Nach Abwaschen der Ponceau-Färbung mit Phosphatpuffer auf dem Wipp-Inkubator werden die nicht von Probeproteinen besetzten Bereiche der Nitrozellulosemembran mit experimenteller Kuhmilch (Milchpulver gelöst in Phosphatpuffer, 5 %) geblockt.

Die Detektion spezifischer Proteine erfolgt durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in einer PBS/Milchpulver-Lösung (5 %) mit dem Zusatz spezifischer Erstantikörper. Die einzelnen Antikörper samt Verdünnung sind Tabelle 22 zu entnehmen. Die Inkubation der spezifischen Erstantikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C auf einem Rollinkubator in einem Falcon-Reaktionsgefäß, um eine kontinuierliche Verteilung der Antikörper auf der gesamten Membran zu ermöglichen. Nach der Inkubation mit den Erstantikörpern wird die Membran für je fünf Minuten mit PBS, dann mit PBS mit 0,05 % Polysorbat-20 und PBS-Milch-Lösung gewaschen, um unspezifische Bindungen der Antikörper an Proteinen oder der Membran abzuwaschen. Anschließend inkubiert die Membran in PBS-Milch-Lösung mit spezifischen Zweitantikörpern, die gegen den F_c-Teil der Erstantikörper gerichtet und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Auch die Verdünnung und genaue Bezeichnung der Zweitantikörper ist in Tabelle 22 dargestellt. Nach einem erneuten Waschgang wird die Membran in einer zugeschnittenen Kunststoffolie mit einer 1:1 Mischung aus Luminol-Reagenz und Wasserstoffperoxidlösung inkubiert (Millipore Immobilon Western Chemilumineszent HRP Substrate) und das durch die antikörpergekoppelte Peroxidase katalysierte Signal mit einem Chemilumineszenzdetektor (BioRad Laboratories, Hercules, USA) dokumentiert. Die detektierten Banden werden im Ergebnis-Teil dieser Arbeit immer im direkten Vergleich zu kontinuierlich exprimierten Referenzproteinen dargestellt, um die Vergleichbarkeit der Proben im Bezug auf die Gesamtproteinmenge sicherzustellen. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgt durch Messung der Intensität und Fläche der jeweiligen Banden, normalisiert auf die Fläche und Intensität der Referenzproteinbande im gleichen Elektrophorese-Experiment.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Isolation und quantitative Echtzeit-PCR

Für die Genexpressionsanalyse auf RNA-Ebene werden zur besseren Vergleichbarkeit bei allen Versuchstieren die rechten Lungenoberlappen verwendet. Zu den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Lungenlappen werden $1000\text{ }\mu\text{l}$ Trizol-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, USA) gegeben und die Gewebe für zehn Sekunden bei 14.000 Umdrehungen pro Minute in einem Hochgeschwindigkeitshomogenisator lysiert. Mit weiteren $500\text{ }\mu\text{l}$ Trizol-Reagenz ruhen die Lysate für fünf Minuten, um eine Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Anschließend wird $200\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform hinzugegeben und das Lösungsmittelgemisch emulgiert. Zur darauffolgenden Phasentrennung werden die Proben für eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten bei 12.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Phasentrennung ermöglicht eine Ausfällung der Zellbestandteile in den verschiedenen Phasen sodass in der oberen, wässrigen Phase die RNA enthalten ist. Die wässrige Phase abgenommen und in einem 1:3-Verhältnis zu hochreinem Ethanol gegeben, sodass die Lösung einen 75 %-Ethanolgehalt aufweist, in welchem RNA ausfällt. Das RNA-Ethanol-Gemisch wird anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Das anschließende Zentrifugieren präzipitiert die RNA als klare Substanz am Boden des Reaktionsgefäßes, sodass die Ethanolphase mit einer Pipette abgenommen werden kann. Nach zweimaligem Ethanol-Waschen mit Zentrifugieren erfolgt das passive verdampfen des übrigen Ethanols und die Lösung der aufgereinigten RNA in $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem nukleasefreiem Wasser. Die Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse erfolgt photospektrometrisch (NanoDrop-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen).

Zur Untersuchung der Genexpression in den Lungenproben wird die isolierte RNA revers zu DNA (dann als „kopierte DNA“ (cDNA) bezeichnet) transkribiert. Dafür wird Proben-RNA mit den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), zufälligen Nonamer-Primern und Poly(23)-T-Primern (zur Anlagerung an das 3' Poly-A-Ende der mRNA) versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden der enzymespezifische Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor und die MuLV reverse Transkriptase (alle Chemikalien von New England Biolabs, Ipswich, USA) zugegeben und die Transkription für eine Stunde bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ablaufen gelassen. Nach Enzyminaktivierung durch Erhitzen auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Quantifizierung spezifischer Transkripte erfolgt durch eine quantitative Echtzeit-PCR. Dafür werden der cDNA spezifische Primer (siehe Tabelle 19) des jeweils zu

untersuchenden Transkriptes zugegeben, um so die Amplifikation der zu untersuchenden mRNA zu ermöglichen. Für die PCR notwendige Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), DNase Inhibitor, DNA-Polymerase sowie die chemische quantitative Detektion der Amplifikate (SYBR Green I) wird ergänzt und durch 40 Amplifikationszyklen in dem *PCR-Thermocycler* (DNA Engine Peltier Thermal Cycler; BioRad Laboratories, Hercules, USA) die cDNA transkriptspezifisch vervielfältigt. Dabei wird für jede quantitative Echtzeit-PCR ein eigener interner Verdünnungsstandard angelegt. Aus jeder Gewebeprobe werden drei Reaktionsansätze angelegt und die berechnete Transkriptmenge der drei Ansätze gemittelt. Anhand der Anzahl des PCR-Zyklus, ab welchem das DNA-Detektionssignal (Lichtemission durch SYBR Green I, gemessen vom *Thermocycler*) einen Grenzwert übersteigt, wird im Verhältnis zum internen Verdünnungsstandard die Ausgangsmenge des Transkripts errechnet. Um systematische Fehler durch verschieden effiziente reverse Transkription bei den einzelnen Proben zu vermeiden, wird die Transkriptmenge der untersuchten mRNA auf die Expression eines konstant exprimierten Referenzgens normiert. Dafür wird das ribosomale Gen *Rp18* wegen seiner zeitlich wie örtlich konstanten Expression genutzt.

2.2.6.2 Mikro-RNA Quantifizierung

Die geringe Größe reifer Mikro-RNA erfordert eine spezielle reverse Transkription und quantitative PCR-Technik, um die nur 18-25 Nukleotide lange RNA spezifisch amplifizieren zu können. Da bei der reversen Transkription mithilfe von zufälligen Nonamer-Primern und Poly-T₂₃-VN-Primern die Mikro-RNAs nicht in größeren Mengen in cDNA umgeschrieben wird, muss für die Quantifizierung der Mikro-RNA-Expression für jede zu untersuchende Mikro-RNA eine eigene reverse Transkription mit Mikro-RNA-spezifischen Primern durchgeführt werden. Dafür werden die RNA-Isolate entsprechend der Gesamt-RNA-Menge (gemessen mittels Photospektrometer) auf eine einheitliche Konzentration verdünnt, um Quantifizierungsfehler durch verschieden effiziente reverse Transkriptionen zu verringern. Nach der reversen Transkription mit den spezifischen Mikro-RNA-Primern erfolgt die PCR-Amplifikation und -Quantifizierung in der TaqMan-Technik. Dabei wird die Menge des Amplifikats nicht durch chemische Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I) wie bei der oben beschriebenen quantitativen Echtzeit-PCR gemessen, sondern durch die sequenzspezifische Bindung einer markierten Oligonukleotidsonde (TaqMan-Sonde). Diese Sonde enthält zwei räumlich benachbarte Fluorochrome (Donor und Reporter), wobei die Lichtemission des Reporters durch den Förster-Resonanzenergietransfer durch die Nähe zum Donor gering ausfällt. Die 5'-3'-

Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase trennt Donor und Reporter in jedem Amplifikationszyklus, sodass die verstärkte Fluoreszenz des Reporters ein spezifisches Maß für die Menge der Mikro-cDNA darstellt. Als interne Normierung wird auch bei der Quantifizierung der Mikro-RNA eine Verdünnungsreihe angesetzt und die Referenz-Mikro-RNA *U6 small nuclear 1* (RNU6-1, Bestandteil des Spleißosoms) quantifiziert. Wie bei der Quantifizierung der mRNA wird auch hier die Transkriptmenge der zu untersuchenden Mikro-RNA auf die jeweilige Expression von RNU6-1 normalisiert.

2.2.7 Mukoziliäre Reinigungsuntersuchung

Die Untersuchung der Funktion des Bronchialepithels erfolgt durch die mukoziliäre Reinigungsuntersuchung. Als Untersuchungsabschnitt wird das tracheale respiratorische Epithel der Maus genutzt, das dieser Anteil des Tracheobronchialsystems der Präparation am Einfachsten zugänglich ist. Die Mäuse werden durch CO₂-Insufflation in den Haltungskäfig sediert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Mäuse werden sofort im Anschluss präpariert und die Trachea unter größtmöglicher Vorsicht (insbesondere ohne Einblutungen in das tracheale Lumen) in vorgewärmte (37 °C) Ringerlösung verbracht. Die Trachea wird im Anschluss auf einer Metallplatte in Ringerlösung fixiert und so mit einem Mikrotom in der Frontalebene halbiert. Die beiden Hälften werden mit Ringerlösung gespült, um Trachealsekret zu entfernen und eine Verzerrung der ziliären Transportrate durch genotypspezifische Differenzen der Schleimviskosität zu verhindern. Nach lichtmikroskopischer Einstellung der Trachea (bedeckt mit Ringerlösung) in Aufsicht in einem Konfokalmikroskop werden fluoreszierende Partikel (FluoSpheres®, 0.17 µm, PS-Speck, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugegeben und im Fluoreszenzkanal die Bewegung der Partikel in standardisierten Videosequenzen festgehalten (280x280 µm (512x512 Pixel) bei 61 Hz in 2.000 Einzelbildern). Für jede Aufnahme wird lichtmikroskopisch ein Bereich mit sichtbarem Zilienschlag eingestellt, um so die korrekte Fokusebene sicherzustellen. Einfach untersucherverblindet werden so Aufnahmen von fünf Wildtypen- und fünf *Trp53*-Nullmutanten-*Tracheae* angefertigt (je *Trachea* mindestens sechs unterschiedliche Areale). Zusätzlich werden nach der Untersuchung mehrere *Tracheae* (Wildtyp und Knock-out) abgetrocknet und so das Flimmerepithel mechanisch zerstört, um die einfache Partikeldiffusion als Negativkontrolle zu nutzen. In den Einzelbildern der Videosequenzen werden die Partikel computergestützt detektiert und ihre Geschwindigkeit berechnet (vergleiche Crocker und Grier 1996). Die Geschwindigkeiten der Partikel innerhalb einer Aufnahme werden gemittelt und als ein Messwert innerhalb der Gruppe eines Genotyps

behandelt. Die Partikeltransportgeschwindigkeit der Wildtyp-Tiere wird anschließend statistisch derjenigen der *Trp53*-Knock-out-Tiere und der Diffusionsmessungen gegenübergestellt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung quantitativer Experimente erfolgt als statistischer Vergleich der Expressionsstärke verschiedener biologischer Parameter (mRNA- bzw. Mikro-RNA-Transkriptmenge, Proteinexpressionsniveau, mittlerer Alveolardurchmesser, Fluoreszenzsignal pro epitheliale Länge, Partikeltransportgeschwindigkeit) zwischen zwei bzw. vier Gruppen. Die Gruppengrößen in den jeweiligen Experimenten ist der obigen Beschreibung der Kohorten zu entnehmen. Die Messwerte sind bei allen Experimenten verhältnisskaliert. Als Lagemaß wird der arithmetische Mittelwert gebildet. Außerdem ist bei dem mukoziliären Reinigungsassay der Median in der graphischen Darstellung der Daten als Violinen-Plot angegeben. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgt durch zweiseitige t-Tests für zwei unabhängige Stichproben. Dabei wird das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Bezeichnung der Signifikanz erfolgt in dieser Arbeit nach dem Schema * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die graphische Darstellung der Messwerte erfolgt als Säulendiagramme in der Höhe des arithmetischen Mittels mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes als Fehlerbalken.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Beurteilung von *Trp53*-Nullmutanten-Lungen

Zur orientierenden Untersuchung des Einflusses von P53 auf die Architektur des Lungengewebes und die Zusammensetzung des Bronchialepithels werden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) von Lungenschnitten junger (16 Wochen alten) und gealterter (26 Wochen alten) Mäuse, die entweder homozygot für intaktes *Trp53* (Wildtyp) oder homozygot defizient für *Trp53* (Knock-out) sind, angefertigt. Somit ergeben sich vier experimentelle Gruppen. Sowohl bei jungen als auch bei gealterten Mäusen lässt sich dabei morphologisch kein Unterschied zwischen den Genotypen im Bezug auf die Größe des Alveolarraumes (als Maß für ein mögliches Lungenemphysem) feststellen. Die Alveoli sind in allen vier Kohorten überwiegend von Pneumozyten Typ I ausgekleidet und zeigen eine morphologisch unauffällige Vaskularisation. Das Bronchialepithel der distalen Bronchioli erscheint in allen Kohorten als regelrecht einschichtiges Zylinderepithel und enthält die für periphere Atemwege typische zelluläre Verteilung von Flimmerzellen und Keulenzellen. Die größeren Atemwege bestehen in allen vier Kohorten aus einem vergleichbaren pseudostratifizierten respiratorischen Epithel, das von zartem peribronchialen Bindegewebe umgeben ist. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen aller vier Kohorten finden sich in Abbildung 3.

3.1.1 Mittlerer Alveolardurchmesser bei *Trp53*-Wildtypen und -Nullmutanten

Die pathologische Vergrößerung des Alveolarraumes stellt ein wesentliches pathomorphologisches Merkmal der COPD dar. Um trotz der morphologisch unauffälligen Alveolarweite in der Untersuchung von HE-Schnitten keine diskrete Erweiterung der Alveolarräume bei *Trp53*-Knock-out-Lungen zu übersehen, wird der mittlere Alveolardurchmesser quantifiziert. Die Messung der Alveolarraumgröße als *Mean Linear Intercept* zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen *Trp53*-Wildtypen und *Trp53*-Nullmutaten (Abbildung 4). Dieses Ergebnis ist auch bei gealterten Mäusen reproduzierbar. Auch der Vergleich zwischen jungen und gealterten Wildtypen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Weite des Alveolarraumes. Lediglich der Vergleich zwischen jungen und gealterten *Trp53*-Nullmutanten zeigt eine signifikante, aber nur

geringe Vergrößerung der mittleren Alveolarweite bei den gealterten Tieren um $1,56 \mu\text{m}$ ($\pm 0,6 \mu\text{m}$).

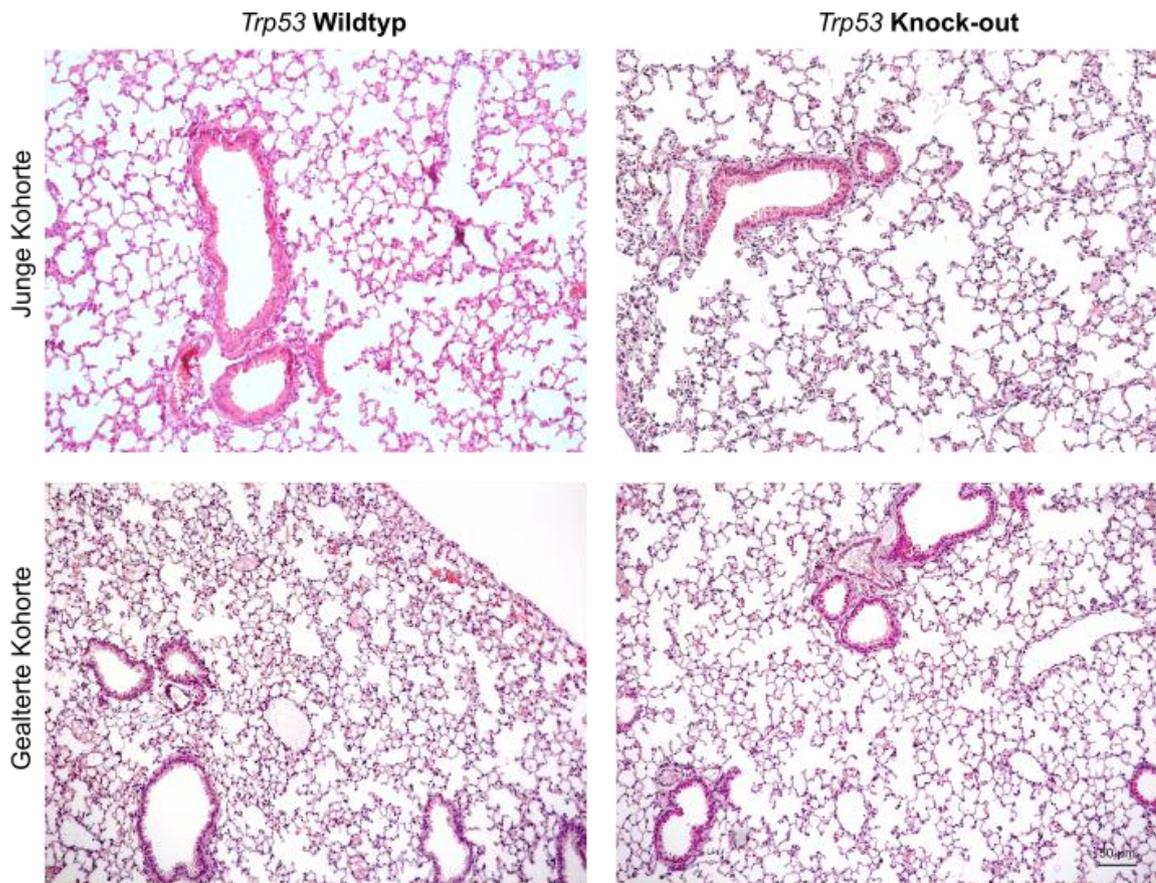


Abbildung 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Lungenschnitten junger und gealterter Mäuse, *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Nullmutanten. Schichtdicke 3 μm.

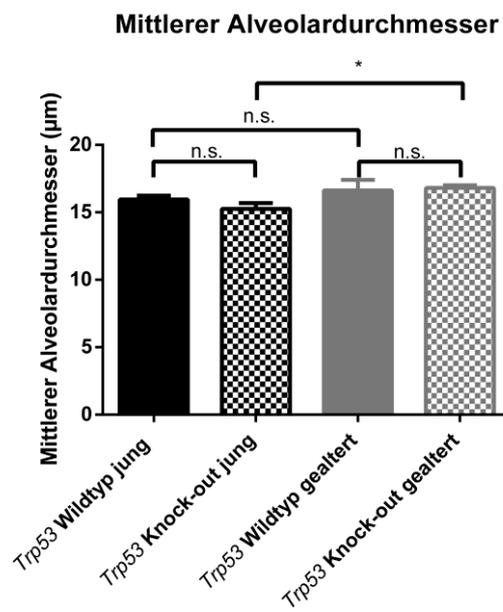


Abbildung 4: Mittlerer Alveolardurchmesser junger und gealterter Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten.

3.2 Spontane und induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge von *Trp53*-Nullmutanten

Um den Lungenphänotyp von *Trp53*-defizienten Mäusen im Bezug auf die peribronchiale monozytäre Entzündungsreaktion genauer zu beschreiben, wurden die oben genannten vier Mauskohorten per Immunfluoreszenz untersucht. Zur Differenzierung von aktivierten Makrophagen gegenüber anderen ortsständigen Zellen und Zellen des adaptiven Immunsystems wurde eine Doppelfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD68 (Monozytenmarker) und gegen CD206 (Marker für aktivierte periphere M2-Makrophagen) durchgeführt. Die doppelt angefärbten Zellen können entsprechend mit hoher Sicherheit als aktivierte periphere Makrophagen betrachtet werden. Zur Quantifizierung der monozytären Entzündungsreaktion wurden die CD68 und CD206 positiven Zellen in den Bronchioli sowie solche Makrophagen, die direkt an die Basalmembran des Bronchialepithels angrenzen, gezählt und ihre Anzahl durch den gemessenen Umfang des Bronchialepithels geteilt. Die ermittelte Anzahl ist somit auf die Länge des untersuchten Bronchialepithels als Bezugsgröße normiert. Der statistische Vergleich zwischen jungen *Trp53*-defizienten und *Trp53*-Wildtyp Bronchioli ergibt eine um das 1,3-fach erhöhte Makrophagenanzahl pro Epithellänge bei den Nullmutanten (Abbildung 5). Dieser leichte, aber statistisch signifikante Unterschied ($p = 0,029$) zeigt, dass ein Fehlen von *Trp53* im ganzen Organismus eine monozytäre Infiltration der Atemwege von Mäusen begünstigt.

3.2.1 Monozytäre Entzündungsreaktion in einem Emphysem-Modell

Die oben gezeigte verstärkte spontane Infiltration der Atemwege bei *Trp53*-Nullmutanten mit aktivierten peripheren Makrophagen zeigt die Funktion von *Trp53* in der Kontrolle der Immunantwort in der Lunge. Die histologische Untersuchung des Lungengewebes zeigt aber keine emphysematösen oder bronchitischen Veränderungen bei unbehandelten Tieren, wie sie bei einer dauernden unkontrollierten pulmonalen Entzündung zu erwarten wären. Daher wird die Auswirkung von *Trp53* auf die primäre Entzündungsreaktion in einem Modell des Lungenemphysems überprüft.

Dazu wurden je fünf Wildtyp- und fünf Knock-out-Mäuse für *Trp53* einmalig mit einer Dosis von einer internationalen Einheit (I.E.) porziner pankreatischer Elastase intratracheal behandelt und 21 Tage nach der Behandlung histologisch analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbung von Paraffin-Schnitten dieser experimentellen Kohorte mit monoklonalen Antikörpern gegen CD68 und CD206 zeigt nach Normalisierung der Makrophagenanzahl auf den Umfang der Bronchioli eine Intensivierung des oben

genannten Effekts (Abbildung 6); *Trp53*-Knock-out Tiere hatten die 1,58-fache Anzahl Makrophagen pro Epithellänge ($p = 0,0019$) im Vergleich zu *Trp53*-Wildtyp-Tieren. Insgesamt zeigen die mit Elastase behandelten Tiere eine im Vergleich zu den unbehandelten Tieren verstärkte monozytäre Inflammationsreaktion (Abbildung 5 und auch Abbildung 6). Das Fehlen von *Trp53* führt also zu verstärkter Makrophageninvasion auch um die Atemwege, sodass in diesem Modell des Lungenemphysems *Trp53* eine peribronchial entzündungshemmende Funktion zugesprochen werden kann.

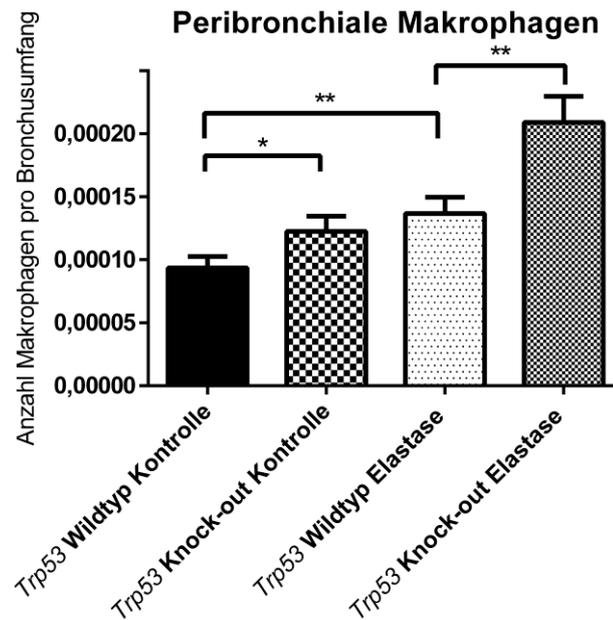


Abbildung 5: Quantifizierung peribronchialer Makrophagen pro epitheliale Länge. Angegeben ist die Anzahl der Makropagen an und in den Bronchien der jeweiligen experimentellen Gruppe normiert auf den Umfang des jeweiligen Bronchus auf demselben mikroskopischen Bild (Einheit in Pixel). Dargestellt sind die Mittelwerte je Gruppe mit Fehlerbalken, welche den Standardfehler des Mittelwerts angeben.

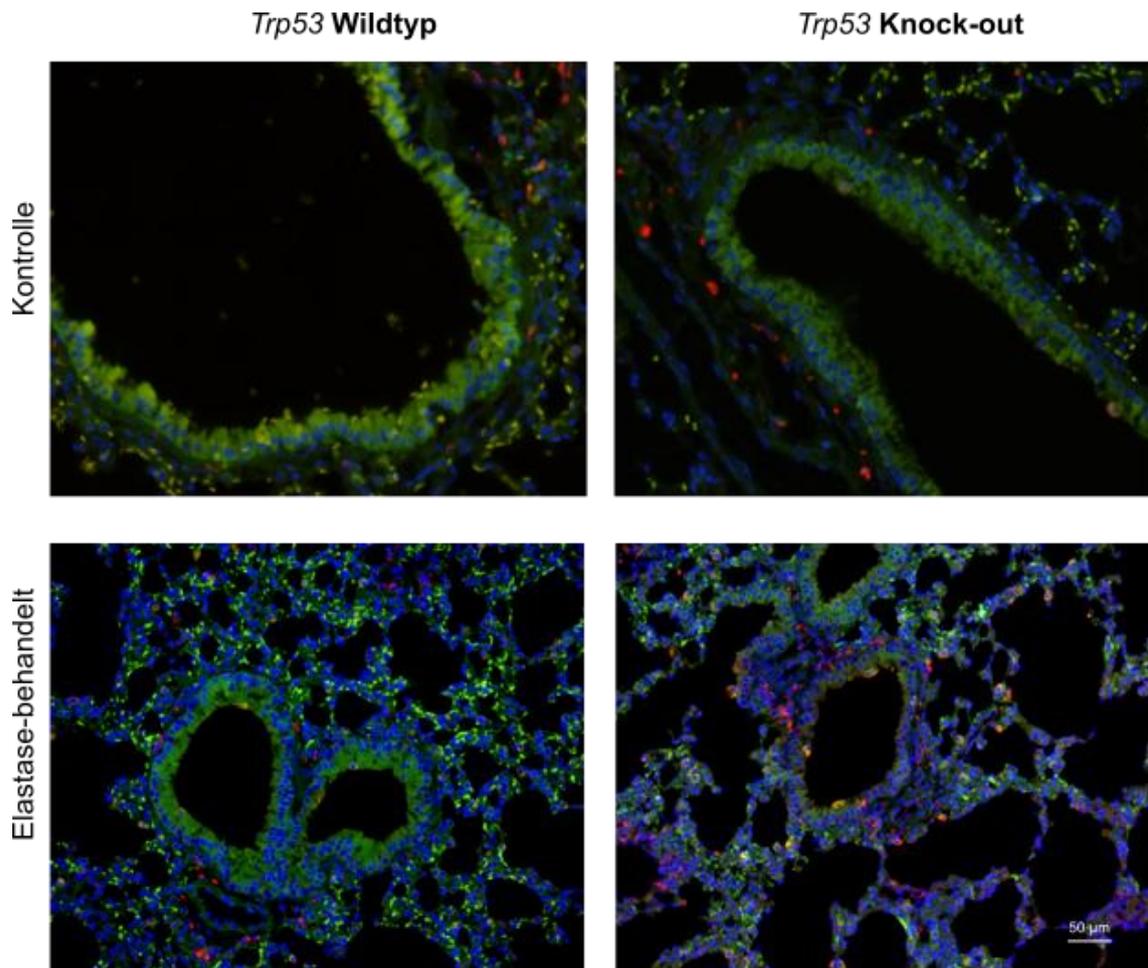


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Färbung für aktivierte periphere Makrophagen. Immunofluoreszenz-Färbung von murinen Paraffin-Lungenschnitten (3 µm Schichtdicke). Grün: Anti-CD68, Rot: Anti-CD206, Blau: DAPI (Zellkerne).

3.2.2 Protease-Antiprotease-Balance

Die Gewebedestruktion durch aktivierte Makrophagen entsteht vor Allem durch die Ausschüttung von Enzymen, durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Chemotaxis weiterer Entzündungszellen. Eines der wichtigsten Effektorenzyme von Alveolarmakrophagen ist MMP12, eine Zink-abhängige Protease, die insbesondere von aktivierten Gewebemakrophagen synthetisiert wird und eine prädominante Rolle bei der Entstehung des pulmonalen Emphysems beim Menschen spielt. MMP12 hydrolysiert insbesondere Elastin-Fibrillen und trägt dadurch wesentlich zur Degradation der extrazellulären Matrix des Lungengewebes beim Lungenemphysem bei. Da *Trp53*-Knock-out-Mäuse eine verstärkte peribronchiale Invasion mit Makrophagen zeigen, ist eine verstärkte Expression von murinem MMP12 naheliegend. Die konträre Regulation der enzymatischen Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen wird insbesondere durch Proteine der TIMP(*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*)-Familie sichergestellt. Ihre Expression muss

also ebenso betrachtet werden, wenn eine fundierte Aussage zur pulmonalen Entzündungsreaktion und daraus resultierender Gewebedestruktion angestrebt wird.

3.2.2.1 Expression von Matrix-Metalloproteinasen im Lungengewebe

Entgegen dieser Erwartung zeigen sowohl unbehandelte als auch mit porciner pankreatischer Elastase behandelte Mäuse keine statistisch signifikanten Differenzen sowohl in der mRNA Expression als auch in der Proteinexpression von MMP12 (Abbildung 7 und Abbildung 8). Auch die Expression der vorrangig in der Lunge vorkommenden Kollagenase *Mmp13* ist auf mRNA-Ebene nicht dereguliert (Abbildung 7). Ebenso ist keine Deregulation von *Mmp9*, eines weiteren für eine Matrix-Metalloprotease kodierenden Gens, dessen Genprodukt ebenfalls verschiedene Kollagen-Typen und Nicht-Kollagen-Proteine der extrazellulären Matrix in der Lunge degradiert, zu beobachten (Abbildung 7).

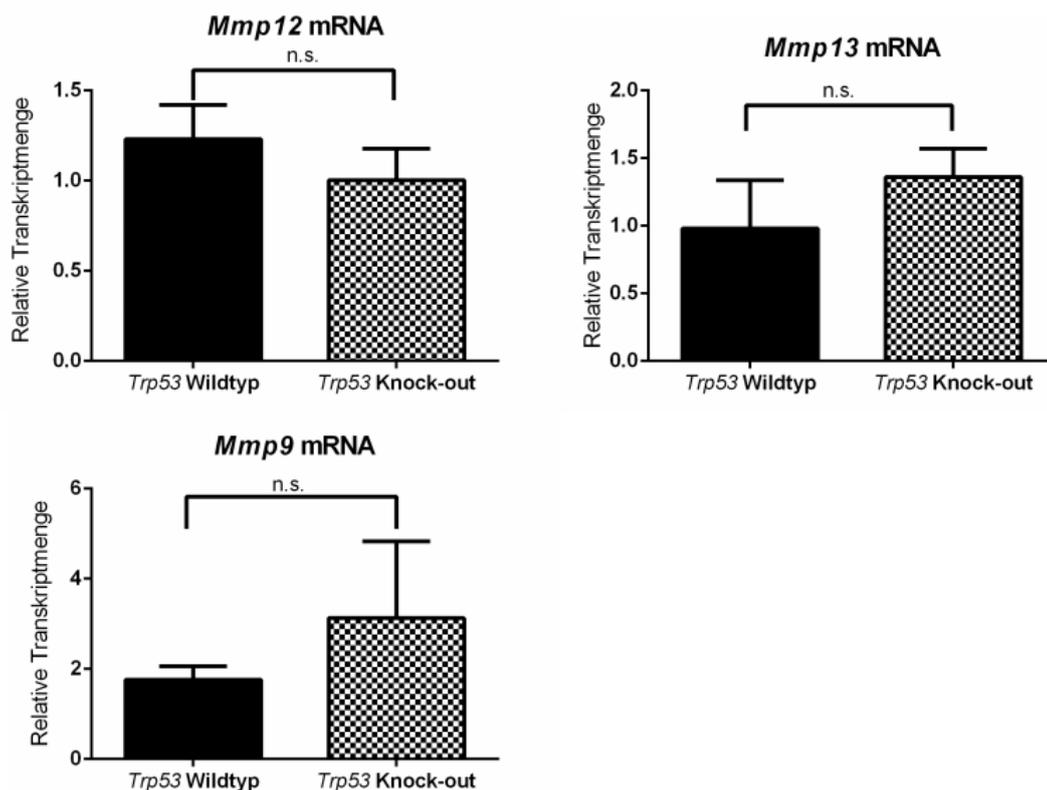


Abbildung 7: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von *Mmp12*, *Mmp13* und *Mmp9*. Angegeben ist die relative Expression des Transkripts im Verhältnis zur Expression des Referenzgens *Rplp0*.

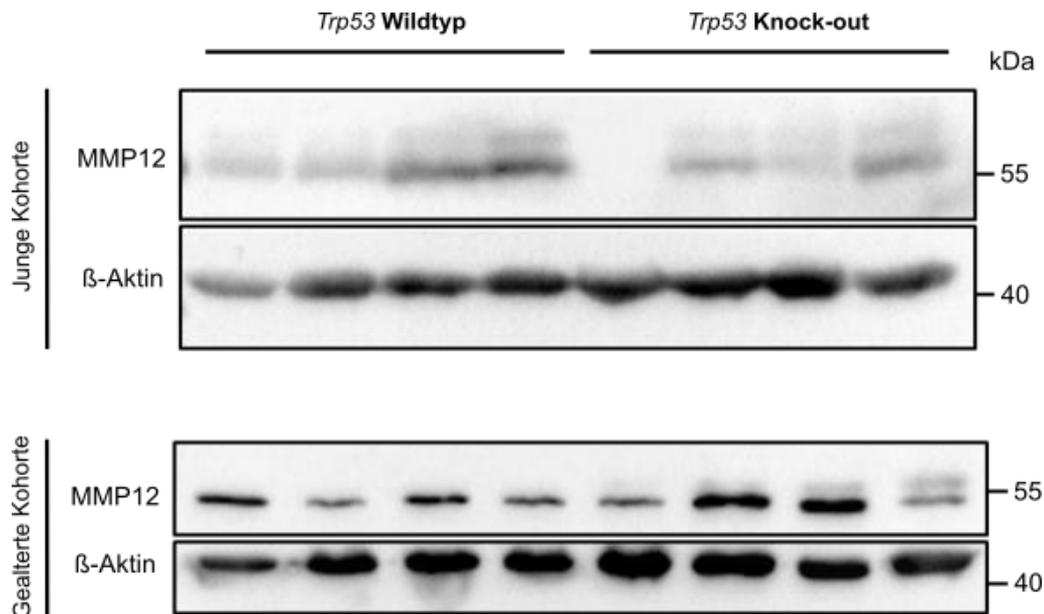


Abbildung 8: Western-Blot von Lungenlysaten für MMP12. Gezeigt sind Lysate pulmonaler Gewebeproben aufgetrennt in einem 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel. β -Aktin dient als Ladekontrolle. MMP12 und β -Aktin wurden von spezifischen Erstantikörpern gebunden und diese von HRP-konjugierten Zweitantikörpern detektiert.

Die deutlichen Schwankungen der Proteinexpression von MMP12 zeigen hier ein primär interindividuelles Muster und keine sichere Abhängigkeit der Expression vom jeweiligen Genotyp bezogen auf *Trp53*. Die Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebe auf die Expression von MMP12 ergab jedoch ein unerwartetes Proteinvorkommen von MMP12 im Bronchialepithel. Zur Überprüfung der Spezifität der Färbung sind hier auch die Negativkontrolle mit fehlendem Erstantikörper sowie ein MMP12-positiver Makrophage als Positivkontrolle gezeigt (Abbildung 9) Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 und CYP4B1. Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebschnitten (3 μ m Schichtdicke). Bild **A** zeigt die Expression des Keulenzellmarkers CYP4B1. Bild **B** zeigt die Expression von MMP12. Bild **C** zeigt die übereinander gelegten Fluoreszenzkanäle aus **A** und **B** mit dem zusätzlichen DAPI-Signal (markiert Zellkerne). Dieses Experiment wurde von Evrim Ercetin durchgeführt. Dennoch kann mit diesen beiden Kontrollen nicht ausgeschlossen werden, dass andere Matrix-Metalloproteinasen, die zum Teil erhebliche Strukturhomologien aufweisen, ebenfalls von dem Erstantikörper gebunden werden. Durch eine gleichartige Immunfluoreszenzfärbung an Gewebeschnitten von *Mmp12*-Nullmutanten ließe sich eine sichere Validierung des Befundes erreichen.

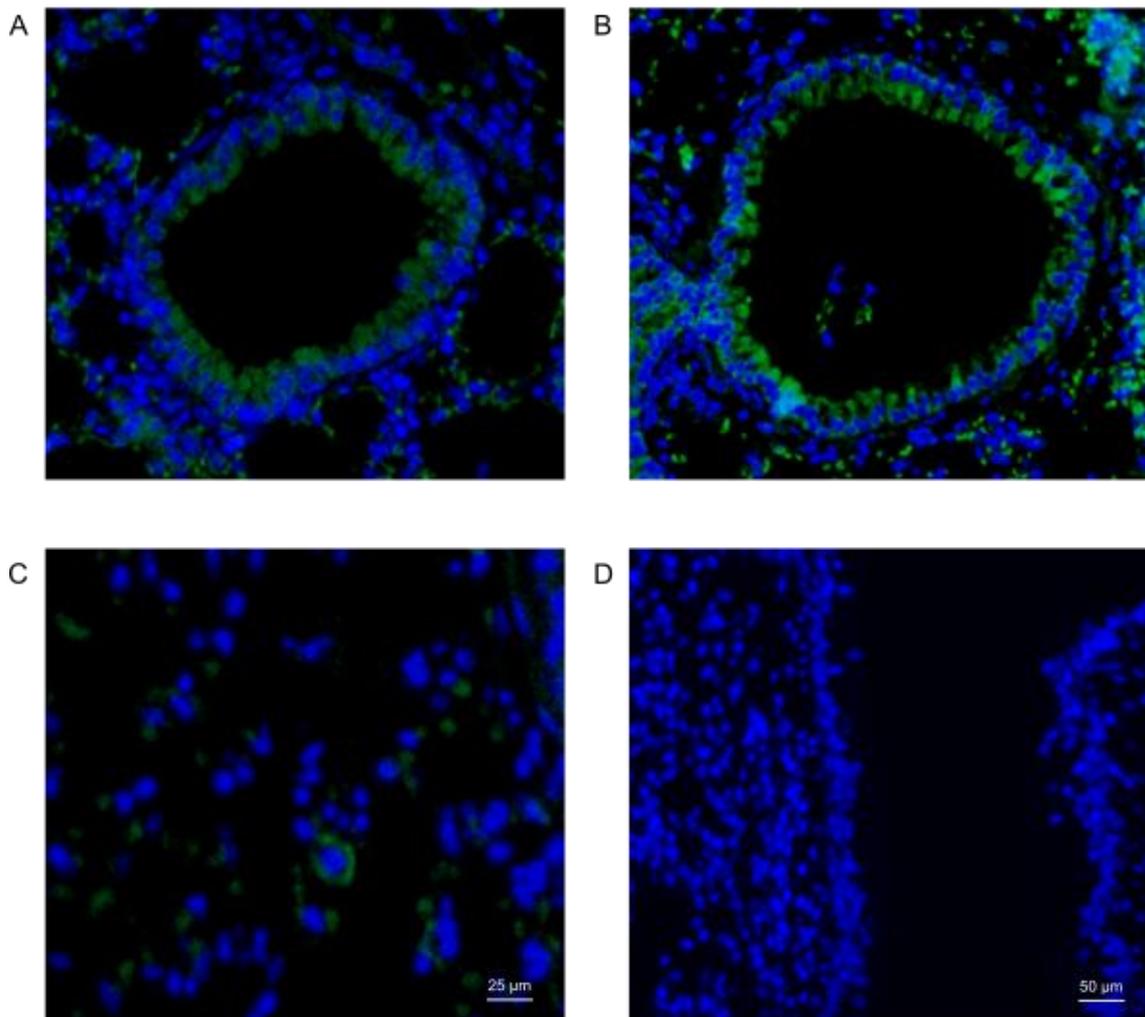


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12. Immunfluoreszenzfärbung von murinen Lungengewebes-Schnitten (3 µm Schichtdicke) mit Antikörpern gegen MMP12 (grün), DAPI (blau) als Zellkernfärbung. **A** zeigt einen Lungenschnitt einer *Trp53*-Wildtyp-Maus, **B** zeigt einen Lungenschnitt einer *Trp53*-Knock-out-Maus. **C** zeigt in doppelter Vergrößerung einen Alveolarmakrophagen, welcher als Positivkontrolle dient. **D** zeigt die Negativkontrolle, bei welcher der Erstantikörper gegen murines MMP12 weggelassen wurde, um die Spezifität der Färbung zu überprüfen.

3.2.2.2 Lokalisation der MMP12-Expression im Bronchialepithel

Zur weiteren Untersuchung der zelltypspezifischen Expression von MMP12 im Bronchialepithel wird eine Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 zusammen mit typischen Markerproteinen für die wichtigsten Zelltypen der kleinen Atemwege durchgeführt. Die dargestellte Färbung von MMP12, Zilien der Flimmerzellen und den Zellkernen stellt die intensive Expression von MMP12 besonders in nicht-zilierten Zellen dar (Abbildung 10). Gleichzeitig wird eine diffuse Anfärbung weiterer Zellen des Bronchialepithels und des peribronchialen Gewebes deutlich, da MMP12 typischerweise sekretiert wird. Abbildung 11 zeigt die enge Kolo-kalisation von dem Markerprotein

Zytochrom P450 4 B 1 (CYP4B1) der Keulenzellen mit MMP12. Deutlich wird also in zwei unabhängigen Experimenten, dass MMP12 nicht nur in aktivierten Alveolarmakrophagen exprimiert wird, sondern auch in den CYP4B1-positiven, detoxifizierenden Keulenzellen des Bronchialepithels. Auch die typische Form der angefärbten Zellen zeigt die Expression von MMP12 in den Keulenzellen (Abbildung 10). Dieses Expressionsmuster von MMP12 macht die Bedeutung der Verteilung der Zelltypen des Bronchialepithels für die Entzündungsreaktion direkt an den Atemwegen deutlich und lässt weitere Funktionen von MMP12 erahnen. Einen Expressionsunterschied zwischen den Genotypen kann aber, wie oben dargestellt, nicht festgestellt werden.

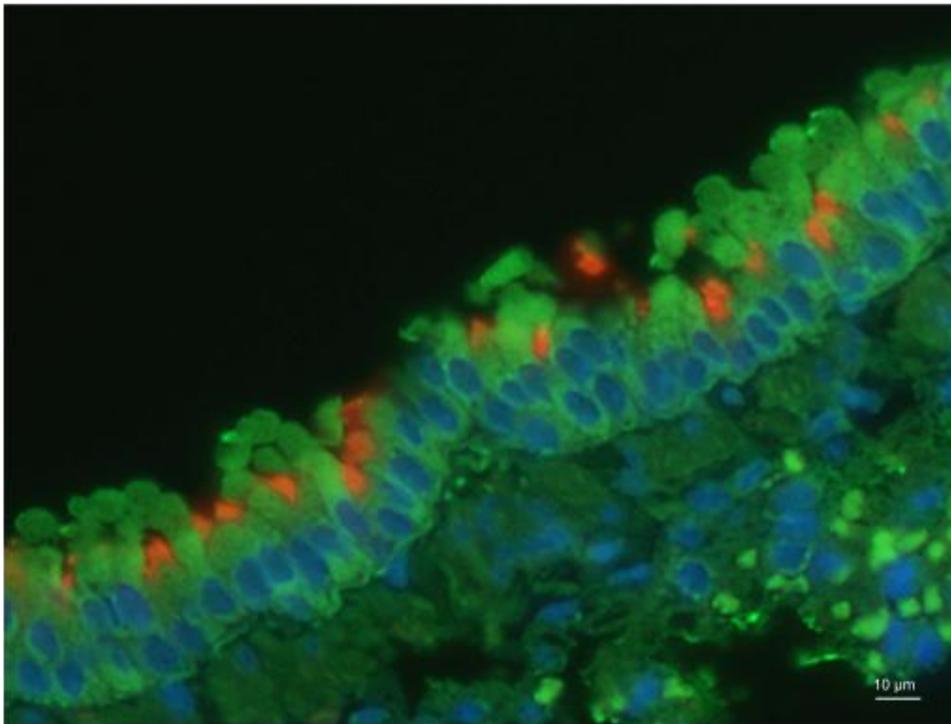


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 und azetyliertes- α -Tubulin. Immunfluoreszenzfärbung von murinen Lungengewebschnitten (3 μm Schichtdicke) mit primären Antikörpern gegen MMP12 (mit grün fluoreszierendem Zweitantikörper) und azetyliertes- α -Tubulin (einem Marker für Kinosilien der Flimmerzellen, mit rot fluoreszierendem Zweitantikörper). In Blau (DAPI) sind die Zellkerne markiert.

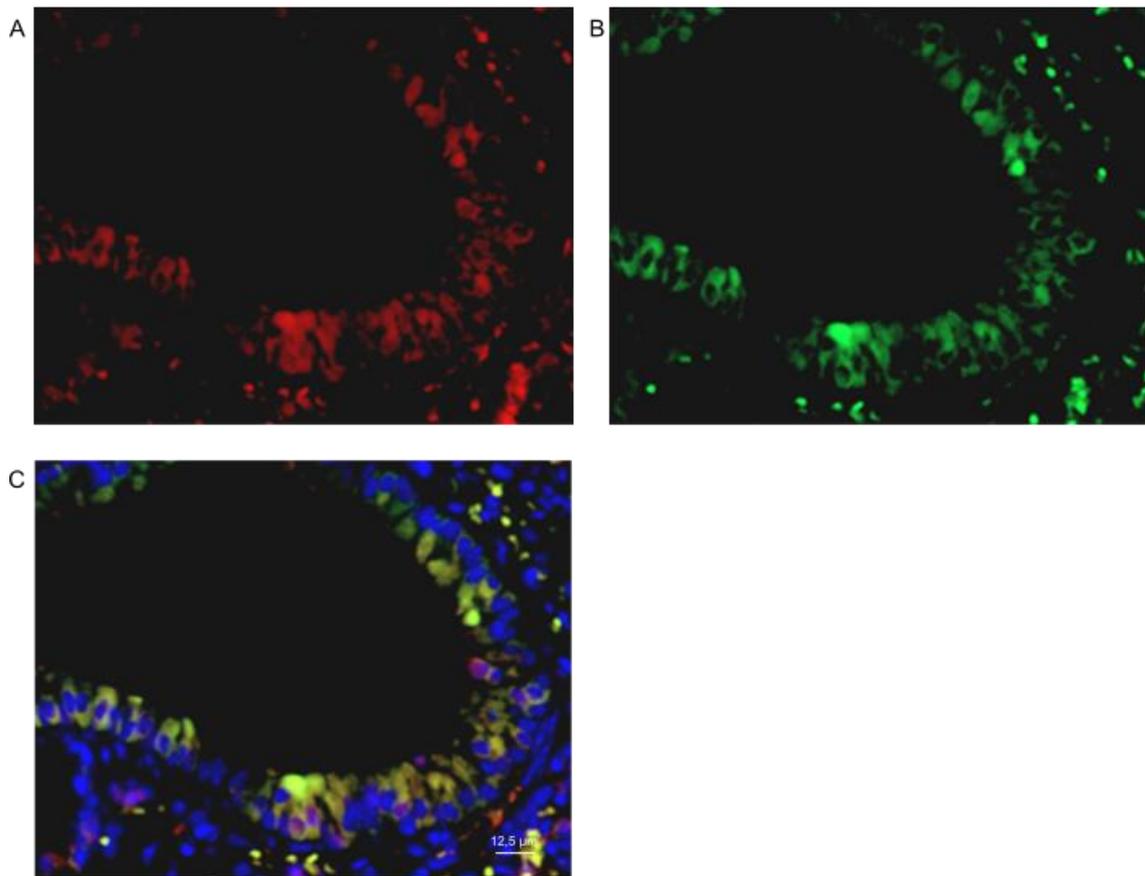


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung für MMP12 und CYP4B1. Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebschnitten (3 µm Schichtdicke). Bild **A** zeigt die Expression des Keulenzellmarkers CYP4B1. Bild **B** zeigt die Expression von MMP12. Bild **C** zeigt die übereinander gelegten Fluoreszenzkanäle aus **A** und **B** mit dem zusätzlichen DAPI-Signal (markiert Zellkerne). Dieses Experiment wurde von Evrim Ercetin durchgeführt.

3.2.2.3 *Timp*-Expression im Bronchialepithel

Um eine funktionelle Aussage über die pulmonale Entzündungsreaktion treffen zu können, muss nicht nur die Expression von Proteasen, sondern auch die von Antiproteasen untersucht werden. Als wichtige physiologische Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen gelten die Proteine der TIMP-Familie (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Alle vier Mitglieder der TIMP-Familie zeigen ein deutlich überlappendes Spektrum den von ihnen inhibierten Enzymen, sodass eine Expressionsanalyse aller in der Lunge exprimierten Mitglieder notwendig ist. Folglich wurde die mRNA-Expression von *Timp1*, *Timp2* und *Timp3* zunächst orientierend durch eine quantitative reverse Echtzeit-PCR untersucht. *Timp4* wird nicht in der Lunge exprimiert und wurde deshalb nicht untersucht. Die mRNA-Expression des *Timp1*-Transkripts zeigt dabei in *Trp53*-Knock-out-Lungen eine statistisch signifikante ($p = 0,0136$) Reduktion der Expression um 28% verglichen mit *Trp53*-Wildtyp-Lungen (Abbildung 12). Bei den anderen beiden TIMP-

Familienmitgliedern, die in der Lunge exprimiert werden, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kohorten.

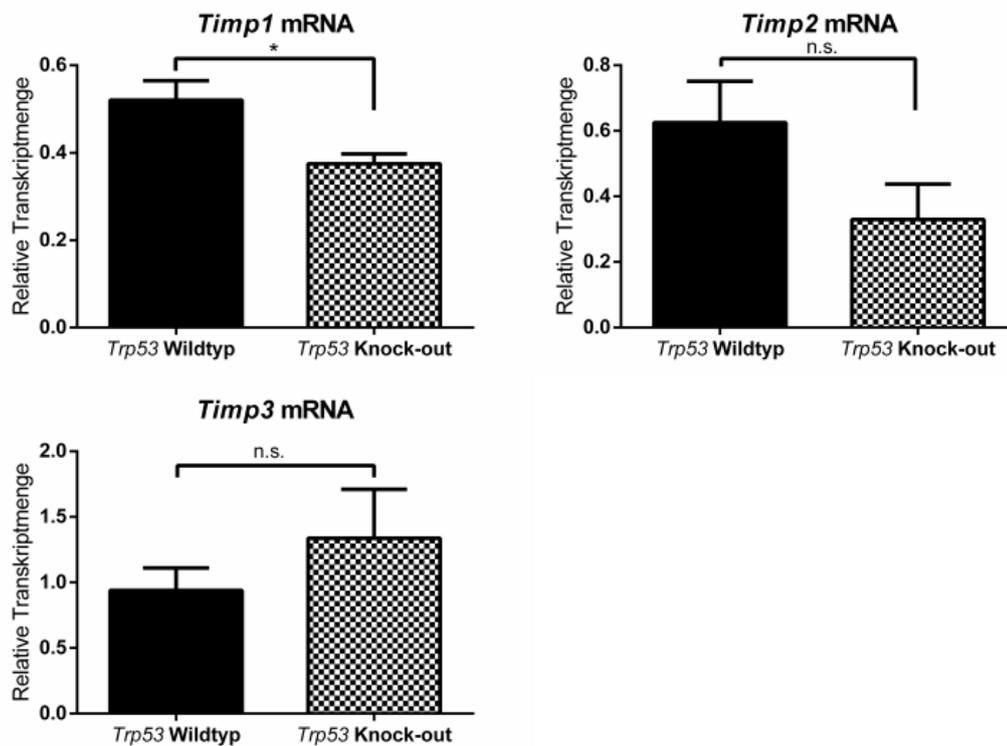


Abbildung 12: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von *Timp1*, *Timp2* und *Timp3*. Die mRNA-Expression der jeweiligen Transkripte ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen in allen Experimenten $n = 5$.

Um zu überprüfen, ob die sich die dargestellte Expressionsdifferenz zwischen beiden Genotypen auch auf Proteinebene fortsetzt, wurden Western-Blot-Proteinexpressionsanalysen von Gewebelysaten von *Trp53*-Wildtyp- und *Trp53*-Knock-out-Lungen angefertigt (Abbildung 13). Zur Objektivierung der dargestellten TIMP1-Proteinexpression bezogen auf die Ladekontrolle β -Actin ist auch die Quantifizierung des Blots abgebildet, sie belegt die signifikante ($p = 0,03$) Reduktion der TIMP1-Expression auf Proteinebene um 77% (Abbildung 13).

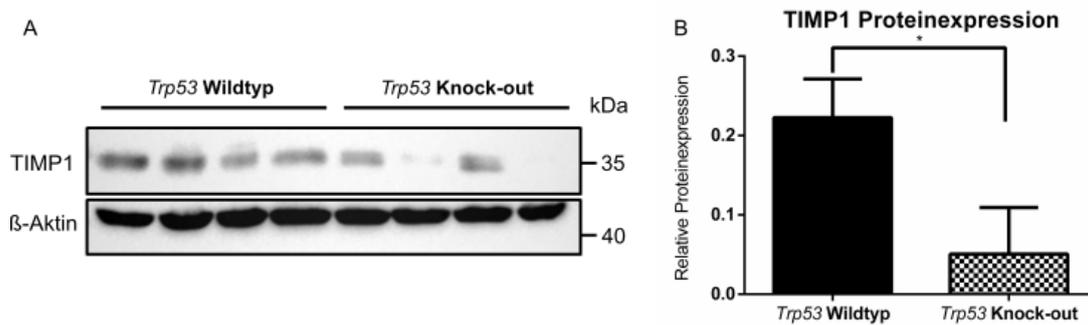


Abbildung 13: Western-Blot von Lungenlysaten für TIMP1. Die Proteinextrakte wurden in einem 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Erstantikörpern gegen TIMP1 und β -Aktin als Ladekontrolle detektiert. **B** stellt weiterhin eine Quantifizierung des obigen Western-Blots dar, bei welcher die spezifisch für TIMP1 angefärbte Fläche durch die jeweilige Fläche des β -Aktin-Signals dividiert wurde.

3.2.2.4 Lokalisation der *Timp1*-Expression

Die oben gezeigte Abhängigkeit der Expression von *Timp1* von dem *Trp53*-Status im Lungengewebe deutet auf eine mechanistische Relevanz hin und wird deshalb genauer lokalisiert. Dafür wurde eine immunhistochemische (IHC) Färbung von naiven Lungen (je *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-defizient) mit einem Erstantikörper gegen TIMP1 durchgeführt, um gleichzeitig eine spezifische Detektion von TIMP1 sowie eine histologische Zuordnung der Expression zu ermöglichen. An der typischen Zellform zeigt sich, dass TIMP1 vorrangig in Keulenzellen gebildet wird (Abbildung 14). Die deutliche Differenz der Proteinmengen von TIMP1 zwischen *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out, die sich in diesen histologischen Schnitten zeigt, kann allerdings wegen der Sättigungskinetik der Peroxidasereaktion bei der Immunhistochemie nur bedingt als Maß für die tatsächliche TIMP1-Proteinlevel herangezogen werden. Die deutliche Färbedifferenz spricht im Kontext der starken mRNA-Transkriptmengendifferenzen jedoch für eine relevant geringere Proteinkonzentration von TIMP1 bei *Trp53*-Nullmutanten.

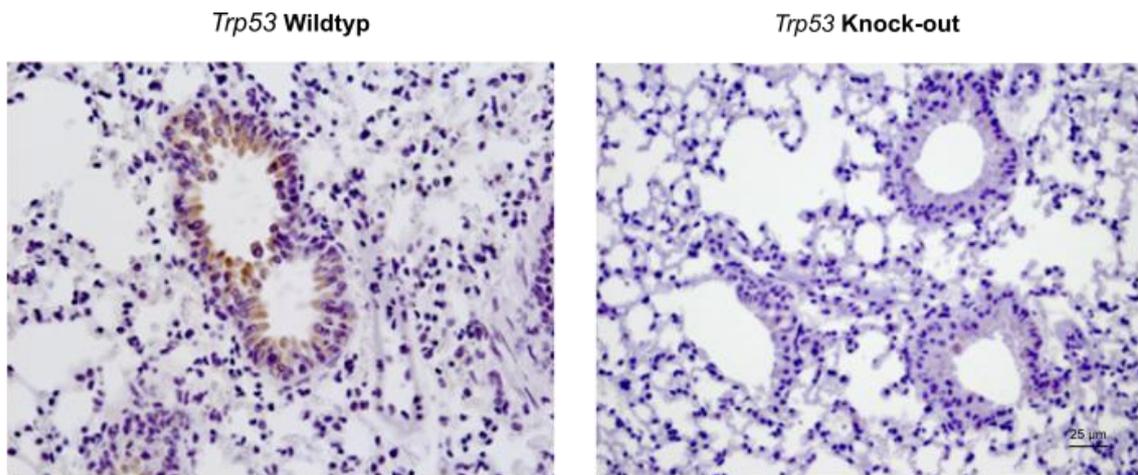


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung von TIMP1. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen TIMP1 und Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Keulenzellen den zentralen Ort der epithelgebundenen Expression von *Mmp12* und *Timp1* darstellen. Die Hydrolyse von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wird also auch vonseiten des Bronchiepithels beeinflusst. Da die Expression von *Timp1* bei *Trp53* Knock-out deutlich geringer ist, zeigen diese Ergebnisse den hemmenden Einfluss von P53 auf die (peri-)bronchiale Entzündungsreaktion. Gleichzeitig legen diese Ergebnisse, der Protease-Antiprotease-Hypothese folgend, eine überschießende monozytäre und neutrophile Entzündungsreaktion bei *Trp53* Nullmutanten nahe.

3.2.3 Beurteilung der peribronchialen Fibrosierung

Chronische Entzündungsreaktionen zeigen typischerweise eine Fibrosierung des chronisch entzündeten Gewebes. Bei chronischen Entzündungen der Atemwege wie bei der COPD trägt diese peribronchiale Fibrosierung mit zu der fixierten Stenosierung der kleinen Atemwege bei. Um eine mögliche Fibrosierung bei dem chronischen Entzündungsgeschehen in den Atemwegen von *Trp53*-Knock-out Mäusen zu untersuchen, werden Lungenschnitte mit einer unspezifischen Kollagenfärbung (angefärbt werden insbesondere Kollagen I und III) dargestellt (Sirius Rot). Als Gegenfärbung erfolgt eine Grünfärbung der nicht-kollagenen Proteine (*fast green*, Abbildung 15). Die systematische histologische Einschätzung zeigt keine wesentliche Differenz in Menge und Verteilung des interstitiellen Kollagens, sodass eine relevante Fibrosierung des peribronchialen Bindegewebes ausgeschlossen werden kann.

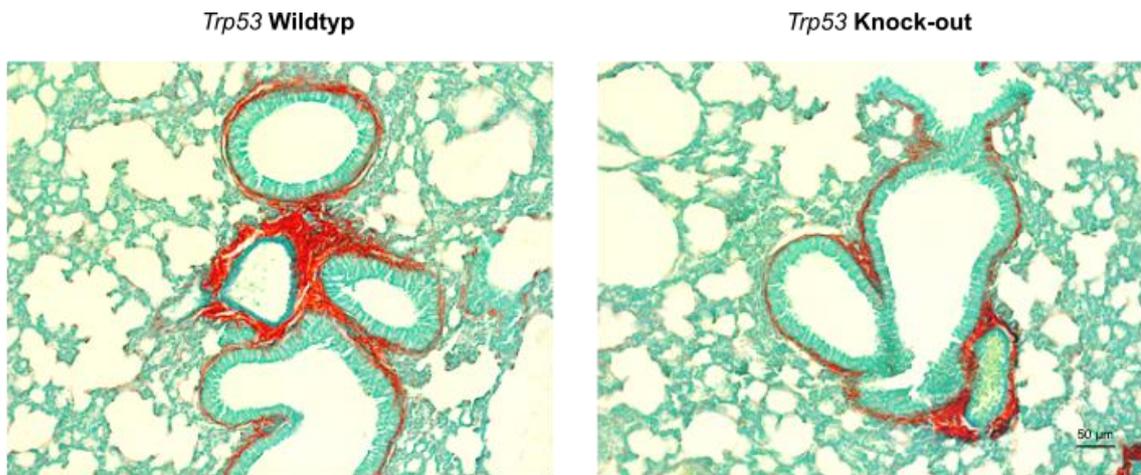


Abbildung 15: Picro-Sirius-Rot-Färbung von Lungenschnitten. Picro-Sirius-Rot-Färbung von Lungenschnitten 16 Wochen alter Mäuse. 5 µm Schichtdicke.

3.3 Struktur und Funktion des Bronchialepithels von *Trp53*-Knock-Out-Mäusen

Die oben skizzierte Bedeutung von Keulenzellen für die peribronchiale Entzündung wirft die Frage auf, ob sich abhängig vom P53-Genotyp der Anteil der verschiedenen Zelltypen am Bronchialepithel verändert und ob eine solche Veränderung Ursache der verschieden starken Expression von *Timp1* zwischen den untersuchten Genotypen ist. Gleichzeitig ist das Verhältnis der einzelnen Zelltypen des Bronchialepithels wichtig für die Gesamtfunktion des Epithels, insbesondere für die mukoziliäre Reinigung (*Clearance*). Zur sicheren Differenzierung der Zelltypen des Bronchialepithels werden Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Markern für Flimmerzellen und Keulenzellen durchgeführt. Aus den standardisierten mikroskopischen Bildern wird das jeweilige Fluoreszenzsignal für Keulenzellen (angefärbt wird das in der Lunge keulenzellspezifische Protein Sekretoglobin 1 Familie A Mitglied 1 (SCGB1A1)) und für Flimmerzellen (angefärbt wird azetyliertes-Alpha-Tubulin) auf die Länge des untersuchten Epithels normiert und statistisch ausgewertet (Abbildung 16-19).

3.3.1 Anteil von Keulenzellen im Bronchialepithel

Zur Untersuchung des Anteils von Keulenzellen am Bronchialepithel im Vergleich zwischen *Trp53*-kompetenten und -defizienten Mäusen muss hierbei auf die quantitative Auswertung von Immunfluoreszenzaufnahmen zurückgegriffen werden, weil das Protein SCGB1A1 auch in anderen Zelltypen außerhalb der Lunge synthetisiert wird und von da aus in das Blut abgegeben wird. Eine quantitativ genauere Untersuchung, beispielsweise

durch einen Western Blot, würde also durch mögliche P53-abhängige Veränderungen in anderen Organen verzerrt. Die quantitative Auswertung von Immunfluoreszenzschnitten erlaubt deshalb den genaueren Vergleich des Anteils von Keulenzellen am Bronchialepithel zwischen *Trp53*-Wildtyp und -Knock-out-Mäusen. Zwar ist durch Diffusion des sekretierten Proteins SCGB1A1 nicht jede Zelle zweifelsfrei als Keulenzelle oder Zelle anderer Differenzierung einzuordnen, die Expression von *Scgb1a1* steht aber in einem engen Verhältnis zur Anzahl differenzierter Keulenzellen. Der statistische Vergleich des SCGB1A1-Signals in der Immunfluoreszenz zwischen *Trp53*-Wildtyp und -Knock-out-Mäusen zeigt keine signifikante Differenz (Abbildung 17). Dieses Ergebnis entspricht dabei dem morphologischen Eindruck einer normalen Verteilung von Keulenzellen auch bei P53-defizienten Lungen (Abbildung 16). Auch in der gealterten Mauskoorte zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzsignalintensität für SCGB1A1 als Marker für die Anzahl an Keulenzellen im Bronchialepithel (Abbildung 17). Die reduzierte Expression von *Timp1* in *Trp53*-Knock-out Mäusen ist also nicht allein auf einen geringeren Anteil der sekretorischen Keulenzellen zurück zu führen, die nach diesen immunhistochemischen Daten an der TIMP1-Sekretion beteiligt sind.

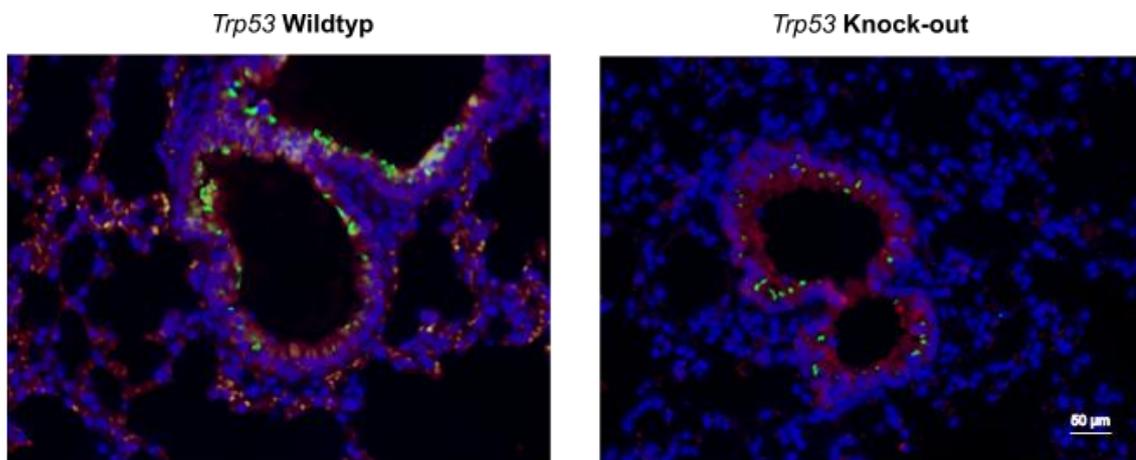


Abbildung 16: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Bronchioli von Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten 16 Wochen alter Mauslungen. Gefärbt wurden SCGB1A1 (rot) als Marker für Keulenzellen und azetyliertes- α -Tubulin (grün) als Marker für Flimmerzellen. In blau sind Zellkerne dargestellt (DAPI). Schichtdicke 3 μ m.

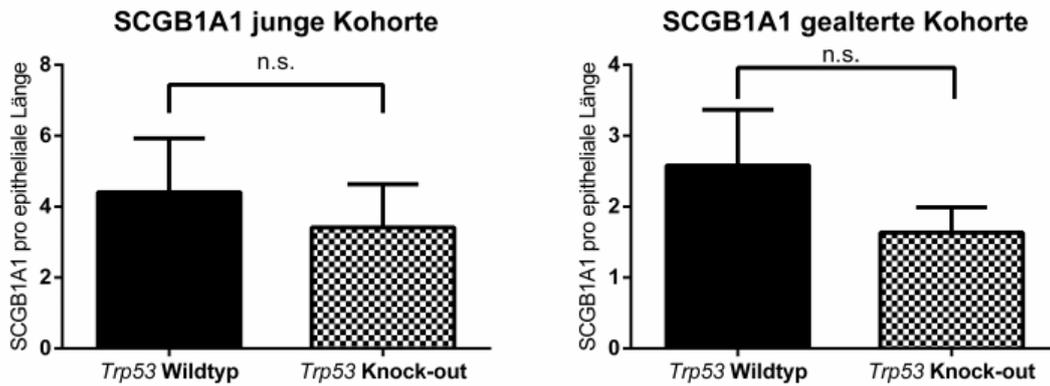


Abbildung 17: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals für SCGB1A1 normalisiert auf die Länge des Bronchialepithels bei jungen und gealterten Mäusen. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen in der jungen Kohorte $n = 5$, in der gealterten Kohorte $n = 3$. Die Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt, sodass ein quantitativer Vergleich der SCGB1A1-Expression zwischen den Kohorten nicht möglich ist.

3.3.2 Anteil von Flimmerzellen im Bronchialepithel

Wesentlich für die Funktion des Bronchialepithels sind Flimmerzellen, die durch den synchronisierten Schlag ihrer Kinozilien einen konstanten Abtransport von Bronchialsekret mit darin gebundenen aerogenen Pathogenen und Partikeln nach oral ermöglichen. Wie in der Einleitung beschrieben, stellt *Trp53* einen wesentlichen Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Flimmerzellen dar. Die engen funktionellen Wechselwirkungen der P53-Familienmitglieder untereinander legen deshalb einen Einfluss des P53-Status auf die Verteilung und Funktion von Flimmerzellen nahe. Außerdem ist die funktionelle Integrität des Bronchialepithels eine wesentliche Determinante der peribronchialen Entzündungsreaktion, die wie oben gezeigt von P53 beeinflusst wird. Ein pathomechanistisches Beispiel dieser engen Beziehung stellt die Primäre Ziliäre Dyskinesie (PCD) dar, bei der ein hereditärer Verlust der Beweglichkeit der Kinozilien zu einem stark entzündlichen Lungen-Phänotyp führt, weil inhalierte Pathogene nicht mehr mechanisch aus den Atemwegen entfernt werden können. Ein Verlust von Flimmerzellen zeigt sich auch in frühen Stadien der COPD. Der Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel von *Trp53*-defizienten Mäusen muss deshalb untersucht werden um a) zu überprüfen, ob die verstärkte peribronchiale Entzündungsreaktion in *Trp53*-Knock-out-Atemwegen neben der verminderten Expression von *Timp1* auch durch eine verminderte mukoziliäre Reinigung verursacht wird und b) um zu überprüfen, ob der globale Knock-out von *Trp53* in der Maus auch die Veränderungen im Bronchialepithel bei der COPD phänokopiert. Dazu werden Lungenschnitte von jungen und von gealterten Mäusen beider Genotypen per

Immunfluoreszenz spezifisch für azetyliertes- α -Tubulin, einem Strukturprotein der Kinozilien der Flimmerzellen, angefärbt. Die Auswertung des Fluoreszenzsignals erfolgt analog der *Scgb1a1*-Expressionsanalyse normiert auf die Länge des untersuchten Epithels. Das Fluoreszenzsignal von azetyliertem- α -Tubulin dient hier also als Korrelat des Anteils von Flimmerzellen am Bronchialepithel (Abbildung 18).

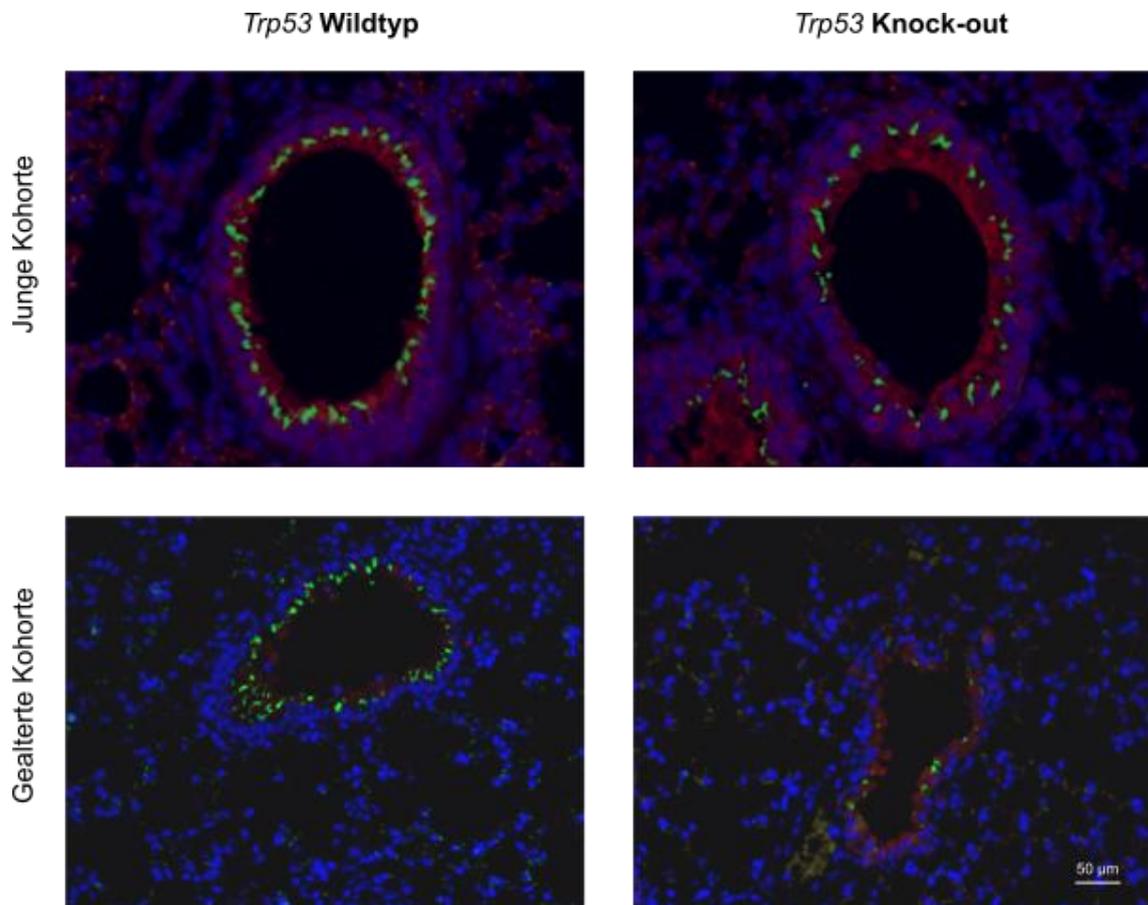


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten junger und gealterter Mäuse, *Trp53*-Wildtyp und -Knock-out. In grün angefärbt ist azetyliertes- α -Tubulin. In rot ist SCGB1A1 angefärbt, das sich im Zytoplasma der Keulenzellen befindet. In blau sind die Zellkerne dargestellt. Schichtdicke 3 μ m.

Der statistische Vergleich zwischen den beiden Genotypen in beiden Alterskohorten zeigt ein deutlich vermindertes Fluoreszenzsignal für azetyliertes- α -Tubulin bei Tieren, die defizient sind für *Trp53*. In der jungen Kohorte zeigten die *Trp53*-Knock-out-Tiere nur 33,5 % so viel Fluoreszenzsignal für azetyliertes- α -Tubulin wie die Wildtypen. Dieser Effekt zeigt sich noch verstärkt bei gealterten Tieren, bei denen die *Trp53*-Knock-out-Tiere nur 25,9 % so viel Fluoreszenzsignal wie die Wildtypen zeigen (Abbildung 19). Die genaue Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigt, dass das verminderte Fluoreszenzsignal des Bronchialepithels von *Trp53*-Knock-out-Tieren durch eine geringere

Anzahl von Flimmerzellen und nicht durch eine reduzierte Zilierung der Flimmerzellen bedingt ist.

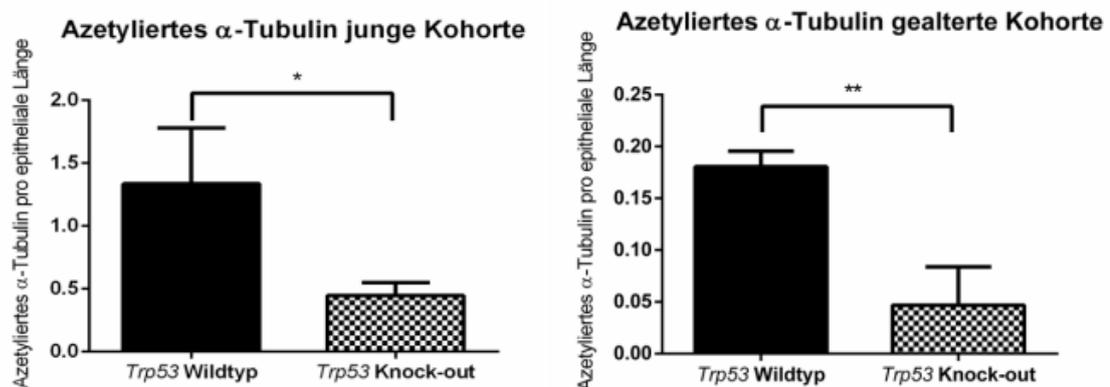


Abbildung 19: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals für azetyliertes- α -Tubulin normiert auf die Länge des Bronchialepithels bei jungen und gealterten Mäusen. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen in der jungen Kohorte $n = 5$, in der gealterten Kohorte $n = 3$. Die Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt, sodass ein quantitativer Vergleich des Fluoreszenzsignals für azetyliertes- α -Tubulin zwischen den Kohorten nicht möglich ist.

Um diese fluoreszenzmikroskopischen Befunde quantitativ belastbarer zu verifizieren, wird die Expression von kinozilientypischen Proteinen per Western Blot und die Expression von kinozilientypischen mRNA-Transkripten per reverser Echtzeit-PCR zwischen den Genotypen verglichen (Abbildung 20).

Die Bewegung von Kinozilien ist durch die Funktion von Dyneinen bedingt, die als Motorproteine die Mikrotubulus-Doubletten der Kinozilien in Form von äußeren und inneren Dyneinarmen vernetzen (Abbildung 21). Ihre ATP-abhängigen Bewegungen entlang des benachbarten Mikrotubulus bedingen eine langsame Biegung des gesamten Kinoziliums, bis schließlich ein Biegungsmaximum erreicht ist und ein schneller Rückschlag des Kinoziliums zu einer Bewegung der umgebenden Flüssigkeit führt. Der äußere Dyneinarm besteht dabei unter Anderem aus Dynein-axonemale-intermediäre-Kette 1 (DNAI1) und der innere Dyneinarm aus Dynein-axonemale-leichte-intermediäre-Kette 1 (DNALI1).

Die Expression von muriner *Dnali1*-mRNA in Lungenlysaten wird in *Trp53*-Wildtyp- und -Knock-out-Mäusen per reverser Echtzeit-PCR quantifiziert (Abbildung 20). Korrespondierend zu dem geringeren Fluoreszenzsignal für azetyliertes- α -Tubulin in der Immunfluoreszenzmikroskopie von *Trp53*-Knock-out-Atemwegen zeigt sich auch eine signifikant geringere Expression (50,4 %) von *Dnali1*-mRNA in Lungenlysaten dieses Genotyps. Auch die Proteinexpression des äußeren Dyneinarm-Proteins DNAI1 fällt bei

Trp53-Knock-out-Lungen geringer aus als bei Wildtypen (Abbildung 20). Gleichzeitig ist innerhalb der Knock-out-Kohorte eine hohe Varianz in der DNAI1-Proteinexpression festzustellen. Zusammengenommen finden sich bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen verglichen mit Wildtypen signifikant weniger Flimmerzellen im Bronchialepithel und in Lungenlysaten von *Trp53*-Knock-out-Mäusen findet sich eine signifikant geringere Expression von Bestandteilen der äußeren und inneren Dyneinarme sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene.

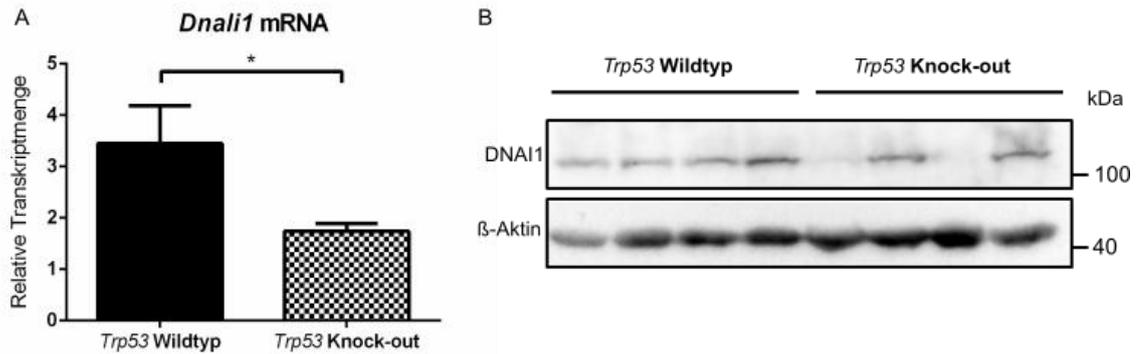


Abbildung 20: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für *Dnali1* und Western Blot für DNAI1. **A** zeigt die quantitative reverse Echtzeit-PCR von Lungenlysaten von *Trp53*-Wildtyp- und *Trp53*-Knock-out-Mäusen. Die mRNA-Expression der Transkripte ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen in allen Experimenten $n = 5$. **B** zeigt einen repräsentativen Western Blot von Lungenlysaten junger Mäuse mit *Trp53*-Wildtyp bzw. -Knock-out. β -Aktin dient als Ladekontrolle. DNAI1 und β -Aktin wurden von spezifischen Erstantikörpern gebunden und diese von HRP-konjugierten Zweitantikörpern detektiert.

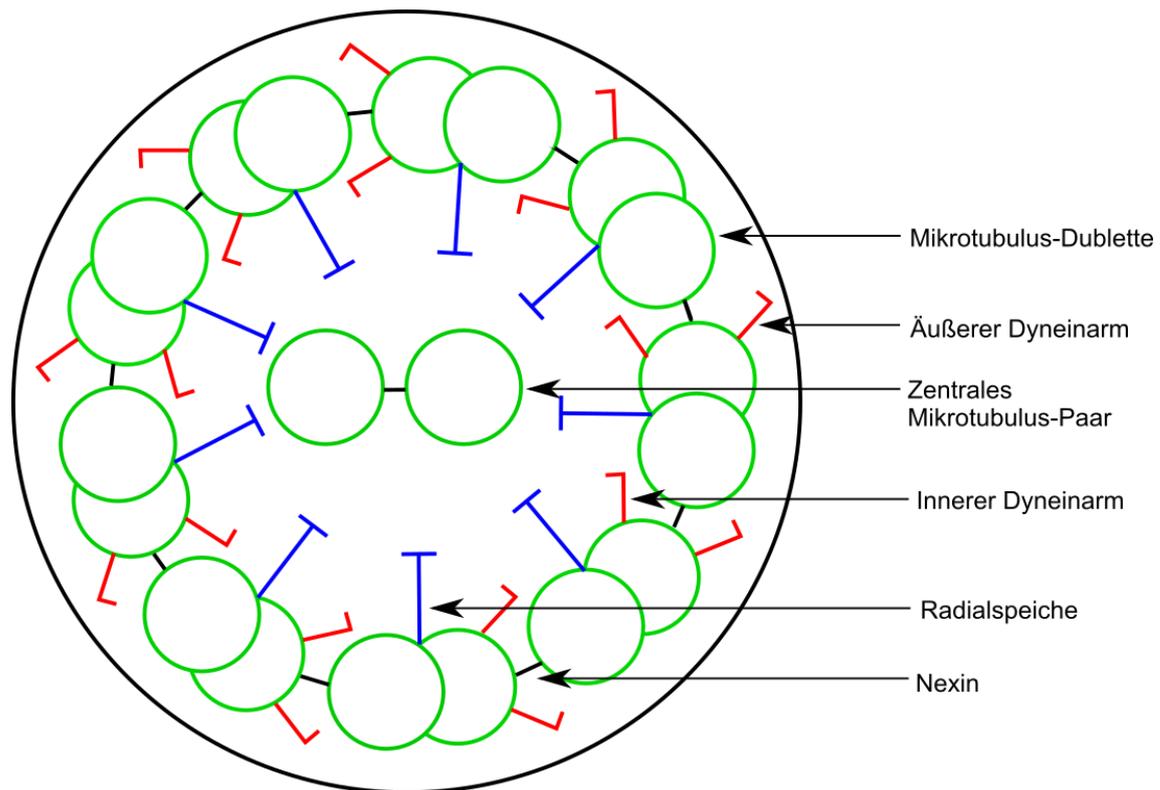


Abbildung 21: Schemazeichnung des Axonems von Kinozilien. Solche Kinozilien kommen auf der apikalen Zelloberfläche von Flimmerzellen vor.

3.3.3 Anteil von Becherzellen im Bronchialepithel

Das muköse Sekret der Becherzellen ist reich an Muzinen, die sich durch ihre Oligosaccharid-Seitenketten gut mithilfe der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) unspezifisch anfärben lassen. Bei der COPD zeigt sich typischerweise eine Metaplasie des Bronchialepithels mit vermehrtem Vorkommen von Becherzellen auch in distalen Abschnitten des Bronchialbaums. Um die epithelialen Veränderungen bei *Trp53*-defizienten Lungen auf einen vergleichbaren Phänotyp hin zu untersuchen, wurden Lungenschnitte von *Trp53*-Wildtyp und -Knock-out-Tieren mit der PAS-Färbung untersucht und histologisch verglichen. Die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen schließen eine signifikante spontane Becherzell-Metaplasie bei *Trp53*-Knock-out-Lungen aus (Abbildung 22). Zur weiteren molekularen Spezifizierung der Muzin-Produktion wurde die mRNA-Expression von Muzin 5 B (MUC5B), einem Hauptprodukt der trachealen Becherzellen und submukösen Trachealdrüsen, untersucht. Abbildung 23 zeigt den Vergleich der mRNA-Expression von *Muc5b* mittels quantitativer reverser Echtzeit-PCR von *Trp53*-Wildtyp- und -Knock-out-Mäusen. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen, was die histologischen Befunde bestätigt. *Trp53*-defiziente Mäuse zeigen also eine verringerte Anzahl an Flimmerzellen im Bronchialepithel ohne eine

gleichzeitige Hyperplasie der bronchialen Becherzellen (als sekretorische Zellen der oberen Atemwege) oder der Keulenzellen aufzuweisen. Die Untersuchung der funktionellen Auswirkungen dieser veränderten Zusammensetzung des Bronchialepithels ist dennoch wichtig, um die Bedeutung von P53 für die Lungengesundheit genauer zu verstehen.

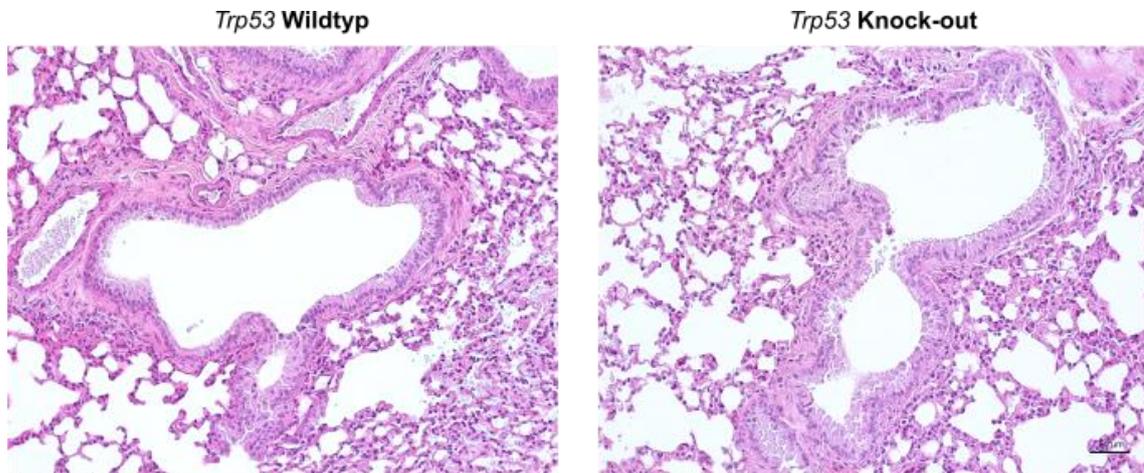


Abbildung 22: Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) von Lungenschnitten. PAS-Färbung von Lungenschnitten 16 Wochen alter Mauslungen, Schichtdicke 3 µm. In Pink werden unspezifisch Oligosaccharide, wie in Glykoproteinen, dargestellt.

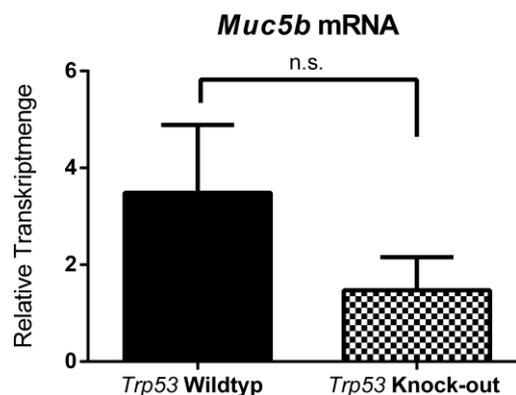


Abbildung 23: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von *Muc5B*. Die mRNA-Expression des Transkripts ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen n = 5.

3.3.4 Mukoziliäre Reinigung in *Trp53*-defizienten Atemwegen

Eine wesentliche Funktion des Bronchialepithels ist die mukoziliäre Reinigung. Physiologischerweise verfangen sich inhalierte Partikel der Atemluft durch turbulente Strömungen im Bronchialsekret. Der koordinierte Schlag der Flimmerzellen bewegt diese Sekretschicht mit den darin gebundenen Partikeln kontinuierlich nach oral, sodass eine mechanische Elimination von inhalierten Feststoffen aus den Atemwegen erfolgt. Für diese komplexe Funktion des Bronchialepithels ist ein ausgeglichenes Verhältnis von

sekretorischen Zellen und Flimmerzellen notwendig. Außerdem müssen die Kinozilien einer Flimmerzelle koordiniert und gleichgerichtet schlagen, um eine effektive Bewegung des Bronchialsekrets zu bewirken. Weiterhin ist der transepitheliale Elektrolyt- und damit auch Flüssigkeitstransport entscheidend, um die Viskosität des Bronchialsekrets zu regulieren und so die Bewegung der Kinozilien der Flimmerzellen erst zu ermöglichen. Die Transportfunktion des Bronchialepithels ist also auf eine enge Koordination der Funktionen verschiedener Zelltypen ebenso angewiesen wie auf die vollständige Differenzierung der oberflächlich liegenden Zellschicht.

Zur Überprüfung der Transportfunktion des Bronchialepithels eignet sich experimentell besonders das tracheale Epithel, weil es präparatorisch bei der Maus am besten zugänglich ist. Zwar besteht das Epithel der *Trachea* bei der Maus aus einem pseudostratifiziertem, mehrreihigen Epithel und nicht aus einem einschichtigen wie das Bronchialepithel bei der Maus; anders als bei Menschen finden sich aber bei der Maus auch im Trachealepithel Keulenzellen. Das respiratorische Epithel der *Trachea* der Maus entspricht in seinem histologischen Aufbau also demjenigen peripherer Bronchioli des Menschen. Diejenigen Zelltypen, die sich im Bronchialepithel der Maus finden, kommen also auch im trachealen Epithel oberflächlich zu liegen, sodass eine Untersuchung der Transportfunktion des Trachealepithels eine generelle Aussage über die Transportfunktion des respiratorischen Epithels im ganzen Bronchialbaum treffen kann. Zur Messung des effektiven Partikeltransports werden die *Tracheae* der experimentellen Kohorten unmittelbar nach der Tötung in Zellkulturmedium in der Frontalebene aufgetrennt, gespült und fluoreszierende Latexpartikel zugegeben. Mithilfe einer Hochfrequenzkamera eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops kann die Bewegung der Latexpartikel verfolgt und quantifiziert werden. Die Bewegung der Latexpartikel dient hier also als Maß für den effektiven Sekrettransport und stellt somit eine Messung der Gesamtfunktion der Flimmerzellen dar. Die sekretorische Komponente der mukoziliären Reinigung bleibt bei dieser Methode allerdings unberücksichtigt, da die *Tracheae* vor der Messung gespült werden. Die Spülung ist notwendig, da bei der frontalen Auftrennung der *Tracheae* teilweise Schleimschichten entfernt werden und dadurch artifiziell Transportdifferenzen entstünden.

Wie in Abschnitt 3.3.2 dargestellt, haben *Trp53*-Knock-out-Mäuse einen geringeren Anteil Flimmerzellen im Bronchialepithel verglichen mit P53-kompetenten Mäusen. Eine funktionelle Einschränkung des Partikeltransports ist deshalb naheliegend und muss untersucht werden.

Die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Partikeltransportgeschwindigkeit zwischen *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out-*Tracheae* sind in Abbildung 24 dargestellt. Dabei zeigen *Trp53*-Knock-out-*Tracheae* eine im Durchschnitt 21,6 % langsamere Transportgeschwindigkeit als die Wildtypen. Dieses milde Transportdefizit ist dennoch statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Die Darstellung der Einzelmessungen der Partikel als Violin-Plot zeigt, dass sich die Häufigkeit der Einzelgeschwindigkeiten der Latexpartikel bei *Trp53*-Wildtyp-*Tracheae* harmonisch um den Mittelwert von $10,28 \mu\text{m/s}$ gruppieren. Bei den Knock-out-*Tracheae* hingegen findet sich nicht nur ein niedrigerer Mittelwert, sondern auch deutlich mehr sehr langsame Partikelgeschwindigkeiten und nur wenige schnelle Bewegungen, erkennbar an dem breiten Plotanteil zwischen null und zehn $\mu\text{m/s}$ und dem schmalen Plotanteil zwischen 15 und 20 $\mu\text{m/s}$. Diese Datenverteilung lässt sich durch die insgesamt geringere Anzahl an Flimmerzellen im Bronchialepithel von *Trp53*-Knock-out-Mäusen erklären, die eine langsamere Gesamtströmung des Mediums als bei Wildtypen hervorbringen. Gleichzeitig bewegen sich Partikel, die direkt über den Flimmerzellen schwimmen, mit der gleichen Geschwindigkeit wie auch bei Wildtyp-*Tracheae*, wenn von einer gleichen Schlagfrequenz der Kinozilien ausgegangen wird. Da jedoch weniger Flimmerzellen in *Trp53*-Knock-out-*Tracheae* vorkommen, finden sich weniger Messwerte dieser hohen Geschwindigkeit bei Knock-out-Tieren.

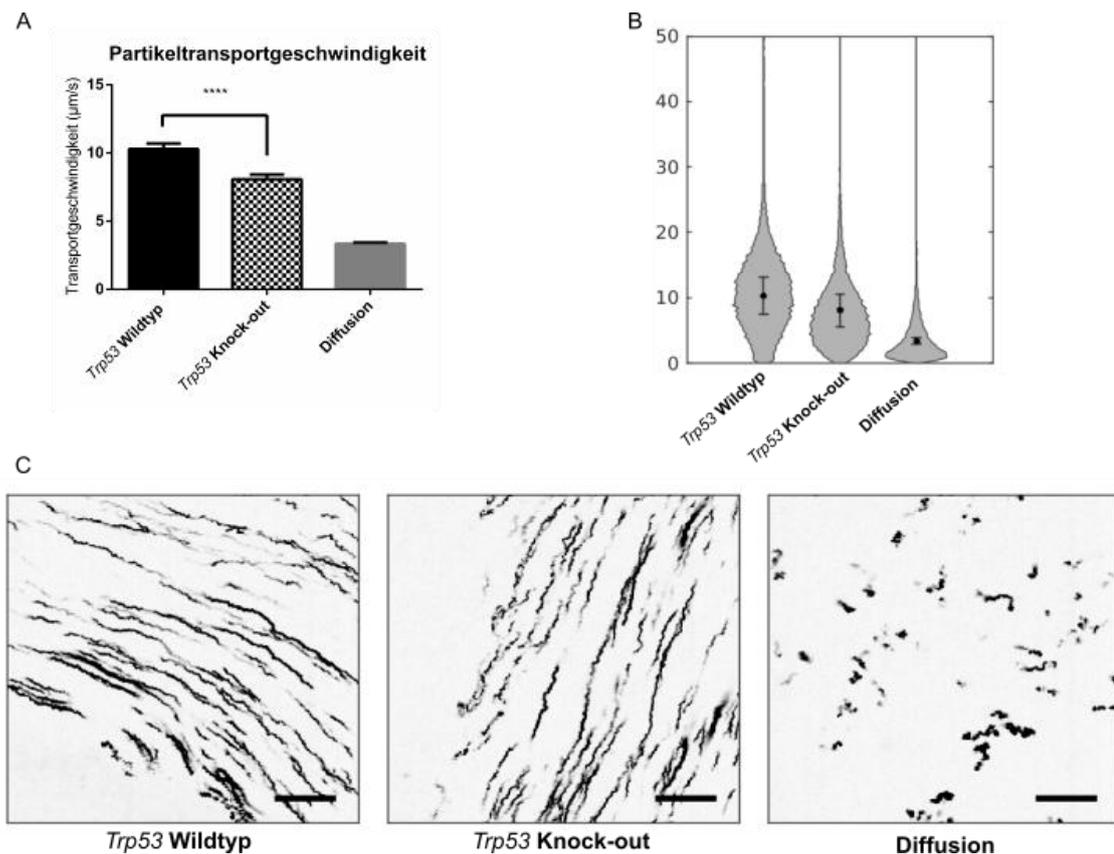


Abbildung 24: Mukoziliäre-Reinigungs-Untersuchung. **A** zeigt den Mittelwert der Partikelgeschwindigkeit für beide Genotypen (sowie den mittlere Standardfehler als Fehlerbalken) und als Negativkontrolle die Partikelgeschwindigkeit bei einem mechanisch zerstörten Epithel, bei dem nur die Partikeldiffusion gemessen wird. **B** zeigt als Violin-Plot die Häufigkeit der einzelnen Geschwindigkeiten der Partikel, den Mittelwert sowie die Standardabweichung. Dargestellt sind wieder *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out sowie die Diffusionskontrolle. **C** zeigt beispielhafte Trajektorien aus allen drei experimentellen Gruppen. Sie stellen den Weg von Partikeln in einer Videosequenz einer Wildtyp- und eine Knock-out-*Trachea* sowie in einer Diffusionskontrolle dar. Die Maßstabballen entsprechen einer Länge von 50 µm.

3.3.5 Expression von Differenzierungs- und Stammzellgenen in *Trp53*-Knock-out-Lungengewebe

Das Bronchialepithel von *Trp53*-Knock-out-Mäusen zeigt, wie oben dargestellt, weniger Flimmerzellen als das von Wildtypen und eine geringere Expression von ziliären Strukturgenen sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene. Diese funktionell entscheidende phänotypische Differenz zwischen Knock-out Tieren und Wildtypen legt ein Differenzierungsdefizit bei den Knock-out-Tieren nahe, da sich im Bronchialepithel von *Trp53*-Knock-out-Tieren zwar weniger Flimmerzellen, nicht aber mehr Becher- oder Keulenzellen finden. Zur Untersuchung dieses vermuteten Differenzierungsdefizits bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen werden einerseits die Expression von Genen der Differenzierung von Flimmerzellen untersucht wie Forkhead Box J1 (*Foxj1*), der

transaktivierenden Isoform von *Trp73* (*TAp73*) sowie ihrer n-terminal trunkierten Isoform ($\Delta Np73$). Andererseits wird die Expression von Stammzellmarkern in *Trp53*-Knock-out-Lungen im Vergleich zu Wildtyp-Lungen untersucht, um eine Verschiebung des Differenzierungsgrades von bronchialen Epithelzellen hin zu Stammzellen zu untersuchen. Hier dienen *Krt5* und *Nanog* als klassische Stammzellmarker, außerdem wird *Sax2* als wichtiger Transkriptionsfaktor der Basalzellen untersucht. Da der NOTCH-Signalweg die Differenzierung von Flimmerzellen durch die Induktion von *Krt5* inhibiert, wird auch die Expression von *Notch1* per quantitativer reverser PCR untersucht.

3.3.5.1 Expression von Flimmerzellendifferenzierungsgenen in *Trp53* Knock-out Lungen

TAp73 ist ein zentraler Regulator der Multiziliogenese und daher entscheidend für die Differenzierung von Flimmerzellen im respiratorischen Epithel. Da zwischen P53 und den anderen Mitgliedern der P53-Familie Rückkopplungsmechanismen bestehen, könnte der geringere Anteil von Flimmerzellen im Bronchialepithel von *Trp53*-Knock-out-Mäusen auf eine sekundär veränderte Expression von *TAp73* zurückzuführen sein. Außerdem besteht zwischen dem n-terminal trunkierten Genprodukt von *Trp73* ($\Delta Np73$), das dominant negative Transkriptionseffekte auf P53-Zielgene hat, ein negativer Rückkopplungsmechanismus mit P53, sodass ein Knock-out von *Trp53* im Mausmodell auch über eine veränderte $\Delta Np73$ -Expression die Differenzierung von respiratorischen Epithelzellen beeinflussen kann. Eine enthemmte Expression von $\Delta Np73$ könnte somit die zelluläre Differenzierung zu Flimmerzellen inhibieren.

Die Expression beider Genprodukte von *Trp73* zeigt keinen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Genotypen, sodass eine geringere Anzahl von Flimmerzellen wegen einer veränderten Expression der *Trp73*-Transkripte bei den *Trp53*-Knock-out-Mäusen ausgeschlossen werden kann (Abbildung 25). Dennoch lässt die Quantifizierung der *Trp53/Trp73/Trp63*-Genprodukte keine Aussage über die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren zu und ebensowenig schließt sie eine Heterodimerbildung mit möglichen abberanten Expressionsmustern aus.

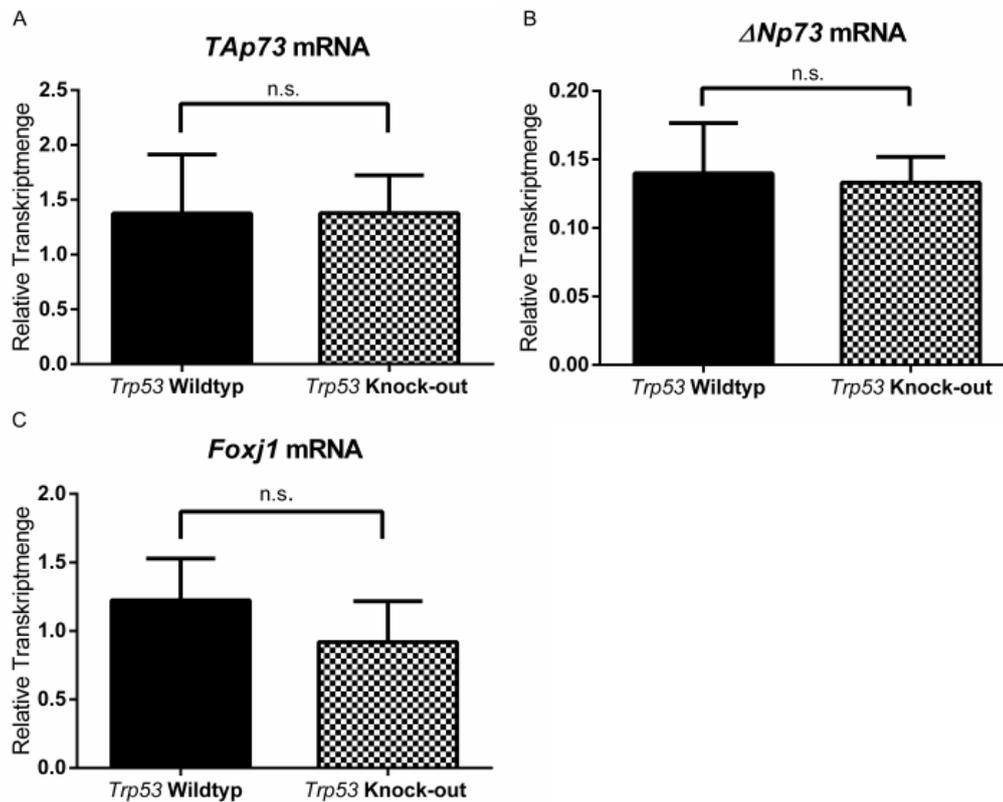


Abbildung 25: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von *TAp73* (A), $\Delta Np73$ (B) und *Foxj1* (C). Die mRNA-Expression des Transkripts ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen $n = 5$.

Die Expression von *Foxj1*, einem nachgeordneten Transkriptionsfaktor der Differenzierung von multizilierten Zellen, wurde ebenfalls per quantitativer reverser PCR aus Lungenlysaten von *Trp53*-Wildtyp und -Knock-out-Mäusen untersucht. Auch die Expression von *Foxj1* differiert nicht zwischen den Genotypen (Abbildung 25).

3.3.5.2 Expression von Stammzellgenen in *Trp53*-Knock-out Lungen

Zur Untersuchung der Hypothese, dass der verminderte Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel auf eine verringerte Differenzierung der respiratorischen Epithelzellen und eine damit verbundene größere Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften zurückzuführen ist, werden Lungenlysate von *Trp53*-Wildtyp- und -Knock-out-Mäusen per quantitativer reverser Echtzeit-PCR auf die Expression der Stammzellgene *Krt5* und *Nanog* hin untersucht. *Sox2* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Basalzellen, sodass die Expression von *Sox2* als Hinweis auf eine größere Basalzellpopulation im Bronchialepithel von *Trp53*-Knock-out-Mäusen überprüft werden kann. *Notch1* ist an der Regulation der Expression von *Krt5* und damit teilweise an der Regulation von Stammzeleigenschaften

von Zellen der distalen Atemwege sowie deren Differenzierung zu Keulenzellen beteiligt, sodass auch die Expression von *Notch1* untersucht werden muss.

Obwohl sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Genotypen bei den typischen Stammzellmarkern *Krt5* und *Nanog* findet, lässt sich die Tendenz einer höheren Expression der Stammzellmarker bei den Nullmutanten feststellen (Abbildung 26 A und B). Bei der mRNA-Expression von *Notch1* zeigt sich kein *Trp53*-abhängiger Expressionsunterschied (vergleiche dazu Abbildung 26 C). Die gealterten Tiere zeigen aber eine signifikante und deutlich höhere Expression von *Notch1*, was den insgesamt geringeren Anteil an Flimmerzellen am Bronchialepithel gealterter Mäuse erklären kann. Die Expression von *Sox2*-mRNA fällt bei den jungen *Trp53*-Knock-out-Tieren signifikant geringer aus als bei den Wildtypen, auch wenn die Wildtypen nur eine 28,6 % höhere *Sox2*-mRNA-Expression zeigen. Dennoch erscheint das Ergebnis vor der oben gestellten Hypothese paradox. Allerdings kann die geringere *Sox2*-mRNA-Expression bei *Trp53*-Knock-out-Lungen in der gealterten Kohorte nicht gezeigt werden, hier ist kein signifikanter Expressionsunterschied vorhanden. Auch die *Sox2*-mRNA-Expression ist altersabhängig: Die gealterte Kohorte exprimiert die 3,6-fache Menge *Sox2*-mRNA wie die jungen Wildtypen. Auch dieses Ergebnis kann den altersbedingten Zilierungsdefekt des respiratorischen Epithels mit erklären. Insgesamt zeigt die mRNA-Expressionsanalyse von Stammzellmarkern und Differenzierungsgenen, dass die phänotypischen Veränderungen von *Trp53*-Knock-out-Atemwegsepithelien nicht sicher auf eine vergrößerte Stammzellpopulation oder Veränderungen in bekannten Differenzierungspfaden (zu sekretorischen Zellen oder zu Basalzellen) zurückzuführen ist.

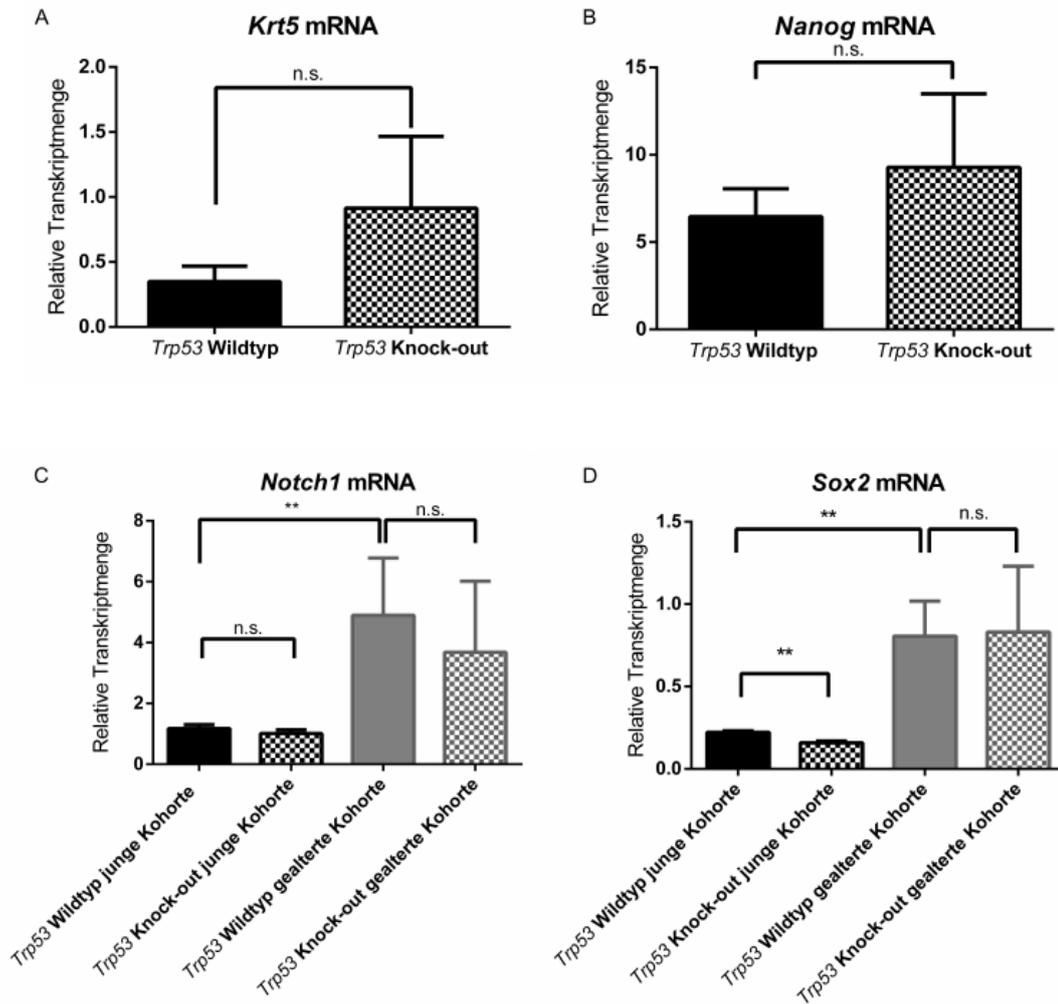


Abbildung 26: Quantitative reverse Echtzeit-PCR von *Krt5* (A), *Nanog* (B) sowie *Notch1* (C) und *Sox2* (D). Die mRNA-Expression des Transkripts ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen $n = 5$ in der jungen Kohorte und $n = 3$ in der gealterten Kohorte. In A und B wurde nur die junge Kohorte untersucht.

3.4 Einflüsse von *Trp53* auf die Regeneration des Bronchialepithels

In Abschnitt 3.3 wurden die Einflüsse von *Trp53* auf das Bronchialepithel in einem homöostatischen Zustand bei adulten Mäusen durch die vergleichende Untersuchung von Wildtyp- und Knock-out-Mäusen untersucht. Der reduzierte Anteil von Flimmerzellen mit seinen funktionellen Auswirkungen kann dabei nicht durch eine vergrößerte Stammzell- oder Basalzellpopulation und auch nicht durch einen höheren Anteil an Keulenzellen erklärt werden. Der von McConnell und Kolleg*innen beschriebene Differenzierungsdefekt von Keulenzellen mit Progenitoreigenschaften lässt sich jedoch indirekt auch bei einem konstitutiven Fehlen von *Trp53* zeigen. Da allerdings die Genregulationsmechanismen, die eine Differenzierung zu Flimmerzellen vermitteln

(*TAp73*, *Foxj1*), bei adulten *Trp53*-Knock-out-Mäusen in einem homöostatischen Zustand nicht dereguliert sind, stellt sich die Frage, ob der geringere Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel auf einen Regenerationsdefekt eben dieses Zelltyps zurückzuführen ist. Das regenerative Potential der Flimmerzellen in dem Epithel der distalen Atemwege des Menschen und dem Bronchialepithel der Maus entspringt aus varianten Keulenzellen, einer Zytochrom-armen Subpopulation der Keulenzellen. Zur Untersuchung der Flimmerzell-Regeneration aus varianten Keulenzellen kann das Bronchialepithel chemisch depletiert werden und die vollständige Regeneration ausgehend von varianten Keulenzellen zu definierten Zeitpunkten untersucht werden. Dazu wird den Versuchstieren intraperitoneal eine einmalige Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht einer 3 %-igen Naphthalinlösung injiziert. Das resorbierte Naphthalin wird über die pulmonale Perfusion auch an die zytochromreichen Keulenzellen transportiert und dort von dem Zytochrom P450 2 F 2 (CYP2F2) zu toxischen Epoxiden metabolisiert. Innerhalb von einem Tag kommt es zur Abflachung und zu einem Verlust der Kinozilien an den ebenfalls den Epoxidprodukten ausgesetzten Flimmerzellen sowie zur Exfoliation der meisten Keulenzellen. Im weiteren Verlauf der Regeneration proliferieren die varianten Keulenzellen, die veränderten Flimmerzellen werden abgeschilfert und innerhalb von 14 Tagen entsteht ein weitgehend regeneriertes Epithel. Die Wildtyp- und *Trp53*-Knock-out-Mäuse werden einen, drei, sieben und vierzehn Tage nach der Injektion euthanasiert und die Regeneration untersucht.

Die histologische Untersuchung der jeweiligen Kohorten zeigt die erwartete Epithelabschilferung und eine suffiziente Regeneration bei *Trp53*-Wildtyp- und -Knock-out-Mäusen. Dabei lassen sich histologisch keine Genotyp-abhängigen Unterschiede erkennen. Die lichtmikroskopischen Bilder von Tag eins nach der Injektion dienen als Positivkontrolle und sind daher hier nicht dargestellt. Bemerkenswert bleiben aber die in der hohen Vergrößerung sichtbaren mehrkernigen Zellen, die sich bei Wildtypen und Nullmutanten vierzehn Tage nach der Naphthalin-Injektion finden. Solche mehrkernigen Zellen können Ausdruck einer epithelialen Dysplasie sein, die sich im Rahmen des entzündlichen und proliferativen Stresses entwickelt hat.

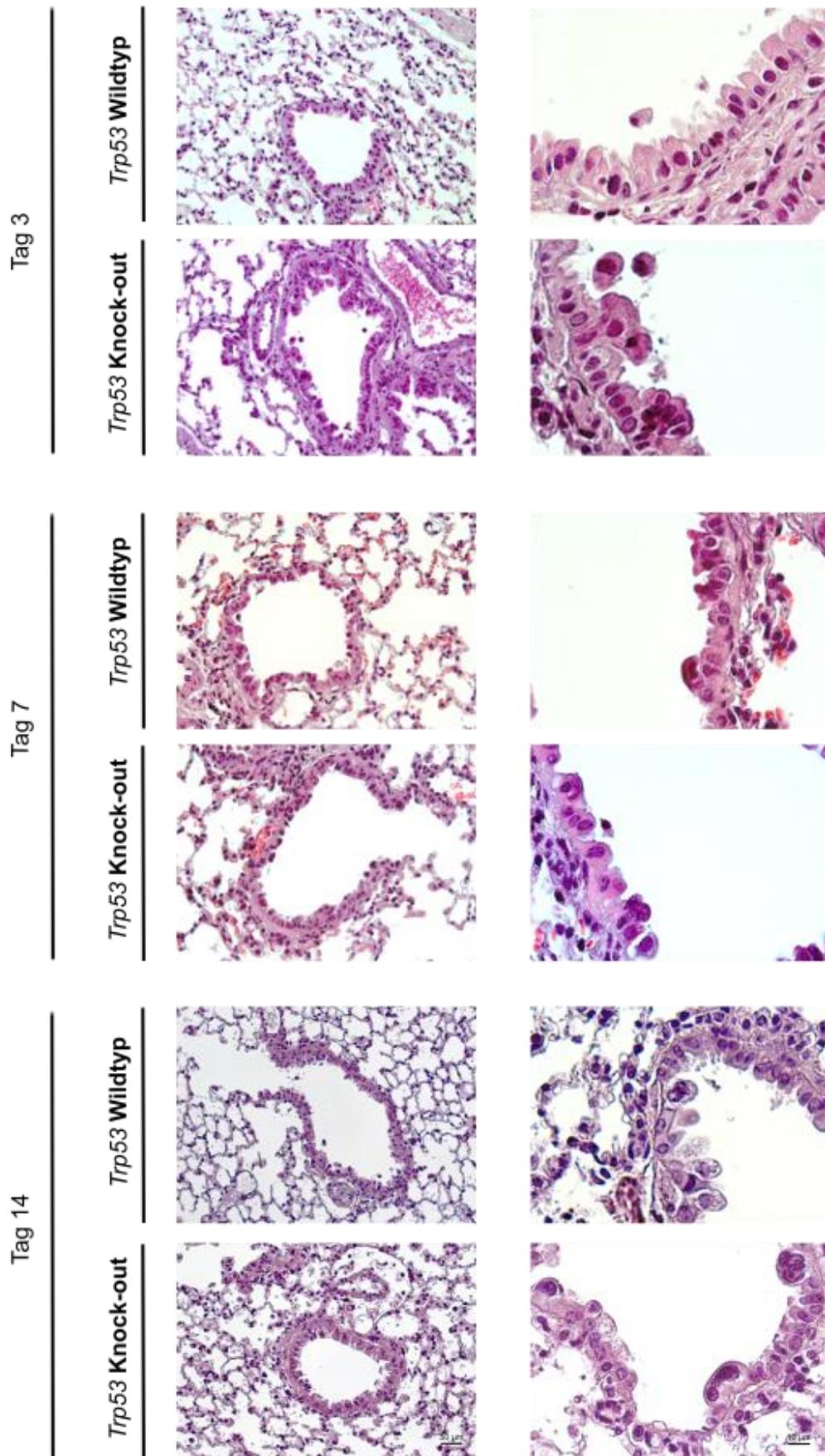


Abbildung 27: Histologische Schnitte in HE-Färbung von Naphthalin-behandelten *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out-Atemwegen. Dargestellt ist die 200-fache Vergrößerung (linke Spalte) und 1000-fache Vergrößerung (rechte Spalte).

Um die Regeneration der Flimmerzellen nachverfolgen zu können, werden Immunfluoreszenzfärbungen von Lungenschnitten beider Genotypen von allen vier experimentellen Zeitpunkten angefertigt und wie oben beschrieben quantifiziert. Auch hier werden Marker für Kinozilien und Keulenzellen spezifisch angefärbt und das Fluoreszenzsignal auf den Umfang des jeweiligen Epithels normiert. Die Immunfärbung zeigt deutlich die Ablösung von Keulenzellen vom Epithel an Tag eins sowie die zunehmende Anfärbbarkeit von Kinozilien mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Naphthalin-Injektion (Abbildung 28). Auch bei *Trp53*-Knock-out-Lungen zeigt sich die Regeneration des Epithels. Der statistische Vergleich des Kinozilienmarkers zwischen *Trp53*-Wildtyp und *Trp53*-Knock-out zeigt dabei nur an Tag drei nach der Injektion einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, wobei hier die *Trp53*-Knock-out-Tiere mehr Fluoreszenzsignal zeigen als die Wildtypen. Die Verteilung der Flimmerzellen innerhalb des Epithels zeigt aber Unterschiede zwischen den Genotypen: bei den Wildtypen finden sich regelmäßig zwischen den Keulenzellen Flimmerzellen, während bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren die Keulenzellen und die Flimmerzellen gruppiert stehen (Abbildung 28 C). Die Quantifizierung des SCGB1A1-Fluoreszenzsignals hingegen zeigt signifikant weniger Keulenzellmarker an Tag eins in den *Trp53*-Knock-out-Tieren und signifikant mehr Keulenzellmarker in den Knock-out-Tieren an Tag drei. An den beiden späteren Zeitpunkten findet sich auch bei SCGB1A1 kein Unterschied mehr zwischen den Genotypen.

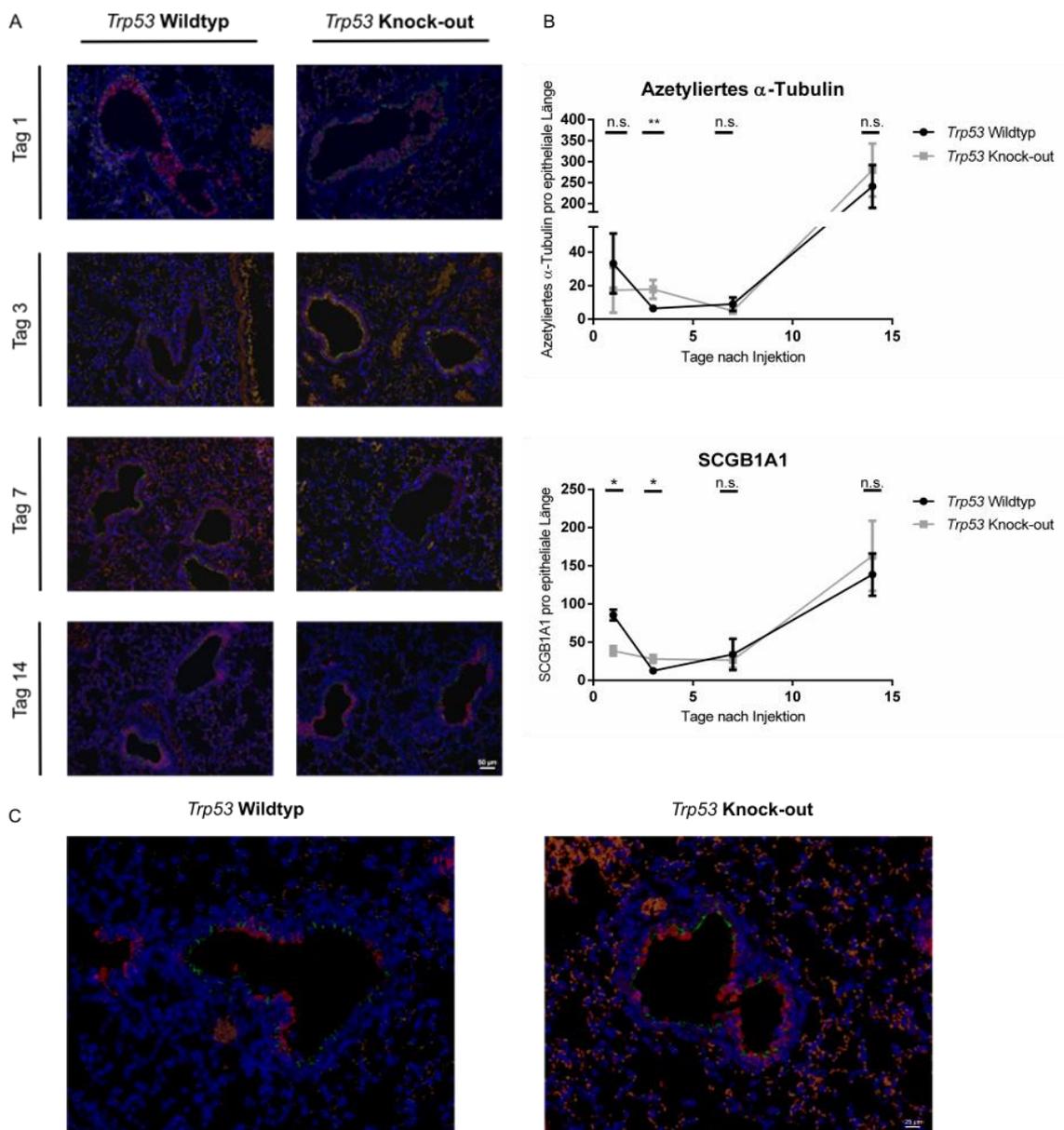


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung (**A**) und Quantifizierung (**B**) von azetyliertem- α -Tubulin und SCGB1A1 bei Naphtalin-behandelten Tieren. N = 3 für alle Kohorten. **C** zeigt Immunfluoreszenzfärbungen von Tag 14 in höherer Vergrößerung. Rot angefärbt ist SCGB1A1, grün angefärbt ist azetyliertes- α -Tubulin. Die Zellkerne sind in blau mit DAPI dargestellt. Schichtdicke 3 μ m.

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung und -quantifizierung bezüglich des Anteils der Keulenzellen zu überprüfen und gleichzeitig eine Genotyp-abhängig veränderte Metabolisierung des Naphthalins auszuschließen, wurde für alle vier experimentellen Zeitpunkte die mRNA-Expression von Zytochrom P450 2F2 (*Cyp2f2*) untersucht (Abbildung 29). Hier zeigt sich kein Genotyp-abhängiger Unterschied in der *Cyp2f2* Expression. Dieses Ergebnis stellt den Immunfluoreszenzbefund für SCGB1A1 an den Tagen 1 und 3 insofern infrage, als dass *Scgb1a1* und *Cyp2f2* beides Marker für Keulenzellen

sind. Allerdings exprimieren die verschiedenen Subpopulationen der Keulenzellen nicht in gleichem Maße alle Keulenzellmarker. So zeigen die varianten Keulenzellen nur eine geringe Zytochromexpression, weshalb sich beide Keulenzellmarker auch im begrenzten Rahmen unabhängig voneinander verhalten können. Weiterhin ist zu bemerken, dass die SCBG1A1-Expression per Immunfluoreszenz, also auf Proteinebene, gemessen wird, während die *Cyp2f2*-Expression auf mRNA-Ebene untersucht wird. Da zunächst mRNA synthetisiert wird, bevor diese transkribiert werden kann, müssen die Immunfluoreszenzdaten als zeitlich retrahiert im Vergleich zu den molekularbiologischen Messungen betrachtet werden.

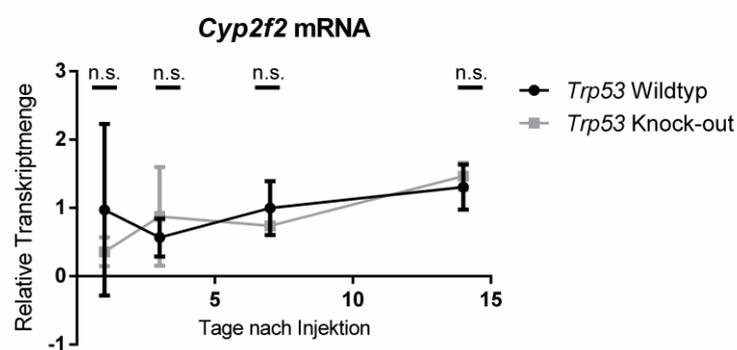


Abbildung 29: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für *Cyp2f2*. Die mRNA-Expression des Transkripts *Cyp2f2* ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen $n = 3$.

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass der verminderte Anteil an Flimmerzellen am Bronchialepithel bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen auf eine verminderte Regeneration der Flimmerzellen zurück zu führen ist, wird der Replikationsmarker *Mcm3* per quantitativer reverser Echtzeit-PCR bestimmt und dessen Expression an allen vier Zeitpunkten nach der Naphthalin-Injektion gegenübergestellt (Abbildung 30).

Auch die Expression von *Mcm3* zeigt kein genotypabhängiges Muster, auch wenn die Streuung der Einzelwerte groß ausfällt. Die massive Erhöhung der *Mcm3*-Expression an Tag eins zeigt aber, dass die Proliferation der Progenitorzellen bereits am ersten Tag nach der Naphthalin-Injektion beginnt. Insgesamt erlaubt die *Mcm3*-Expression also keinen Rückschluss auf eine P53-abhängig veränderte Proliferation des Bronchialepithels.

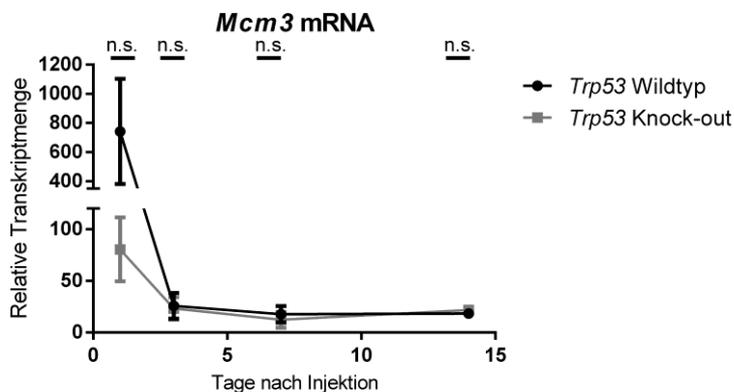


Abbildung 30: Quantitative reverse Echtzeit-PCR für *Mcm3*. Die mRNA-Expression des Transkripts *Mcm3* ist normiert auf die Expression des Referenzgens *Rplp0*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen $n = 3$.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht final aufgeklärt werden, auf welcher molekularen Grundlage die Reduktion der Flimmerzellen und folglich der Transportfähigkeit des Epithels in *Trp53*-Knock-out Mäuse beruht.

3.5 Einflüsse von *Trp53*-Effektorgenen auf die Zusammensetzung des Bronchialepithels

Die veränderte Zusammensetzung des Bronchialepithels von *Trp53*-Knock-out-Mäusen wird in der Literatur bei Mausmodellen, bei denen P53 zelllinienspezifisch in Keulenzellen ausgeschaltet ist, mit einer verstärkten Proliferation der Keulenzellen durch eine geringere Expression von *Cdkn1a* erklärt. Dieser Erklärung folgend, müsste auch das konstitutive Ausschalten von *Cdkn1a* zu einem geringeren Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel führen. Zur Überprüfung dieses Erklärungsansatzes wurden

Lungenschnitte von *Cdkn1a*-Knock-out-Mäusen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht und wie bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren das spezifische Fluoreszenzsignal auf die Länge des untersuchten Epithels normiert (Abbildung 31). Das konstitutive Fehlen von *Cdkn1a* führt zu keinem signifikant verringerten Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel bei der Maus. Da die Untersuchung jedoch mit vergleichsweise kleinen experimentellen Kohorten durchgeführt wurde und die Streuung der Messwerte bei den Wildtypen hoch ist, könnte dies die fehlende statistische Signifikanz erklären. Eine deutliche Tendenz ist dennoch auszumachen, die *Cdkn1a* defizienten Tiere zeigen eine 41,9 prozentige Reduktion des Fluoreszenzsignals für Kinozilien verglichen mit den Wildtypen. Die in der Literatur beschriebenen Befunde eines Flimmerzelldefektes bei *Cdkn1a*-Defizienz können im konstitutiven *Cdkn1a*-Knock-out-Modell also weder bestätigt noch verworfen werden.

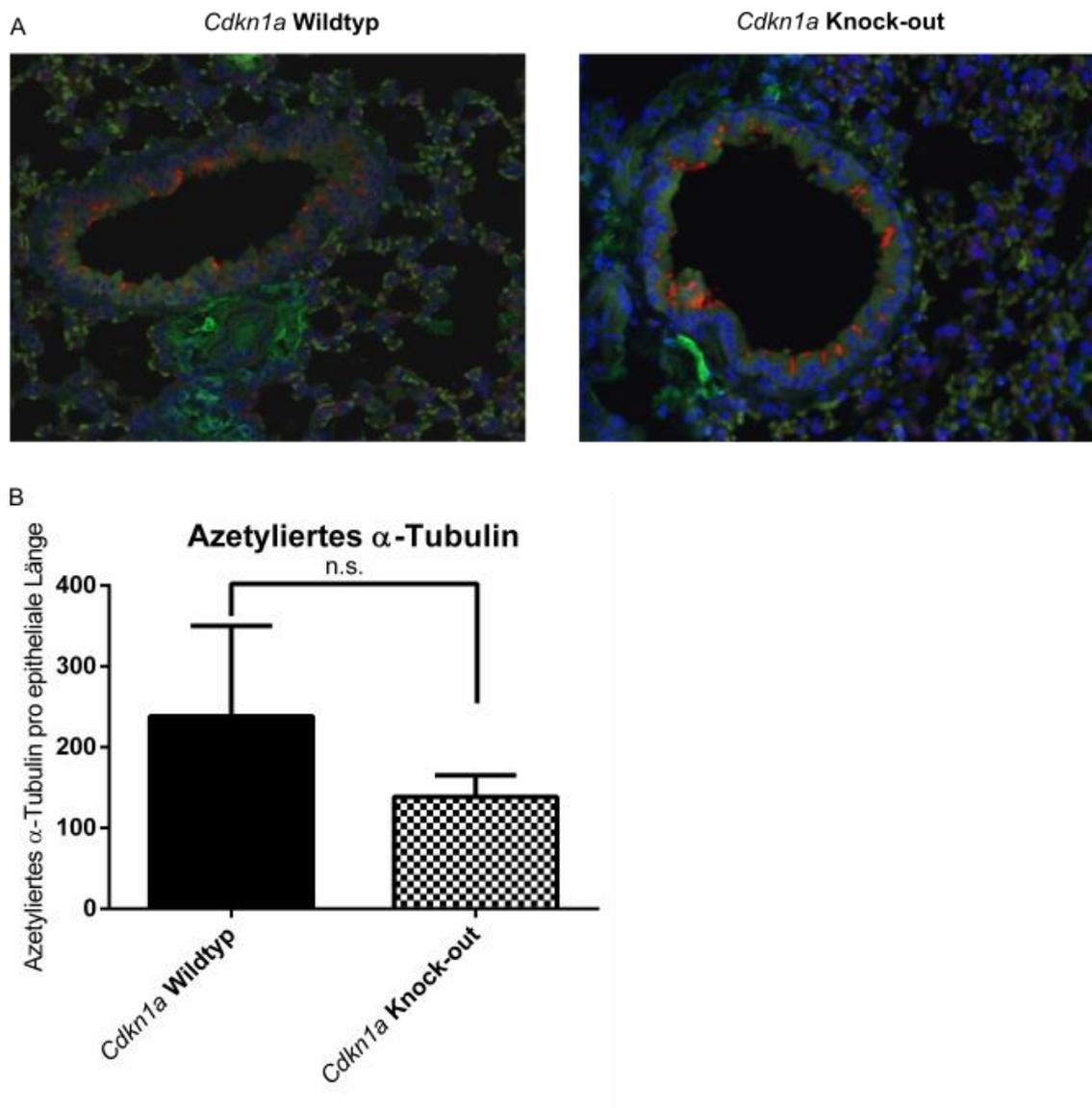


Abbildung 31: Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung von azetyliertem α -Tubulin bei Wildtypen und *Cdkn1a*-Knock-out-Tieren. Immunfluoreszenzfärbung (**A**) von *Cdkn1a*-Wildtyp- und *Cdkn1a*-Knock-out-Lungenschnitten. Schichtdicke 3 μ m. In rot ist azetyliertes α -Tubulin, in grün SCGB1A1 und in blau ist DAPI (für Zellkerne) dargestellt. **B** zeigt die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung, gemessen wurden das Fluoreszenzsignal für azetyliertes α -Tubulin und der Wert auf den jeweiligen Bronchusumfang normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt $n = 4$, $p = 0,182$.

Mikro-RNA 34-a (*miR-34a*) ist eine wesentliche Effektor-Mikro-RNA, die durch die posttranskriptionelle Suppression von anti-apoptischen und proliferativen Genen die Funktion von P53 als Tumorsuppressor vermittelt. Die Einflüsse von *miR-34a* auf die Zusammensetzung und Funktion des Bronchialepithels sind nicht nur wichtig, um einen möglichen Mechanismus des P53-bedingten Zilierungsdefekts des Bronchialepithels zu untersuchen, sondern auch, weil die Genexpressionskontrolle durch Mikro-RNAs nicht sicher durch die Quantifizierung von mRNA Transkripten untersucht werden kann. Die

sequenzspezifische Bindung von Mikro-RNAs an die 3' untranslatierte Region von mRNA kann entweder zu einem Abbau im RISC-Komplex führen oder auch zu einer einfachen zytosolischen Lagerung der mRNA, da sie nicht an den Ribosomen translatiert werden kann. In diesem Fall würde die mRNA bei der quantitativen reversen PCR mit detektiert, sodass eine P53-abhängige, miR-34a vermittelte Suppression von Zielgenen der Ziliogenese oder anderer entscheidender Differenzierungsvorgänge nicht messbar wäre.

Um einen möglichen Einfluss von *miR-34a* auf die Struktur und Funktion des Bronchialepithels zu untersuchen, wird zunächst die Expression von *miR-34a* durch eine modifizierte reverse quantitative PCR in *Trp53*-Wildtyp- und Knock-out-Lungenlysaten verglichen (Abbildung 32). In *Trp53*-Knock-out-Lungen wird *miR-34a* hochsignifikant ($p < 0,001$) geringer exprimiert als in Wildtyp-Lungen. Der Expressionsunterschied zwischen beiden Genotypen mit der vierfachen Transkriptmenge bei den Wildtypen im Vergleich zu den Knock-out-Tieren verdeutlicht die enge Responsivität der *miR-34a*-Expression von P53.

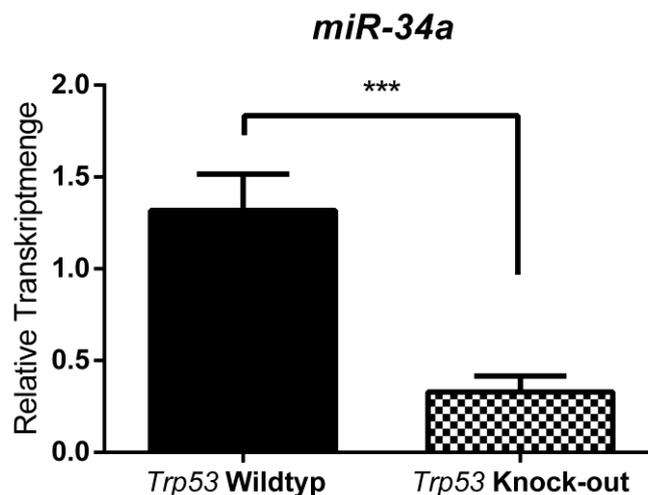


Abbildung 32: Quantitative reverse Echtzeit-PCR in Taqman-Technik für *miR-34a*. Die *Mikro-RNA-34a* Expression ist normiert auf die Expression des Referenzgens *RNU6-1*. Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an, die Gruppengröße beträgt für beide Genotypen $n = 5$.

Die histologische Untersuchung von *miR-34a*-Knock-out-Mäusen zeigt eine regelrechte Struktur des Parenchyms mit normal weiten Alveolen, zartem peribronchialen Bindegewebe und einem histologisch regelrecht erscheinenden respiratorischen Epithel (Abbildung 33).

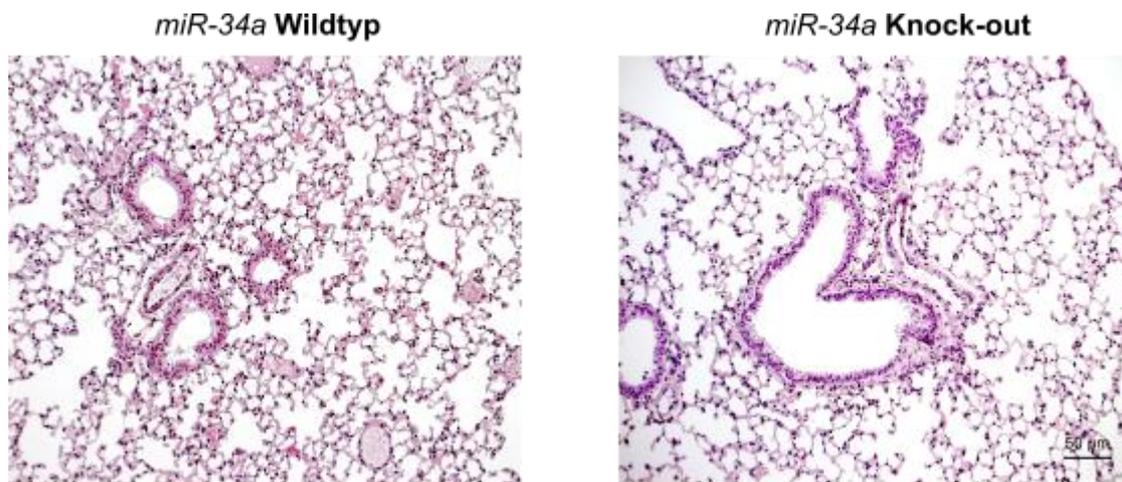


Abbildung 33: HE-Färbung von *miR-34a* Wildtyp und Knock-out Lungen. Schichtdicke 3 µm.

Zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von *miR-34a* auf die Verteilung der Zelltypen im respiratorischen Epithel der Maus wurde auch in dieser experimentellen Kohorte eine Immunfluoreszenzfärbung auf die Antigene azetyliertes α -Tubulin als Marker für die Kinozilien von Flimmerzellen und SCGB1A1 als Marker für die Keulenzellen durchgeführt (Abbildung 34). Die mikroskopischen Bilder sowie die statistische Auswertung der Fluoreszenzmessung zeigen, dass ein Fehlen von *miR-34a* zu keinem statistisch fassbaren Unterschied sowohl bezüglich der Anzahl an Flimmerzellen als auch der Anzahl an Keulenzellen im Vergleich zu den Wildtypen führt. Zur Überprüfung der Ergebnisse der histologischen Untersuchung wurden auch Lungenlysate von *miR-34a*-Wildtyp- und *miR-34a*-Knock-out-Mäusen in einem Western Blot aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern die Proteinexpression von Kinozilienbestandteilen (DNAI1, DNALI1) und Keulenzellmarkern verglichen (Abbildung 34). Auf Proteinebene lassen sich die Ergebnisse des histologischen Vergleichs zwischen den beiden Genotypen replizieren. Beide Kinozilienmarker (DNAI1 und DNALI1) zeigen eine Genotyp-unabhängige Expression. Trotz der eingeschränkten Qualität des spezifischen Signals für CYP4B1 zeigt auch dieser Keulenzell-Marker keine wesentlichen Expressionsdifferenzen zwischen den beiden Genotypen, sodass auch ein vergleichbarer Anteil an Keulenzellen am respiratorischen Epithel bei *miR-34a*-Wildtyp- und Knock-out-Tieren angenommen werden kann. CD206 wird als Marker für aktivierte M2-Makrophagen verwendet und zeigt eine stark individuell schwankende Expression, nicht jedoch ein Genotyp-abhängiges Expressionsmuster. Eine verstärkte Entzündungsreaktion kann also bei *miR-34a*-Knock-out-Lungen nicht nachgewiesen werden. Insgesamt phänotypiert der Knock-out von *miR-34a* also nicht das Fehlen von *Trp53* bezogen auf den Aufbau des Bronchialepithels und die Entzündungsreaktion in der Lunge.

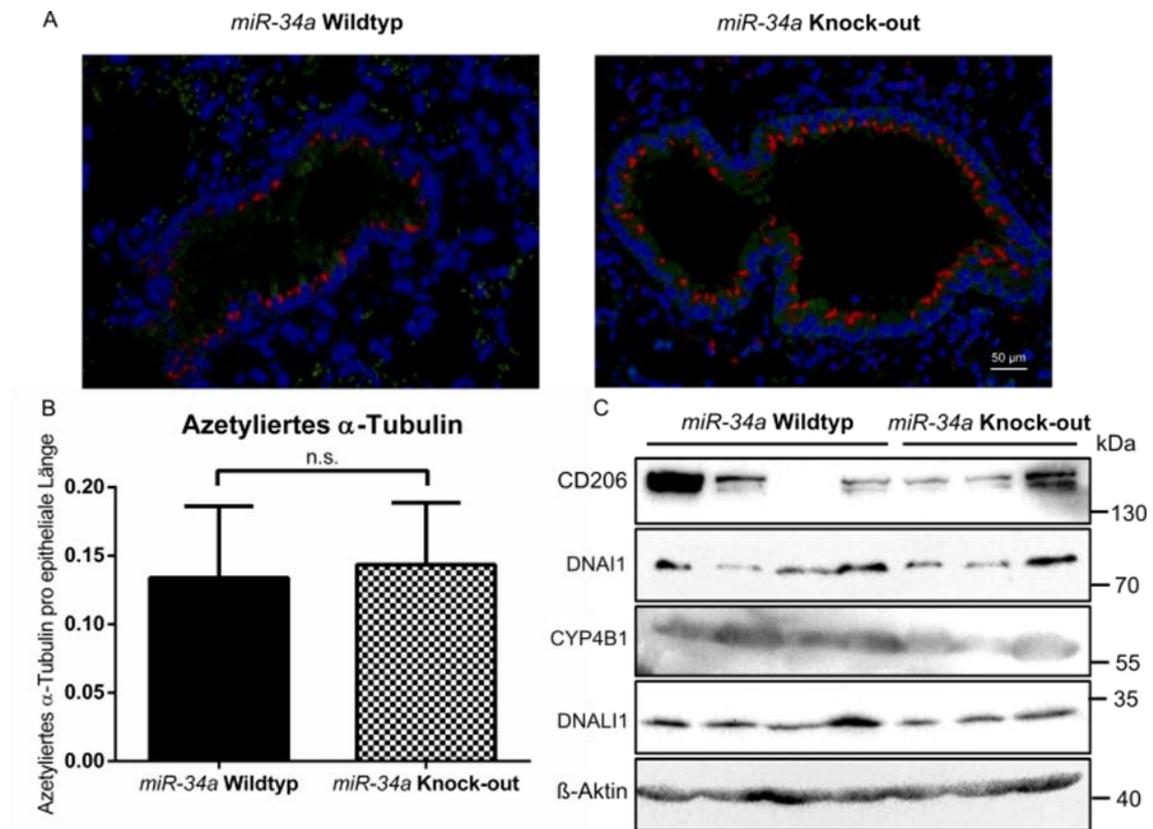


Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbung (A) von *miR-34a*-Wildtyp und *miR-34a*-Knock-out-Lungenschnitten mit Quantifizierung (B) und Western-Blot-Analyse (C). Immunfluoreszenzfärbung (A) von *miR-34a*-Wildtyp- und Knock-out-Lungenschnitten. Schichtdicke 3 μ m. In rot ist azetyliertes α -Tubulin, in grün SCGB1A1 und in blau ist DAPI (für Zellkerne) dargestellt. B zeigt die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung, gemessen wurden das Fluoreszenzsignal für azetyliertes α -Tubulin und der Wert geteilt durch den Umfang des jeweiligen Bronchus. Die Gruppengröße beträgt $n = 3$, die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler an. C zeigt beispielhafte Western Blots von Lungenlysaten von *miR-34a*-Wildtyp- und -Knock-out-Mäusen. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

4 Diskussion

In der Einleitung ist das Spannungsfeld dargestellt, in dem sich epidemiologische und experimentelle Studien zur Funktion von P53 im Kontext der COPD bewegen. Während eine verstärkte Expression von P53 in Gewebeproben von COPD-Patient*innen und eine verstärkte Apoptose von Alveolar- und Bronchialepithelzellen gezeigt werden kann, zeigen tierexperimentelle Studien mit Maus-Nullmutanten für *Trp53* Phänotypen, die der COPD ähneln (Armit et al. 2002; Hodge 2005; Morissette et al. 2008; McConnell et al. 2016). Die getrennte Betrachtung der einzelnen funktionellen und biologischen Kompartimente der Lunge ermöglichen hier eine differenzierte Untersuchung: Im Bronchialepithel stehen Belege für eine verstärkte Apoptose durch die P53-Akkumulation bei der COPD beim Menschen den Befunden der Hyperplasie von sekretorischen Zellen (Keulenzellen) und dem Verlust von Flimmerzellen bei *Trp53*-Nullmutanten in den Keulenzellen der Maus gegenüber (Gogebakan et al. 2014; McConnell et al. 2016). Beides sind typische histologische Veränderungen, die im Bronchialepithel von COPD-Patient*innen festgestellt werden können (Hogg 2004). Die entzündliche Komponente der COPD weist sowohl bezüglich der zellulären Immunität (Makrophagen) als auch der Entzündungsinitiation seitens des Bronchialepithels Abhängigkeiten vom P53-Status auf (Chrusciel et al. 2016; Sagiv et al. 2018). Die verstärkte Entzündungsreaktion von Makrophagen beim konstitutiven *Trp53*-Knock-out im Mausmodell sowohl bei (pseudo-)bakteriellen Stimuli als auch im Emphysemmodell demonstrieren die protektive Funktion von *Trp53* vor überschießender Inflammation (Madenspacher et al. 2013; Chrusciel et al. 2016).

Zur Untersuchung der Frage nach dem Einfluss von P53 auf die Lungengesundheit werden hier Wildtyp-Mäuse mit Nullmutanten für *Trp53* verglichen. Die Betrachtung des Mausmodells ist besonders deshalb von Bedeutung, weil Studien an zelllinienspezifischem Knock-out von *Trp53* teils konträre Ergebnisse zu Untersuchungen an humanem Material ergeben haben. Die Vielzahl der Zelltypen, die an der Pathogenese der COPD beteiligt sind, macht aber eine Betrachtung der globalen Auswirkungen von P53 notwendig, sodass hier konstitutive Nullmutanten mit Wildtypen verglichen werden. Der Vergleich von Nullmutanten mit Wildtypen ist deshalb zielführend, weil die Funktion von normal reguliertem P53 in wildtypischer Genkopieanzahl untersucht werden kann und den Auswirkungen von fehlendem P53 gegenübergestellt wird. Sollte die Funktion von P53 im Bronchialepithel und der Entzündungsreaktion der Atemwege durch Vergleich von Wildtypen mit Mutanten, die zusätzliche Genkopien von *Trp53* aufweisen, stattfinden,

würden vermutlich die proapoptotischen Effekte von P53 überwiegen. Dann wäre eine Beurteilung differenzierungsfördernder und protektiver Funktionen von P53 deutlich erschwert.

Die eigenen experimentellen Ergebnisse sollen im Folgenden getrennt nach den beiden betrachteten Aspekten der COPD diskutiert werden: Zunächst wird der Einfluss von P53 auf die spontane und induzierte Entzündungsreaktion in den Atemwegen reflektiert. Im zweiten Abschnitt werden die Veränderungen in Struktur und Funktion des Bronchialepithels abhängig von P53 diskutiert.

4.1 Spontane und induzierte Entzündungsreaktion

Die Untersuchung der Auswirkungen des globalen Fehlens von *Trp53* auf die Struktur und Funktion des Lungengewebes ist von Bedeutung, weil Mizuno und Kolleg*innen (2017) zeigen, dass Polymorphismen im *TP53*-Gen und im *MDM2*-Gen beim Menschen mit der Schwere des Lungenemphysems korrelieren. Die Autor*innen zeigen hier aber, dass Polymorphismen, die zu einer erhöhten apoptotischen Potenz von P53 führen (bzw. zu einem geringeren Abbau von P53 durch *MDM2*-Polymorphismen), mit der Schwere der COPD zusammenhängen. Dem gegenüber zeigen die Daten in dieser Arbeit, dass homozygote nullmutante Mäuse für *Trp53* kein spontanes Lungenemphysem entwickeln. Einschränkend muss den dargestellten Ergebnissen der histologischen Untersuchung von Wildtypen und *Trp53*-Knock-out Tieren hinzugefügt werden, dass die Tiere zum Untersuchungszeitpunkt relativ jung waren. Auch der Vergleich von gealterten Tieren zeigt allerdings keinen histologisch fassbaren Unterschied. Ebenso zeigt die Quantifizierung des mittleren Alveolardurchmessers keine signifikante Erweiterung des Alveolarraumes bei *Trp53*-Nullmutanten. Die gemessenen mittleren Durchmesser der Alveolen fallen allerdings deutlich geringer aus als in der Literatur beschrieben, sodass von einer präparationsbedingten Kompression des Gewebes bei beiden Kohorten ausgegangen werden muss (Parameswaran et al. 2009). Insofern ist die Beurteilung einer möglichen Emphysementwicklung bei *Trp53*-Nullmutanten qualitativ wie quantitativ methodisch bedingt eingeschränkt. Zusätzlich gibt es wenig Literaturbelege, dass Mäuse unter den gegebenen spezifisch pathogenfreien Haltungsbedingungen ohne den Einfluss exogener Noxen (wie rekurrierenden Infektionen oder chemischen Noxen wie Dieselpartikeln) in diesem relativ jungen Alter (unter 30 Wochen) überhaupt emphysematöse Lungenveränderungen zeigen.

Einzig der Vergleich zwischen jungen und gealterten *Trp53*-Nullmutanten zeigt einen signifikant größeren mittleren Alveolardurchmesser bei den gealterten Tieren. Die Differenz ist allerdings gering, sodass hier nicht von einer funktionellen Relevanz für den Gasaustausch ausgegangen werden kann. Dennoch zeigen *Trp53*-Knock-out-Tiere eine altersabhängige Erweiterung des Alveolarraumes, die mit den gezeigten Expressionsunterschieden der Proteasen und Antiproteasen bei *Trp53*-Nullmutanten zusammenhängen kann. Der Vergleich zwischen dem Mausmodell und den COPD-Patient*innen unterscheidet sich zusätzlich durch die Einwirkung exogener Noxen. Die Studienteilnehmer*innen bei Mizuno und Kolleg*innen (2017) waren allesamt Raucher*innen, sodass hier eine zusätzliche, auslösende Noxe die genetische Prädisposition aggraviert haben kann. Diese tierexperimentellen Ergebnisse lassen sich also gut mit der o.g. klinischen Studie vereinen, da Gen-Polymorphismen mit erhöhter P53-Aktivität mit schwererem Krankheitsverlauf assoziiert sind und das gänzliche Fehlen des murinen homologen Gens zu keinem vergleichbaren Phänotyp geführt hat.

4.1.1 Zelluläre Entzündungsreaktion

Die verstärkte Präsenz von aktivierten peripheren M2-Makrophagen in den Atemwegen von *Trp53*-Knock-out-Mäusen (Abschnitt 3.2) ist besonders deshalb relevant, weil die Versuchstiere unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Die signifikant höhere Infiltration der Bronchien mit Makrophagen ist also auf den P53-Status zurückzuführen. Dieser Befund lässt sich gut mit der Untersuchung von Madenspacher und Kolleg*innen (2013) zusammenbringen, die eine deutlich verstärkte Entzündungsreaktion bei *Trp53*-defizienten Mäusen nach bakterieller (*Klebsiella pneumoniae*) und immunologischer (Lipopolysaccharide) Provokation zeigen konnten. Dabei zeigen *Trp53*-defiziente Mäuse eine effektivere Elimination von Bakterien, leiden jedoch auch unter deutlich stärkeren entzündungsbedingten Gewebeveränderungen. Auch hier ist die verstärkte Entzündungsreaktion von Makrophagen getragen. Die Autor*innen erklären den Befund durch den Antagonismus von P53 mit dem entzündungs- und proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor NF κ B (Liu et al. 2009; Ak und Levine 2010; Madenspacher et al. 2013). Während die Untersuchung von Madenspacher und Kolleg*innen auch bei naiven *Trp53*-defizienten Mäusen mehr Alveolarmakrophagen als bei Wildtypen zeigt, kann diese Arbeit eine erhöhte Anzahl bronchialer Makrophagen bei unbehandelten, jungen Mäusen nachweisen. Das verstärkte peribronchiale Vorkommen der Makrophagen erklärt auch die fehlende Emphyseentwicklung, da die spontane zelluläre Entzündung bei den *Trp53*-Nullmutanten besonders im Bereich der Atemwege auftritt.

Somit findet sich hier das histologische Bild einer milden chronischen Bronchitis bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen. Mechanistisch kann auch hier eine verstärkte Expression von NF κ B-Effektorgenen durch den reduzierten P53-Antagonismus vermutet werden.

Die Repression der NF κ B-abhängigen Transkription durch P53 ist vielfach belegt (Komarova et al. 2005; Ak und Levine 2010). Komarova und Kolleg*innen (2005) zeigen dabei, dass bei einer experimentellen Peritonitis bei *Trp53*-Nullmutanten besonders die Anzahl der Makrophagen im Exsudat massiv erhöht ist im Vergleich zu Wildtypen und diese eine deutlich verstärkte oxidative Abwehrreaktion (z.B. reaktive Sauerstoffspezies) zeigen. Die verstärkte Entzündungsreaktion bei fehlendem P53 ist also nicht auf die Lunge beschränkt und besonders von Makrophagen getragen. In diesem Zusammenhang ist der Einfluss von industriellen Nanopartikeln auf die Lungengesundheit relevant, welche ebenfalls eine Makrophagen-getragene pulmonale Entzündungsreaktion hervorrufen können. Auch hier vermittelt P53 einen antientzündlichen Effekt und hemmt den entzündungsbedingten oxidativen Stress (Belade et al. 2015). Vor dem Hintergrund des umfassenden technischen Einsatzes von industriell gefertigten Nanopartikeln mag dieser Effekt in Zukunft epidemiologische Relevanz erhalten.

Neben den direkten Effekten von P53 auf die Genexpression in den Makrophagen und eine dadurch bedingte, begrenzte Entzündungsreaktion bei den Wildtypen kann die verstärkte peribronchiale Makrophageninfiltration auch ein sekundäres Phänomen der schlechteren mukoziliären Reinigung bei den *Trp53*-Nullmutanten sein. Die Expression von *Timp1* im Bronchialepithel und die signifikant geringere Expression bei den *Trp53*-Nullmutanten spricht jedoch für einen zusätzlichen entzündungshemmenden Effekt von *Trp53* im Bronchialepithel, welcher die Entzündungsreaktion durch die schlechtere Bronchialreinigung noch verstärkt. Außerdem zeigen die *Trp53*-Nullmutanten eine signifikant geringere *Timp1*-Expression in der Lunge, obwohl sie einen vergleichbaren Anteil an TIMP1-synthetisierenden Keulenzellen am Bronchialepithel aufweisen wie die Wildtypen (vergleiche Abschnitt 3.2.2.3). Die geringere *Timp1*-Expression bei den *Trp53* Nullmutanten ist daher eher ein direkter P53-Effekt in den Keulenzellen als eine Folge der schlechteren Bronchialreinigung. Gleichzeitig ist nicht ausgeschlossen, dass auch die reduzierte Expression der Antiprotease TIMP1 ein sekundäres Phänomen einer epithelialen Reizung durch den verschlechterten Partikeltransport ist. Zuletzt kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der *Trp53*-Knock-out zu einer primär verstärkten peribronchialen Makrophageninfiltration führt und die *Timp1*-Expression des Bronchialepithels nur sekundär durch das Entzündungsgeschehen herunterreguliert wird.

Die verstärkte (peri-)bronchiale Makrophageninfiltration bei *Trp53*-defizienten Mäusen weist dennoch auf die Funktion von P53 in Makrophagen bei entzündlichen Vorgängen der Lunge hin. Allerdings besteht der in der Einleitung beschriebene Widerspruch zwischen dem entzündungshemmenden Effekt von P53 in Zellen des Immunsystems und der indirekten entzündungsfördernden Funktion von P53, indem eine P53-bedingte Seneszenz von Bronchialepithelzellen zu peribronchialen Entzündungsvorgängen führt. Chrusciel und Kolleg*innen (2016) konnten zeigen, dass in einem Modell des Lungenemphysems der globale *Trp53*-Knock-out zu einer so verstärkten Entzündungsreaktion der Lunge führt. Diese verstärkte Entzündungsreaktion führt zu einem signifikant schwereren Emphysem bei *Trp53*-defizienten Mäusen. Ob diese makrophagengetragene Entzündungsreaktion allerdings auch peribronchial stattfindet, wurde nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit erlaubt aber eine Aussage darüber, ob die von Sagiv und Kolleg*innen postulierte P53-bedingte Seneszenz von Bronchialepithelzellen (insbesondere in Keulenzellen) mit konsekutiver lokaler Entzündungsreaktion im Falle eines Lungenemphysems tatsächlich *in vivo* den entzündungshemmenden Effekt von P53 in den Makrophagen aufwiegt (Sagiv et al. 2018). Die konkrete Frage lautet also: Wie verändert P53 die peribronchiale monozytäre Entzündung in einem Modell des Lungenemphysems?

Die Installation von Pankreas-Elastase ist ein etabliertes Modell für das Lungenemphysem bei Mäusen (Lüthje et al. 2009). Die in Abschnitt 3.2.1 gezeigten Ergebnisse der Quantifizierung von aktivierten peribronchialen Makrophagen zeigen, dass Bedingungen eines experimentellen Lungenemphysems die Beobachtungen bei unbehandelten Tieren noch intensivieren. Die Installation pankreatischer Elastase hydrolysiert die elastischen Fasern der extrazellulären Matrix und verursacht so ein Lungenemphysem. Dieses experimentelle Lungenemphysem stellt aber nicht nur mechanisch die Bedingungen bei einem pulmonalen Emphysem nach, sondern aktiviert auch ähnliche biologische Kaskaden (so die verstärkte Freisetzung von Zytokinen (Le Quément et al. 2008)). Die verstärkte, auch peribronchial stattfindende Entzündungsreaktion bei *Trp53*-Nullmutanten zeigt die *in vivo* überwiegende Funktion von P53 in der Kontrolle der Entzündungsreaktion in Makrophagen. Chrusciel und Kolleg*innen (2016) zeigen, dass bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen im gleichen Lungenemphysemmodell mehr Makrophagen in der Bronchoalveolären Lavage vorkommen als bei Wildtypen und bei gleicher Elastase-Dosis ein schwereres Lungenemphysem ausbilden. Diesen Unterschied führen die Autor*innen auf die höhere Expression von *Mmp12* bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren zurück. In dieser Arbeit kann nun

zusätzlich belegt werden, dass auch die peribronchiale Makrophageninfiltration bei einem experimentellen Lungenemphysem signifikant stärker ausfällt und *Trp53*-Nullmutanten besonders bei einem Lungenemphysem unter einer stärkeren monozytären Entzündungsreaktion leiden. Einschränkend muss bei beiden Experimenten angeführt werden, dass die *Trp53*-Nullmutanten nur eine 1,3-fach (unbehandelte Tiere) bzw. eine 1,58-fach (Elastase-behandelt) erhöhte Anzahl Makrophagen pro Epithellänge aufweisen, sodass von keiner massiven Entzündungsreaktion gesprochen werden kann. Gerade die chronische und latente Entzündung der Atemwege ist jedoch typisch für die COPD.

4.1.2 Expression von Proteasen und Antiproteasen

4.1.2.1 Vorkommen und Funktion von MMP12 im murinen Lungengewebe

Das Lungenemphysem beim Menschen wird wesentlich durch die Ausschüttung von MMP12 durch Makrophagen bedingt (Hunninghake et al. 2009). Auch bei der COPD kann eine deutlich erhöhte Sekretion von MMP12 gezeigt werden (Molet et al. 2005; Demedts et al. 2006). MMP12 und MMP9 werden von aktivierten Makrophagen sezerniert und können ein weites und überlappendes Spektrum von (Struktur-)Proteinen hydrolysieren. Der Literatur entsprechend müsste also wegen der verstärkten Makrophageninfiltration um die Bronchien auch in den Lungenlysaten von *Trp53*-Nullmutanten eine höhere Expression von *Mmp12* und *Mmp9* nachzuweisen sein. Der Vergleich der mRNA-Expression von *Mmp12* und *Mmp9* zwischen Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten zeigt aber, dass keine signifikante Differenz in der mRNA-Expression besteht. Auch die Expression der Kollagenase *Mmp13* differiert nicht zwischen den Genotypen. Einschränkend muss besonders bei der *Mmp9*-mRNA-Quantifizierung die hohe Streuung der Einzelwerte bei einer grundsätzlich kleinen experimentellen Kohorte angeführt werden, sodass hier möglicherweise eine höhere *Mmp9*-Expression bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren experimentell bedingt statistisch nicht nachweisbar ist. Die Proteinexpression von MMP9 ist wegen fehlender spezifischer Antikörper nicht möglich gewesen, stellt aber eine gute Möglichkeit für weitergehende experimentelle Untersuchungen dar.

Die Quantifizierung von MMP12 auf Proteinebene zeigt jedoch, ebenso wie die Quantifizierung der Transkripte, keine Genotyp-abhängige Differenz. Auch bei diesem Experiment muss die große interindividuelle Streubreite der MMP12-Expression erwähnt werden. Allerdings zeigen sowohl die gealterte Mauskohorte als auch die mit porziner pankreatischer Elastase behandelten Tiere (nicht dargestellt aufgrund der Elastase-bedingten Proteindegradation) genau wie die Kohorte junger Tiere keine klare Genotyp-

abhängige *Mmp12*-Expression. Da die Differenz der Makrophagenanzahl zwischen den Wildtypen und den *Trp53*-Nullmutanten gering ist, überraschen die nicht-signifikanten Expressionsdifferenzen der Metalloproteinasen nicht. Insgesamt kann also geschlussfolgert werden, dass trotz einer statistisch signifikant höheren Makrophageninfiltration um die Bronchien *Trp53*-defizienter Mäuse keine höhere Expression von *Mmp12* bei diesen Tieren vorliegt.

Eine Untersuchung der neutrophilen Granulozyten, die besonders intraluminal bei der COPD vorkommen, könnte in weiteren Forschungsarbeiten die hier präsentierten Ergebnisse erweitern. Expositionsversuche gegenüber bakteriellen oder immunologischen Stimuli mit Wildtypen und Nullmutanten könnten hier die Funktion von P53 in der akuten Entzündungsphase genauer charakterisieren. Hier wären besonders Untersuchungen der bronchoalveolären Lavage vielversprechend, um präparationsbedingte Verluste intraluminalen Materials zu vermeiden.

Die Immunfluoreszenzfärbung von Lungengewebschnitten auf MMP12 zeigt das im Ergebnisteil dargestellte Vorkommen von MMP12 im Bronchialepithel. Gleichzeitig muss hier eine zusätzliche unspezifische Bindung der Erstantikörper an zytoplasmatische Strukturen des Bronchialepithels in Betracht gezogen werden. Die Doppelfärbung von MMP12 mit dem ziliären Strukturprotein azetyliertes α -Tubulin zeigt jedoch eine deutlich intensivere Färbung für MMP12 in den Zellen, die keine Kinozilien aufweisen. Hier wird auch der deutliche Intensitätsunterschied zwischen der spezifischen Färbung und der Hintergrundfärbung, die auch die umliegenden Fibroblasten betrifft, deutlich. Die Vermutung eines bedeutenden Proteinvorkommens von MMP12 in den Keulenzellen kann die Doppelfärbung von MMP12 und CYB4B1 bestätigen. Entsprechend ist auch das Färbeverhalten von MMP12 in Abbildung 10 mit einer spezifischen Färbung vereinbar, da auch hier im Bronchialepithel die typische Keulenform der Keulenzellen durch die Immunfluoreszenzfärbung nachvollzogen wird. Dennoch kann keines der drei gezeigten Experimente ausschließen, dass die eingesetzten Erstantikörper nicht auch andere Matrix-Metalloproteinasen binden, da die Strukturhomologie zwischen den Mitgliedern dieser Proteinfamilie hoch ist. Die örtliche Zuordnung der Expression hingegen ist durch die drei gezeigten Experimente gut validiert. Die Literaturrecherche hat keinen eindeutigen Hinweis auf eine Expression von MMP12 im humanen oder murinen Bronchialepithel ergeben. Bei epithelialen seneszenten Zellen (nachgewiesen in Nieren- und Leberproben) werden Matrix-Metalloproteinasen (insbesondere MMP12) allerdings als seneszenztypische Sekretionsproteine beschrieben und zur Identifikation solcher Zellen genutzt, sodass die oben dargestellten Daten ein Hinweis auf seneszente Zellen im Bronchialepithel darstellen

können (Hudgins et al. 2018; Basisty et al. 2020). Einschränkend muss auch bei diesen Studien jedoch erwähnt werden, dass die Expression der sekretorischen Marker nur per quantitativer Echtzeit-PCR untersucht wurde und so keine unmittelbare Aussage zur korrespondierenden Proteinexpression getroffen werden kann. Außerdem würde der Nachweis von MMP12 in den meisten Keulenzellen in den gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen bedeuten, dass die Keulenzellen Zeichen der Seneszenz zeigen, was die beschriebenen Regenerationspotentiale und Progenitoreigenschaften der Keulenzellen infrage stellen würde. Insofern ist im Bronchialepithel eine Seneszenz-Assoziation der MMP12-Expression als unwahrscheinlich zu betrachten.

Lediglich eine experimentelle Expression von *Mmp12* unter Kontrolle des *Scgb1a1*-Promotors zeigt die onkogene Potenz von *Mmp12* in der Entstehung eines bronchoalveolären Adenokarzinoms beim Lungenemphysem (Qu et al. 2009). Damit besteht ein weiterer Literaturhinweis, dass *Mmp12* in Keulenzellen exprimiert wird. Bedeutsam erscheint dieses Ergebnis vor dem Hintergrund der Arbeit von Marchant und Kolleg*innen (2014), die eine transkriptionelle Funktion von MMP12 im Zellkern beschreiben. Sie zeigen, dass durch die MMP12-abhängige Expression von I κ B α der Interferon- α -Export aus virusbefallenen Zellen ermöglicht wird. Die Funktionen von MMP12 reichen also weit über die Proteaseaktivität des Enzyms hinaus und umfassen auch transkriptionelle Aufgaben.

Das Proteinexpressionsniveau von MMP12 unterscheidet sich, wie oben gezeigt, nicht zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Das verstärkte Makrophagenvorkommen bei den *Trp53*-Nullmutanten spricht dabei für höhere MMP12-Level. Die durch den *Trp53*-Knock-out bedingte reduzierte Seneszenz von Bronchialepithelzellen könnte hingegen zu einem geringeren seneszenzassoziierten Sekretionsmuster führen, zu dem auch MMP12 gehört (Hudgins et al. 2018). Wenn sich beide Effekte quantitativ ausgleichen, erklärt dies das vergleichbare MMP12-Proteinvorkommen bei beiden Genotypen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre eine quantitative Auswertung einer Immunfluoreszenzfärbung von MMP12 im Bronchialepithel möglich.

Damit wird in dieser Arbeit gezeigt, dass neben den ortsständigen Immunzellen auch das respiratorische Epithel selbst an Immunfunktionen, aber auch am Umsatz der extrazellulären Matrix beteiligt ist.

4.1.2.2 *Trp53*-abhängige *Timp1*-Expression im Lungengewebe

Um eine Aussage über die funktionellen Auswirkungen der zwar vermehrten Makrophageninfiltration bei *Trp53*-Nullmutanten im Vergleich zu Wildtypen, nicht aber unbedingt verstärkten *Mmp12*-Expression treffen zu können, wird auch die Expression der Inhibitoren der Metalloproteinasen untersucht. Die vier Mitglieder der TIMP-Familie inhibieren ein weit überlappendes Spektrum von Matrix-Metalloproteinasen, sodass hier eine Expressionsanalyse aller in der Lunge exprimierten TIMP-Proteine notwendig ist (Arpino et al. 2015). TIMP4 wird allerdings weder in Maus- noch in humanen Lungen exprimiert, sodass dessen Expression nicht untersucht wurde (Uhlén et al. 2015). Die vergleichende mRNA-Quantifizierung der *Timp*-Familienmitglieder zeigt, dass nur die Expression von *Timp1* signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypen und den *Trp53*-Nullmutanten zeigt. Trotz der großen interindividuellen Unterschiede in der Proteinexpression von *Timp1* ist eine signifikante, Genotyp-abhängige verringerte Vorkommen von TIMP1 bei *Trp53*-Nullmutanten erkennbar. Die Proteinexpression bestätigt hier also die molekularbiologischen Ergebnisse. Die immunhistochemische Lokalisation von TIMP1 in Lungenschnitten zeigt, dass auch die Antiprotease TIMP1 im Bronchialepithel vorkommt. Auch hier kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der TIMP1-Erstantikörper nicht auch strukturverwandte Proteine mit detektiert. Die Negativkontrolle (nicht dargestellt) validiert aber die spezifische Bindung der Zweitantikörper mit konsekutiver Peroxidaseaktivität an die Erstantikörper. Die Morphologie der angefärbten Zellen zeigt, dass auch TIMP1 in Keulenzellen vorkommt. Das Vorkommen anderer entzündungshemmender Mediatoren (wie SCGB1A1) ist experimentell belegt und stellt die Bedeutung der Keulenzellen in der Entzündungsregulation des Bronchialepithels heraus (Wang et al. 2001; Reynolds et al. 2007). So können auch Yatera und Kolleg*innen (2001) zeigen, dass Keulenzell-depletierte Mäuse eine deutlich stärkere Inflammationsreaktion zeigen als unbehandelte Tiere und diese verstärkt MMP2 und MMP9 exprimieren, was die Autor*innen auf die Expression von Antiproteasen (Elafin und Sekretorischer-Leukozyten-Peptidase-Inhibitor) in den Keulenzellen zurückführen. Kim und Kollg*innen (2005) beschrieben, dass *Timp1*-defiziente Mäuse schwerere pulmonale Entzündungsreaktionen nach Bleomycin-Schädigung der Lunge zeigen, und dass diese verstärkte Entzündungsreaktion nicht durch die Transplantation von Wildtyp-Knochenmark aufgehoben werden kann. Die Knochenmarktransplantation dient in diesem experimentellen Aufbau der Überprüfung, ob die Entzündungskontrolle in der Lunge durch Immunzellen erfolgt. Die TIMP1-abhängig gedämpfte Entzündungsreaktion ist auch bei Kim und Kolleg*innen also durch TIMP1

bedingt, welches von ortsständigen Zellen synthetisiert wird. Das Vorkommen von TIMP1 im humanen Bronchialepithel wird auch im *Human Protein Atlas* verzeichnet, außerdem beschreibt Banerjee die Proteinexpression von TIMP1 und TIMP2 im Bronchialepithel (Banerjee et al. 2011; Uhlén et al. 2015). Basisty und Kolleg*innen (2020) zeigen außerdem, dass die Expression von *TIMP1* in seneszenten, humanen Nierenepithelzellen deutlich geringer ausfällt als in teilungsfähigen Zellen, während in seneszenten Fibroblasten die *TIMP1*-Expression erhöht ist. Die seneszenzassoziierte Expression von *TIMP1* hängt hier offensichtlich vom untersuchten Zelltyp ab.

In dieser Arbeit wird nun auch bei Mäusen die Proteinexpression von TIMP1 im Bronchialepithel beschrieben und zusätzlich eine Abhängigkeit der Expression vom P53-Status belegt. Eine unmittelbare Induktion von *Timp1* durch P53 als Transkriptionsfaktor wird in der Literatur hingegen nicht beschrieben. Eine potentielle Bindung von P53 in der 3'- und 5'-flankierenden Region von *Timp1* lässt sich bei der Maus an mehreren Stellen computergestützt vorhersagen (siehe Anhang). Diese Vorhersage bedarf allerdings einer experimentellen Überprüfung, beispielsweise durch eine Chromatin-Immunpräzipitation.

Die reduzierte Expression von *Timp1* bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen kann also funktionell zu einer stärkeren enzymatischen Aktivität der Metalloproteinasen führen, und somit besonders in Entzündungssituationen die Entwicklung eines Emphysems und einer chronischen Bronchitis weiter fördern. Weiterhin stellt die reduzierte *Timp1*-Expression im Bronchialepithel von *Trp53*-Nullmutanten einen indirekten Hinweis auf eine höhere Anzahl seneszenten Zellen dar, da auch in seneszenten humanen Nierenepithelien die *TIMP1*-Expression zurückgeht (Basisty et al. 2020). Das seneszenztypische Sekretionsmuster ist dabei generell nicht direkt von P53 vermittelt, wie die Bestrahlung von *TP53*-Nullmutanten Lungenfibroblasten zeigt (Wunderlich et al. 2017).

Eine Entsprechung findet diese Beobachtung in einer klinischen Studie von van Diemen und Kolleg*innen (2011), die eine Assoziation zwischen einem Polymorphismus in der MMP-bindenden Region von TIMP1 und einem verstärkten Abfall der FEV₁ in einer prospektiven Populationskohorte feststellen. Der gleiche Polymorphismus ist in einer anderen Studie mit Asthma bronchiale assoziiert, allerdings weist hier nur die weibliche Subpopulation statistisch signifikant häufiger diesen Polymorphismus auf (Lose et al. 2005). Auch beim Menschen scheinen obstruktive Atemwegserkrankungen also eng mit der Antiproteasefunktion von TIMP1 verknüpft zu sein, sodass die obigen Befunde auch auf klinische Relevanz hindeuten.

Zusätzlich zu der Proteaseinhibition durch TIMP1 werden vermehrt apoptosehemmende Eigenschaften von TIMP1 diskutiert. So kann durch die Bindung von TIMP1 an Integrine und andere Oberflächenproteine (z.B. CD 63) eine Inhibition der Apoptose in Mammakarzinomzellen bewirkt werden (Jung et al. 2006). Auch bei Adenokarzinomzellen der Lunge hemmt TIMP1 die Apoptose durch direkte Proteininteraktion mit dem antiapoptotischen Protein BCL-2 (Nalluri et al. 2015). Die antiapoptotische Funktion scheint dabei unabhängig von der MMP-Interaktion von TIMP1 zu sein, da auch Mutanten ohne MMP-Bindungsvermögen die gleiche antiapoptotische Potenz aufweisen (Nalluri et al. 2015). Vor dem Hintergrund der oben dargestellten verstärkten *TP53*-Expression bei COPD-Patient*innen (unter der Annahme wildtypischen P53) ist also eine entsprechend erhöhte TIMP1-Expression zu vermuten, die einen weiteren Erklärungsansatz der hohen Prävalenz der COPD bei Lungenkarzinompatienten auch nach Korrektur um den Raucherstatus darstellt (Young et al. 2009). Diese verstärkte TIMP1-Expression bei COPD-Patienten kann auch in klinischen Studien in Sputumuntersuchungen gezeigt werden, dabei ist auch eine Korrelation mit reduzierter Lungenfunktion nachweisbar (Ziora et al. 2008; Aaron et al. 2010; Titz et al. 2015).

Zusätzlich wird in dieser Arbeit noch die peribronchiale Deposition von Kollagen als Hinweis auf eine Fibrosierung der Atemwege untersucht. Diese typische pathomorphologische Veränderung trägt bei der COPD zu der Fixierung der bronchialen Obstruktion bei und ist damit eine wesentliche Determinante der Symptomatik. Ähnliche Veränderungen finden sich auch beim Asthma bronchiale, bei Bronchiektasen und bei der zystischen Fibrose. Das verstärkte spontane Auftreten von Makrophagen in den Bronchien der *Trp53*-Knock-out-Mäuse und die Imbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen kann also im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion zu einer reaktiven Fibrosierung um die Bronchien bei den Nullmutanten führen. Die repräsentativen mikroskopischen Bilder in Abschnitt 3.2.3 zeigen jedoch eine vergleichbare Anfärbung von Kollagen bei Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten. Einschränkend muss bei dieser Untersuchung erwähnt werden, dass die Beurteilung qualitativ nach dem mikroskopischen Eindruck der Kollagenfärbung erfolgt. Zwar werden je Genotyp fünf Individuen untersucht, die Beurteilung bleibt aber qualitativ. Außerdem sind die Tiere der untersuchten Kohorte 16 Wochen alt, sodass hier nur eine Fibrosierung in jungem Alter ausgeschlossen werden kann. Vor dem Hintergrund der nur mäßig stärkeren Makrophageninfiltration in die Atemwege der *Trp53*-Nullmutanten erscheint dieses Ergebnis jedoch plausibel. Zudem kann in den untersuchten Lungenabschnitten auch keine

interstitielle Ablagerung von Kollagen festgestellt werden, sodass eine massive und frühe interstitielle Fibrosierung bei *Trp53*-Nullmutanten ausgeschlossen werden kann.

Insofern stellen, bezogen auf die entzündlichen Veränderungen der Bronchien und der Proteasen- bzw. Antiproteasen-Expression, *Trp53*-Nullmutanten teilweise ein Modell der COPD dar. Einerseits zeigen sie eine verstärkte spontane Makrophageninfiltration um die Atemwege, die in dem experimentellen Modell des Lungenemphysems noch aggravieren. Außerdem exprimieren die *Trp53*-Nullmutanten weniger Antiproteasen (TIMP1). Andererseits fehlt die typische emphysematöse Ausweitung des Alveolarraumes und die COPD-typische, erhöhte TIMP1-Expression bei gleichzeitig erhöhter MMP12-Expression. Lediglich eine diskrete Erweiterung des Alveolarraumes bei gealterten *Trp53*-Nullmutanten lässt eine funktionelle Relevanz der Makrophageninfiltration und des Expressionsunterschieds von TIMP1 vermuten.

Um die Auswirkungen der veränderten *Timp1*-Expression auf die enzymatische Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen zwischen den beiden Genotypen zu vergleichen, wären weiterführende Untersuchungen wie eine Zymographie notwendig. Hier könnte die Degradation von Testsubstraten (wie Elastin oder Kollagene) durch Lungenlysate von Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten objektiviert werden. So ließe sich feststellen, in welchem Umfang die Gewebeproben beider Genotypen das Testsubstrat abbauen und wie die Expressionsunterschiede der MMP- und TIMP-Proteine in der Summe ihrer Interaktionen die enzymatische Aktivität der Lunge beeinflussen. Um die tatsächlich vom Bronchialepithel sekretierte Enzym- und Enzyminhibitormengen zwischen den Genotypen vergleichen zu können, müsste ein *in vitro* vitales Bronchialepithel (wie einer *Air Liquid Interface Culture*) untersucht werden. Hier könnten die jeweiligen sekretierten Proteine aus dem Kulturmedium mittels Enzymimmunoassay oder mittels *Western Blot* bestimmt werden.

4.2 Einfluss von P53 auf die Struktur und Funktion des Bronchialepithels

4.2.1 Struktur des Bronchialepithels abhängig vom *Trp53*-Status

Für die Funktion des Bronchialepithels ist das Verhältnis der Zelltypen am Bronchialepithel entscheidend. Die Keulenzellen als wichtigste sekretorische Zellen der distalen Atemwege beim Menschen und des gesamten Tracheobronchialsystems bei der Maus sind durch die Synthese von großen Mengen SCGB1A1 gekennzeichnete, welches hier als Markerprotein

genutzt wird. Die immunfluoreszenzmikroskopische Quantifizierung von SCGB1A1 im Bronchialepithel als spezifische Färbung der Keulenzellen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten. Diese Beobachtung stimmt mit der histologischen Untersuchung des Bronchialepithels bei *Trp53*-Knock-out-Lungen überein. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit von Wildtypen und Nullmutanten wurden die gemessenen Epithellängen verglichen und dabei keine signifikante Differenz festgestellt (siehe Anhang). Damit kann die Hypothese zurückgestellt werden, dass verschieden große Bronchien zwischen den Genotypen verglichen wurden und so durch den von proximal nach distal zunehmender Keulenzellanteil am Bronchialepithel ein möglicher bestehender Unterschied der Keulenzell-Dichte übersehen wurde. Gleichzeitig wird SCGB1A1 sekretiert, sodass dessen Quantifizierung nur bedingt ein Maß für den Anteil der Keulenzellen am Bronchialepithel ist. Um dem methodischen Problem der Sekretion von SCGB1A1 zu entgegnen, müssten Antikörper gegen den Keulenzell-spezifischen Zytochrom-Komplex CYP2F2 validiert werden, da Zytochrom-Komplexe stets intrazellulär vorkommen. Um eine P53-abhängige Differenz in der Anzahl der varianten Keulenzellen zu untersuchen und so das Regenerationspotential besser einschätzen zu können, könnte in weitergehenden Untersuchungen das spezifische Anfärben der varianten Keulenzellen mit Antikörpern gegen SCGB3A2 die bestehenden Ergebnisse weiter ausdifferenzieren.

Dieses Ergebnis steht den Befunden von McConnell und Kolleg*innen (2016) entgegen, die bei einem zelllinienspezifischen Knock-out von *Trp53* in den Keulenzellen (unter der Kontrolle des *Scgb1a1*-Promotors) eine deutlich verstärkte Proliferation der Keulenzellen beobachten. Umgekehrt zeigen dort Mäuse mit einer zusätzlichen *Trp53*-Genkopie weniger SCGB1A1-positive Zellen. Diese Diskrepanz kann durch das verschiedene methodische Vorgehen erklärt werden, da die Quantifizierung der Keulenzellen in dieser Arbeit durch die gefärbte Fläche, bei McConnell (2016) jedoch durch die Zählung von SCGB1A1-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl des jeweiligen Bronchus erfolgt. Gleichzeitig hat McConnell (2016) die *Trp53*-Nullmutation spezifisch in Keulenzellen erzeugt und gezeigt, dass diese Zellen stärker proliferieren und weniger CDK-Inhibitor *Cdkn1a* exprimieren als Wildtyp-Zellen. Den in dieser Arbeit genutzten konstitutiven *Trp53*-Nullmutanten fehlt jedoch die *Trp53*-Expression auch in allen anderen Zellen. Während die Zellerneuerung in den distalen Atemwegen von vielen Autor*innen auf das proliferative Potential der varianten Keulenzellen zurückgeführt wird (Giangreco et al. 2002; Reynolds et al. 2002; Rawlins et al. 2009; Guha et al. 2012; Tata et al. 2013), weisen andere Arbeiten auf spezialisierte periphere Stammzellen hin, welche der Ursprung der

Zellerneuerung in den distalen Atemwegen sind (Kajstura et al. 2011; Kumar et al. 2011; Vaughan et al. 2015; Zuo et al. 2015). Solche Stammzellen, die zuvor keine *Scgb1a1*-Expression gezeigt haben, würden in McConnells Modell nicht *Trp53*-depletiert. Bei McConnell teilen sich also die bereits differenzierten Keulenzellen durch den *Trp53*-Knock-out schneller. Die Differenzierung und Proliferation von Basalzellen in den oberen Atemwegen hängt auch von der direkten Zellumgebung durch die Zell-Zell-Interaktion und den NOTCH-Signalweg ab (Rock et al. 2011; Balasooriya et al. 2017). Bei analogem Verhalten von Stammzellen in den distalen Atemwegen in McConnells Modell würde eine gesteigerte Proliferation der Keulenzellen auch Proliferation und Differenzierung der Stammzellen beeinflussen. Dementsprechend kann der globale *Trp53*-Knock-out auch die Differenzierung von Stammzellen zu Keulenzellen beeinflussen, sodass die hier gezeigten Ergebnisse auch auf eine geringere Differenzierung von Vorläuferzellen zu Keulenzellen trotz einer möglichen verstärkten Proliferation ebendieser zurückzuführen sein kann.

Die verstärkte Proliferation der Keulenzellen ist in McConnells (2016) Modell mit einer verminderten Differenzierung von Keulenzellen zu Flimmerzellen vergesellschaftet. McConnell und Kolleg*innen (2016) quantifizieren die Flimmerzellen jedoch durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Foxj1*, welches in dieser Arbeit keine signifikante Expressionsdifferenz zeigt. Die funktionell gleiche Aussage kann allerdings auch in dieser Arbeit gezeigt werden, da die *Trp53*-Nullmutanten signifikant weniger Fluoreszenzsignal für Kinozilien bei den jungen und bei den gealterten Tieren zeigen. Die Reduktion des Fluoreszenzsignals für Kinozilien ist dabei auf weniger Flimmerzellen zurück zu führen, was besonders an den repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Bildern in Abbildung 18 deutlich wird. Die Quantifizierung ziliärer Motorproteine auf Protein- und auf mRNA-Ebene unterstreicht die Ergebnisse der Immunfluoreszenz. Trotz der methodischen Einschränkungen aller drei Verfahren (quantitative Immunfluoreszenz, Western Blot, quantitative Echtzeit-PCR) ist damit festzuhalten, dass *Trp53*-Nullmutanten signifikant weniger Flimmerzell-Marker exprimieren. Vor der oben dargestellten geringeren Expression von Flimmerzell-Strukturgenen erstaunt das Ergebnis der *Foxj1*-Expressionsuntersuchung (siehe Abschnitt 3.3.5.1). Sie kann wegen der geringen Gruppengröße falsch-unsignifikant sein, gleichzeitig kann auch das Fehlen von *Trp53* zu einer unvollständigen Differenzierung von Epithelzellen trotz einer gleichen *Foxj1* Expression führen. Außerdem ist *Foxj1* ein Transkriptionsfaktor der Flimmerzellvorläuferzellen, sodass seine Expression nicht direkt die Anzahl an Flimmerzellen repräsentiert.

Der Anteil der Becherzellen am respiratorischen Epithel ist bei *Trp53*-Nullmutanten weder in der histologischen Untersuchung mittels PAS-Färbung noch in der Quantifizierung der *Muc5b*-mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtypen verändert. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Chand und Kolleg*innen, die eine direkte Induktion der Becherzellendifferenzierung durch P53 zeigen konnten (Chand et al. 2014). Das stellt eine deutliche Differenz zu den histologischen Beobachtungen bei der COPD dar, die schon in frühen Krankheitsphasen eine Becherzellhyperplasie aufweist (Raju et al. 2013; De Rose et al. 2018). Damit phänokopiert der *Trp53*-Knock-out nur bedingt die histologischen Veränderungen, die sich typischerweise im Bronchialepithel der COPD zeigen.

4.2.1.1 *Trp53*-abhängige Zelldifferenzierung im respiratorischen Epithel

Die Expressionsuntersuchungen von *TAp73* und $\Delta Np73$ dienen vor allem als Negativkontrolle. Die gleiche Expression von *TAp73* bei Wildtypen und Nullmutanten schließt aus, dass der geringere Flimmerzell-Anteil bei *Trp53*-Knock-out-Mäusen nur auf eine kompensatorisch geringere *TAp73*-Expression zurückzuführen ist. Eine solche Abhängigkeit der *TAp73*-Expression von *Trp53* wäre denkbar, weil die Mitglieder der P53-Familie multiple Rückkopplungsmechanismen zeigen (Stiewe et al. 2002; Tophkhane et al. 2012). Gleichermäßen zeigt die unveränderte $\Delta Np73$ -Expression, dass nicht eine übermäßige $\Delta Np73$ -Expression dominant negative Effekte auf *TAp73*- und *Trp53*-Zielgene ausübt und dadurch die Flimmerzell-Differenzierung einschränkt (Kartasheva et al. 2002; Nemajerova et al. 2016). Dennoch kann aus der dargestellten mRNA-Expression keine Aussage zur transkriptionalen Aktivität dieser Faktoren getätigt werden, da weder die Expression von Effektorgenen gemessen wurde, noch können Heterodimerisierungen von P53-Familienmitgliedern ausgeschlossen werden.

Die Expressionsanalyse von *miR-449* wäre eine zusätzliche Negativkontrolle, um eine durch den *Trp53*-Knock-out bedingte reduzierte Expression dieser zentralen Mikro-RNA für die Multiziliogenese auszuschließen (Wildung et al. 2019).

McConnell (2016) erklärt die Veränderung der Zelltypen-Verteilung im Bronchialepithel der zelllinienspezifischen *Trp53*-Knock-out-Mäuse mit der Progenitor-Eigenschaft der Keulenzellen. Durch den *Trp53*-Knock-out sei die Expression von *Cdkn1a* reduziert und dadurch bestünde ein beschleunigter Zellzyklus mit verstärkter Proliferation und geringerer Differenzierung der Keulenzellen (so zu Flimmerzellen). Für diese Differenzierung ist eine Arretierung des Zellzyklus in der G₀-Phase notwendig, die nach McConnells (2016) Erklärung durch die *Trp53*-Nullmutation in den Keulenzellen deutlich reduziert abläuft.

Ausgehend von Vaughans Modell der zellulären Regeneration der kleinen Atemwege aus bronchoalveolären Stammzellen wäre bei stärkerer Proliferation und geringerer Differenzierung dieser Vorläuferzellen eine höhere Expression von Stammzellgenen in *Trp53*-Nullmutanten-Lungen zu erwarten. Die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen durch eine P53-bedingte Repression von *Nanog* unterstützt diese Hypothese (Lin et al. 2005). Zur Überprüfung wird die mRNA-Expression der typischen Stammzellmarker *Krt5* und *Nanog* untersucht (Abschnitt 3.3.5.2). Der statistische Vergleich zeigt zwar keine signifikanten Unterschiede (p-Wert für den Vergleich der *Krt5*-Expression ist 0,373; p-Wert für den Vergleich der *Nanog*-Expression ist 0,565) in der Expression, für beide Gene ist aber eine höhere Expression bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren erkennbar. Wegen der fehlenden statistischen Sicherheit kann hier keine zwangsläufige biologische Bedeutsamkeit angenommen werden, beide Untersuchungen geben aber einen Hinweis auf mehr Zellen mit Stammzeleigenschaften in *Trp53*-Nullmutanten-Lungen. Gleichmaßen ist die leichte, aber signifikant geringere Expression von *Sox2* in den Lungenlysaten junger *Trp53*-Nullmutanten bedeutsam, weil *Sox2* in den proximalen Atemwegen die Differenzierung von Flimmerzellen und Keulenzellen aus Basalzellen mit steuert (Akram et al. 2016). Die fehlende Reproduzierbarkeit der geringeren *Sox2*-Expression in der gealterten Kohorte stellt allerdings die hochsignifikanten Ergebnisse bei den jungen Tieren infrage. Gleichzeitig zeigt die gealterte Kohorte hier eine hohe Varianz innerhalb beider Genotypen, sodass bei der sehr geringen Stichprobengröße ($n = 3$) auch *vice versa* die Ergebnisse bei den gealterten Tieren angezweifelt werden können. Außerdem ist das Verhältnis der Expression von *Sox2* und *Sox9* für die Differenzierung des Bronchialepithels aus den Basalzellen wesentlich, da die *Sox2*-Expression bei der embryonalen Entwicklung der Lunge ein wichtiger Differenzierungsfaktor des proximalen Bronchialepithels darstellt, während *Sox9* ein wichtiger Faktor der distalen Bronchialepitheldifferenzierung ist (Akram et al. 2016). Die komplexe Regulation der Regeneration des respiratorischen Epithels zeigen auch Kim und Kolleg*innen (2016) auf, die die Bedeutung der zeitlichen Abfolge der Expression von *Sox2* und *Sox9* für die Differenzierung von Flimmerzellen und mukösen Zellen im Bronchialepithel betonen. *Sox2* kann also allein nicht als Marker für die Differenzierung der proximalen Bronchialepithelzellen genutzt werden. Dennoch entspricht die geringere Expression von *Sox2* bei den *Trp53*-Nullmutanten dem immunfluoreszenzhistologischen Befund einer geringeren Flimmerzellanzahl, die sich physiologischerweise auch in den distaleren Atemwegen findet.

Für die Interpretation aller genannten quantitativen reversen Echtzeit-PCR ist außerdem zu beachten, dass Lysate der gesamten Lunge untersucht wurden, sodass

Expressionsunterschiede nicht allein auf das respiratorische Epithel zurück geführt werden können. Damit sind falsch-unsignifikante Expressionsuntersuchungen denkbar.

Dennoch bleiben konträre Überlegungen in der Literatur: Jain und Kolleg*innen (2012) können bei humanen embryonalen Stammzellen zeigen, dass *TP53* durch die Induktion von *miR-34a* und *miR-145* die SOX2-Proteinexpression reduziert und so die Pluripotenz der Stammzellen beendet. Jain und Kolleg*innen arretieren in dieser Arbeit allerdings durch die *TP53*-abhängige *CDKN1A*-Induktion den Zellzyklus in der G₁-Phase und ermöglichen so eine Differenzierung der Zellen. Vor dem Hintergrund der deutlich reduzierten *miR-34a*-Expression im Lungengewebe von *Trp53*-Nullmutanten ist also eine deutlich verstärkte *Sox2*-Expression bei *Trp53*-Knock-out-Lungen zu erwarten, wenn die gleiche RNA-Interferenz auch bei Mäusen vorkommt. Die Expressionskontrolle von Zielgenen durch RNA-Interferenz kann allerdings zu einer intrazellulären Lagerung der Mikro-RNA-mRNA-Komplexe führen kann, sodass die teilweise widersprüchlichen *Sox2*-mRNA-Expression der einzelnen Mauskohorten nicht zwangsläufig die Expression des Proteins widerspiegelt. Letztlich ließe sich durch eine Proteinquantifizierung und durch die immunhistochemische Anfärbung von SOX2 im Bronchialepithel die Proteinexpression direkt zwischen den Genotypen vergleichen und im Gewebe lokalisieren.

Zuletzt ist noch die Expressionsuntersuchung von *Notch1* für die Verteilung der Zelltypen im respiratorischen Epithel entscheidend, da die NOTCH-Signalkaskade die Differenzierung von Basal- zu Keulenzellen bedingt und eine Inhibition dieser interzellulären Kommunikation durch Antikörper eine massive Transdifferenzierung zu Flimmerzellen im Bronchialepithel von Mäusen bewirkt (Rock et al. 2011; Lafkas et al. 2015). Die NOTCH-Signalkaskade scheint bei den *Trp53*-Nullmutanten jedoch zumindest auf Ebene des NOTCH1-Rezeptors nicht dereguliert zu sein. Auch bei der *Notch1*-Expression zeigt sich, wie bei *Sox2* eine deutliche und statistisch signifikant stärkere mRNA-Expression bei gealterten Tieren, ohne genotypspezifische Differenzen zu zeigen. Diese Differenz könnte auf einen systematischen Fehler in der Quantifizierung des Referenzgens *Rplp0* bei den gealterten Tieren zurückzuführen sein oder auf eine stärkere sekretorische Differenzierung (NOTCH1) und höheren Basalzellanteil (SOX2) im Alter hinweisen. Die stärkere sekretorische Differenzierung des Bronchialepithels ist dabei ein alterstypischer Prozess, der jedoch bei der COPD massiv verstärkt und deutlich früher einsetzt (Ghosh et al. 2018).

4.2.2 Funktion des veränderten respiratorischen Epithels bei *Trp53*-Nullmutanten

Die Messung des mukoziliären Transports in der *Trachea* von Wildtypen und *Trp53*-Nullmutanten zeigt, dass der oben beschriebene verringerte Flimmerzellanteil am Bronchialepithel bei den Nullmutanten zu signifikanten funktionellen Einschränkungen führt. Wie im Ergebnisteil dargestellt, lässt die Verteilung der einzelnen Geschwindigkeitsmessungen auch den Schluss zu, dass die durchschnittliche langsamere Transportgeschwindigkeit auf weniger Flimmerzellen schließen lässt und nicht auf eine langsamere Schlagfrequenz der Kinozilien. Damit reflektiert die funktionelle Untersuchung des respiratorischen Epithels die Ergebnisse der strukturellen Analyse des Flimmerepithels. Die Quantifizierung der *Muc5b*-Expression zeigt auch, dass der verlangsamte Partikeltransport bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren nicht auf eine erhöhte Viskosität des Bronchialsekrets zurückzuführen ist. Zudem trägt das experimentelle Design dazu bei, nur den Partikeltransport abhängig von der Anzahl der Flimmerzellen zu untersuchen, ohne dabei wesentlich von der Beschaffenheit und Menge des trachealen Sekrets beeinflusst zu werden, weil die *Tracheae* vor der Messung gespült wurden. Vergleichbare Untersuchungen sind in der Literatur nicht zu finden, die eingeschränkte mukoziliäre Reinigung bei *Trp53*-Nullmutanten ist also ein neuer und zusätzlicher Beleg für die Bedeutung von *Trp53* für die normale Funktion des respiratorischen Epithels. Damit bestätigt diese Arbeit die funktionellen Auswirkungen der von McConnell und Kolleg*innen (2016) postulierten veränderten Zusammensetzung des Flimmerepithels bei fehlendem *Trp53* in den Keulenzellen. Die experimentell bei den *Trp53*-Nullmutanten beobachtete reduzierte mukoziliäre Reinigung ist mit den funktionellen Auswirkungen bei der COPD vergleichbar, bei der sich ebenfalls eine reduzierte mukoziliäre Reinigungsfunktion zeigt (Yaghi et al. 2012).

4.2.3 Regeneration des Bronchialepithels unter dem Einfluss von *Trp53*

Trp53-Nullmutanten zeigen einen geringeren Anteil an Flimmerzellen im Bronchialepithel mit einer reduzierten epithelialen Reinigungsfunktion bei vergleichbarem Anteil an Keulenzellen am Epithel, verglichen mit Wildtypen. Dieser Flimmerzellmangel bei den *Trp53*-Knock-out Tieren könnte nun auf eine geringere Differenzierung von Progenitorzellen oder auf eine reduzierte kontinuierliche Regeneration der Epithelzellen zurück zu führen sein. Die Hypothese, die Differenzierung von Flimmerzellen sei in einem homöostatischen Zustand des Epithels durch eine kompensatorisch erhöhte $\Delta Np73$ -Expression oder eine reduziert *TAp73*-Expression vermindert, konnte oben widerlegt werden (vergleiche Abschnitt 4.2.1.1). Durch die Untersuchung von zwei verschiedenen

Altersgruppen (junge und gealterte Tiere) ist ersichtlich, dass mit zunehmendem Alter der Tiere der Anteil der Flimmerzellen am Bronchialepithel weiter abnimmt. Diese Beobachtung spricht für einen Regenerationsdefekt des *Trp53*-negativen Epithels. Allerdings führt eine fehlende Expression von *Trp53* bei McConnell (2016) zu einer stärkeren Proliferation der Keulenzellen, was vor dem Hintergrund der Funktion von P53 in der Induktion des Zellzyklusarrestes plausibel erscheint. Auch bei der COPD kann eine stärkere Proliferation der pulmonalen Epithelzellen (hier besonders Pneumozyten Typ II) gezeigt werden, allerdings verbunden mit einer ebenfalls häufigeren Apoptose (Siganaki et al. 2010). Hier entsteht also die Frage, ob die vollständige Regeneration des Bronchialepithels bei *Trp53*-Nullmutanten tatsächlich reduziert ist und damit der geringere Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel zu erklären ist.

Dazu wurde das in Abschnitt 3.4 dargestellte bronchiale Regenerationsmodell untersucht und der Anteil der Keulen- und Flimmerzellen am Bronchialepithel an verschiedenen Zeitpunkten der Regeneration verglichen. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt einen Tag nach der Naphthalin-Injektion zeigen die Wildtypen signifikant mehr Fluoreszenzsignal für SCGB1A1. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Signal fast ausschließlich im Lumen der Bronchien erkennbar ist, da die Keulenzellen zu diesem Zeitpunkt abgeschilfert sind. Das stärkere SCGB1A1-Signal kann hier also insbesondere bei der geringen Gruppengröße auf die abgeschilferten Zellen und nicht auf eine signifikant verschiedene Regeneration des Epithels zurück geführt werden. Der höhere Anteil an Kinozilienmarker an Tag drei bei den Nullmutanten ist hier ebenso nicht zwangsläufig auf einen höheren Anteil an Flimmerzellen im Bronchialepithel zurück zu führen, da sich die Flimmerzellen bei Naphthalin-Schädigung des Epithels abflachen, die Zilien abbauen und so das Keulenzell-depletierte Epithel bedecken (Park et al. 2006). Die Kinozilienmarker sind als flächiges Signal über der Basalmembran erkennbar, entsprechend einer deorganisierten Verteilung des azetylierten α -Tubulins innerhalb der Zellen. Das stärkere Fluoreszenzsignal kann also durch einen verstärkten Abbau der Zilien bei *Trp53*-Nullmutanten bedingt sein. Einen solchen Mechanismus beschreibt Wildung (2018), die einen verstärkten Abbau von Zilien bei *miR-449a*-Nullmutanten mit konsekutivem Mangel an beweglichen Zilien und PCD-ähnlichem Phänotyp beschreibt. Gleichzeitig beschreibt die höhere Anfärbbarkeit von azetyliertem α -Tubulin auch hier lediglich die abgeflachten Flimmerzellen und lässt keinen Rückschluss auf die bronchiale Regeneration zu. Die an Tag drei beobachtete signifikant stärkere Expression von *Scgb1a1* bei den *Trp53*-Nullmutanten erscheint plausibel, da zu diesem Zeitpunkt eine bedeutende Proliferation der varianten Keulenzellen stattfindet. Diese verstärkte Proliferation von Keulenzellen beim spezifischen *Trp53* Knock-out in den

Keulenzellen ist auch bei McConnell und Kolleg*innen (2016) sichtbar. Die an Tag drei nach der Naphthalin-Injektion zu beobachtende Mehrkernigkeit von Zellen, die sich insbesondere bei den Nullmutanten zeigt, passt zu den Beobachtungen von Armit und Kolleg*innen. Auch sie konnten eine signifikante Mehrkernigkeit von Keulenzellen und vermehrte Proliferaion unter Kulturbedingungen bei *Trp53*-Nullmutanten zeigen (Armit et al. 2002). Zu allen anderen Zeitpunkten fehlt ein signifikanter Unterschied in der Zellverteilung zwischen den Genotypen, was auf die geringe Gruppengröße und die insgesamt geringen Unterschiede im Anteil der Flimmer- und Keulenzellen am Bronchialepithel zurückgeführt werden kann. Gleichzeitig scheint der vergleichbare Anteil von Flimmer- und Keulenzellen am Bronchialepithel vierzehn Tage nach der Naphthalin-Injektion fragwürdig, weil hier die Regeneration abgeschlossen ist und ein Verteilungsverhältnis der Zelltypen wie bei den unbehandelten Tieren erwartet wird. Die genaue Betrachtung der Zellverteilung zeigt aber, dass die *Trp53*-Nullmutanten gruppierte Keulen- und Flimmerzellen aufweisen, wohingegen die Wildtypen eine homogene Verteilung beider Zelltypen zeigen. Hier lässt sich eine frühe Festlegung der Differenzierung der proliferierenden Progenitorzellen vermuten, die bei Wildtypen zu einem späteren Zeitpunkt vermutet werden kann und so die gleichmäßigere Verteilung von Flimmer- und Keulenzellen bedingt.

Die Ergebnisse der *Mcm3*-mRNA-Expressionsuntersuchung stellt die stärkere Proliferation der varianten Keulenzellen bei *Trp53*-Nullmutanten infrage, weil sich hier keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen. Die Untersuchung des gesamten Lungengewebes schränkt jedoch auch hier die Aussagekraft der mRNA-Quantifizierung ein.

Die Quantifizierung von *Cyp2f2*-mRNA zeigt keinen Genotyp-abhängigen Unterschied, sodass die höhere *Scgb1a1*-Expression in der Immunfluoreszenzquantifizierung an Tag drei nach der Naphthalin-Gabe nur ein fraglicher Hinweis auf eine stärkere Proliferation der *Trp53* negativen Keulenzellen ist. Auch hier muss die Expression von *Cyp2f2* außerhalb des Bronchialepithels und die Zytocrom-Induktion durch die Naphthalin-Behandlung mit berücksichtigt werden, da das gesamte Lungengewebe (samt des pulmonalen Blutes) analysiert wurde.

Das bronchiale Regenerationsmodell zeigt insgesamt keinen überzeugenden Unterschied in der Regeneration des Flimmerepithels. Der Unterschied im Anteil der Flimmerzellen am respiratorischen Epithel bei adulten *Trp53* Knock-out Mäusen ist also auf keinen unmittelbaren Differenzierungs- oder Proliferationsdefekt zurück zu führen.

Ghosh und Kolleg*innen (2018) zeigen, dass es bei der COPD zu einer Erschöpfung der Basalzellen kommt, die zu der reduzierten Regeneration des Bronchialepithels beiträgt. Zur Überprüfung, ob eine solche Stammzellerschöpfung auch bei den *Trp53*-Knock-out Tieren im Rahmen des dysregulierten Zellzyklus auftritt, wäre eine Darstellung und Quantifizierung der Basalzellen in den hier untersuchten Modellen (beispielsweise mittels Immunhistochemischer Darstellung von P63) sinnvoll.

Diese Basalzellerschöpfung ist mit einer ebenfalls verstärkten Proliferation von Pneumozyten Typ II bei der COPD vereinbar, die bei gleichzeitig verstärkter Apoptose zu einem netto-Verlust von Alveolarepithelzellen führt (Imai et al. 2005). Beide Studien sprechen für eine dysregulierte P53-Funktion mit verstärkter Aktivität der proapoptotischen P53-Effektoren. Dafür spricht auch der Nachweis von erhöhter *CDKN1A*- und *CDKN2A*-Expression (als Zielgene von TP53) bei COPD-Patient*innen (Chiappara et al. 2013; Barnes et al. 2019). Die gleichzeitig gezeigte verstärkte Proliferation kann kompensatorisch erhöht sein, kann aber auch mutierte *TP53*-Allele anzeigen. Auch ohne das Vorhandensein von somatischen *TP53*-Mutationen bei COPD-Patient*innen bestimmt die Form der posttranslationalen Modifikation des P53-Proteins sowie die vorliegenden Kofaktoren seine Funktion wesentlich mit. Die Ergebnisse von Studien an COPD-Patient*innen demonstrieren also die prädominante Apoptosefunktion von P53 bei der COPD. Passend dazu prädisponieren *TP53*-Allele, die eine höhere apoptotische Potenz aufweisen, besonders für die Entwicklung einer COPD und korrelieren mit einem schnelleren Abfall der Lungenfunktion (Hancox et al. 2009).

Die verstärkte Proliferation zeigt, unabhängig von ihrer Ursache, die deutlich reduzierte Quieszenz in allen pulmonalen Epithelien bei der COPD an. Eben diese P53-vermittelte Quieszenz ist jedoch für eine gleichmäßige Regeneration des Bronchialepithels entscheidend (McConnell et al. 2016). Mehrere, normal regulierte Genkopien von *Trp53* und *Cdkn2a* können im Gegensatz dazu den altersbedingten Verlust von Stammzellen reduzieren und so typische degenerative Veränderungen vorbeugen, während die andauernde Aktivierung der tumorsuppressiven Genregulationswege einen eben solchen Verlust regenerativen Potentials verursacht (Kippin et al. 2005; Matheu et al. 2007; Carrasco-Garcia et al. 2017).

Diese Arbeit zeigt in der Lunge demgegenüber, dass auch ein Fehlen von *Trp53* zu einer eingeschränkten Funktion des respiratorischen Epithels beiträgt. Wesentlich für die Effekte von P53 auf die epitheliale Homöostase sind also die induzierten Signalwege, die entweder zelluläre Seneszenz auslösen, die Apoptose einleiten oder Quieszenz bedingen. An allen

drei Prozessen ist dabei *Cdkn1a* beteiligt (Kippin et al. 2005; McConnell et al. 2016). Für ein genaueres Verständnis der dominierenden P53-Funktionen in Modellen der bronchialen Regeneration und des homöostatischen Zellumsatzes wäre eine Messung der P53-Effektoren CDKN1A, PCL1 und RB zielführend.

Vermehrte epitheliale seneszenzente Zellen können die Regeneration des Gewebes beeinträchtigen, während P53-bedingte Quieszenz die Differenzierung und damit die Funktion des Epithels entscheidend positiv beeinflusst. Zusätzlich sind an der eingeschränkten Funktion des Bronchialepithels bei *Trp53*-Nullmutanten verstärkte pulmonale Entzündungsreaktionen ebenso wie eine eingeschränkte mukoziliäre Reinigungsfunktion beteiligt. Möglicherweise trägt auch eine lokal unausgewogene Regeneration des Bronchialepithels dazu bei.

4.3 Funktion der P53-Effektorgene *Cdkn1a* und *miR-34a* auf die Struktur des Bronchialepithels

Der Mechanismus, durch welchen die *Trp53*-Nullmutanten einen geringeren Anteil an Flimmerzellen am Bronchialepithel aufweisen, ist unklar. Die P53-abhängige Quieszenz mit konsekutiver Differenzierung von Keulen- zu Flimmerzellen wird bei McConnell und Kolleg*innen (2016) jedoch durch die CDKN1A-bedingten Zellzyklus-Arrest erklärt. Dementsprechend müsste auch der konstitutive Knock-out von *Cdkn1a* zu einem reduzierten Flimmerzell-Anteil führen. Die Quantifizierung der Kinozilienmarker zeigt bei den *Cdkn1a*-Nullmutanten keine signifikante, aber eine deutliche Reduktion der Zilien ($p=0,182$). Die Größenordnung der Flimmerzellreduktion entspricht dabei derjenigen der *Trp53*-Knock-out-Tiere. Bei der großen Streuung der Wildtypen kann das Ergebnis methodisch bedingt sein, ein *Cdkn1a*-unabhängiger Mechanismus bleibt dennoch denkbar. Da nicht nur der Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus für die Differenzierung zur Flimmerzelle notwendig ist, sondern eine Reihe weiterer Genregulations-Kaskaden (so die Repression des NOTCH-Signalweges und die Induktion von *Foxj1*), deutet die nicht-signifikante Reduktion der Flimmerzellen bei *Cdkn1a*-Nullmutanten auf einen weniger deutlichen Differenzierungsdefekt als bei den *Trp53*-Knock-out-Tieren hin.

Die Expression von Mikro-RNAs ist für die Differenzierung von Flimmerzellen von besonderer Bedeutung. Während der Differenzierung von Flimmerzellen wird die Expression von *miR-449a* und von *miR-34bc* um das Hundertfache hochreguliert, wodurch die Zelle den Zellzyklus verlässt und die Amplifikation der Zentrosomen ermöglicht wird (Lizé et al. 2010; Marcet et al. 2011; Song et al. 2014). Dabei wird *miR-34bc* direkt von

TAp73 induziert (Nemajerova et al. 2016). Die Expression von *miR-34a* hingegen ist wesentlich von der Induktion durch P53 abhängig und vermittelt verschiedene tumorsuppressive Funktionen, so auch den Zellzyklusarrest (Chang et al. 2007). Wie bereits für die Flimmerzellen dargestellt, ist die Induktion des Zellzyklusarrestes entscheidend für die Differenzierung von bronchialen Epithelzellen. Dementsprechend ist, analog zur Funktion von *miR-449a* in der Differenzierung von Flimmerzellen, eine Differenzierungsfunktion von *miR-34a* in bronchialen Progenitorzellen denkbar.

Die Quantifizierung der *miR-34a*-Expression im Lungengewebe von *Trp53*-Nullmutanten und -Wildtypen zeigt die enge Abhängigkeit der *miR-34a*-Expression vom *Trp53*-Status. Konstitutive *miR-34a*-Nullmutanten haben eine morphologisch unauffällige Lungen, die eine gleichmäßige Verteilung von Keulen- und Flimmerzellen aufweisen. Auch lässt die Expression der Oberflächenmarker aktivierter peripherer Makrophagen (CD 206) keinen Hinweis auf eine verstärkte Entzündungsreaktion erkennen. Insofern phänotypieren *miR-34a*-Nullmutanten die pulmonalen Veränderungen bei *Trp53*-Nullmutanten nicht. Der kleinere Anteil von Flimmerzellen am Bronchialepithel ist bei *Trp53*-Knock-out-Tieren also nicht von einer *miR-34a* abhängigen Genexpressionsmodulation abhängig, ebenso wie der Phänotyp nicht allein auf die geringere *Cdkn1a*-Expression zurück geführt werden kann. Der Mechanismus, durch den *Trp53*-Nullmutanten weniger Flimmerzellen und eine reduzierte mukoziliäre Reinigung aufweisen, bleibt kann also in dieser Arbeit nicht aufgedeckt werden. Das unauffällige Lungengewebe bei *miR-34a*- und *Cdkn1a*-Nullmutanten zeigt aber, dass der Einfluss von P53 auf das Bronchialepithel nicht allein durch diese typischen Effektorgene des Zellzyklusarrestes ausgeübt wird.

4.4 Forschungsperspektiven

Diese Arbeit zeigt, dass *Trp53* an der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion des respiratorischen Epithels beteiligt ist und an der Regulation der zellulären und epithelialen Immunität der Lunge teilnimmt. Die verstärkte peribronchiale Makrophageninfiltration bei *Trp53*-Nullmutanten kann dabei durch einen direkten Einfluss von *Trp53* auf die Migration und Aktivität der Makrophagen vermittelt sein. Zusätzlich kann die spontane peribronchiale Makrophageninfiltration durch die verringerte Induktion des Proteaseinhibitors TIMP1 durch *Trp53* in den Keulenzellen des Bronchialepithels bedingt sein. Die verstärkte Entzündungsreaktion der Atemwege bei *Trp53*-Knock-out-Tieren kann auch sekundär durch die eingeschränkte mukoziliäre Reinigungsfunktion ausgelöst sein. Das konstitutive Fehlen der P53-Effektoren CDKN1A und *miR-34a*

verursacht jedoch keinen vergleichbaren Phänotyp; die Effekte von P53 auf das Bronchialepithel werden also durch das gewebeabhängig feinregulierte gesamte P53-Netzwerk vermittelt. Der konstitutive *Trp53*-Knock-out in der Maus stellt also nur ein bedingtes Modell der COPD dar, weil zwar die typische eingeschränkte mukoziliäre Reinigungsfunktion und die spontane und chronische peribronchiale Entzündungsreaktion vorliegen, die Tiere aber keine Becherzell-Hyperplasie mit Dyskrinie und nicht die typische verstärkte *Mmp12*-Expression aufweisen. Auch fehlt die Entwicklung eines Lungenemphysems, wie es bei der COPD vorkommt. Die eingangs dargestellte Evidenz für eine pathogenetische Bedeutung der verstärkten, P53-abhängigen Apoptose bei der COPD lässt sich also insofern mit den tierexperimentellen Belegen der protektiven Funktion von P53 für die Homöostase des Bronchialepithels vereinbaren, als dass bei der COPD die Apoptosefunktion von P53 im Vordergrund steht. Für die kontinuierliche Regeneration mit einer gleichmäßigen und funktionalen Verteilung der differenzierten Zellen des Bronchialepithels sind die Zellzyklus-arretierenden und differenzierungsfördernden Funktionen von P53 bedeutsam, wie in dieser Arbeit und anderswo nachgewiesen werden kann (Jain et al. 2012; McConnell et al. 2016).

Die Mechanismen, durch welche P53 die Differenzierung von Flimmerzellen und die Verteilung der Zelltypen im Bronchialepithel beeinflusst, bedürfen weiterer Untersuchungen. Zentral ist dabei die Untersuchung, wie sich bei *Trp53*-Nullmutanten das Verhältnis von seneszenten und quieszenten Zellen im Bronchialepithel darstellt. Hinweise auf eine Akkumulation seneszenten Zellen schon bei jungen Tieren bieten die reduzierten TIMP1-Proteinlevel und die seneszenztypische Sekretion von MMP12 im Bronchialepithel. Die durch den P53-Verlust bedingte unkontrollierte Zellteilung kann die Akkumulation von DNA-Schäden verursachen und so P53-unabhängig die Seneszenz von Epithelzellen induzieren. Gleichzeitig ist die Induktion von Seneszenz ein zentraler Effekt von P53, sodass bei *Trp53* Nullmutanten weniger seneszenten Zellen zu erwarten sind. Umgekehrt ist die durch P53- und CDKN1A-vermittelte Quieszenz eine Differenzierungsvoraussetzung für Flimmerzellen. Diese Untersuchung stellt also eine wichtige Perspektive dar, um den Mechanismus des reduzierten Flimmerzellanteils am Bronchialepithel bei *Trp53* Nullmutanten aufzudecken.

Außerdem ist die Interaktion der P63-Isoformen mit P53, welche für die Basalzellen der größeren Atemwege und auch für die bronchoalveolären Stammzellen der distalen Atemwege von Bedeutung ist, eine weitere wichtige wissenschaftliche Fragestellung (Candi et al. 2015; Zuo et al. 2015). Auch sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu aufzuklären, durch welche P53-Effektorgene die proapoptotische respektive die

differenzierungsfördernde Funktion von P53 im Bronchialepithel vermittelt wird, um therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, durch welche ein homöostatischer Zellumsatz im Bronchialepithel erreicht werden kann, ohne dort gleichzeitig Seneszenz und Apoptose auszulösen.

5 Zusammenfassung

Die pulmonalen Epithelien weisen bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors *TP53* auf und zeigen sowohl eine verstärkte Proliferation als auch eine verstärkte Apoptose. Gleichzeitig zeigen *Trp53*-defiziente Mauslungen eine verstärkte entzündliche Aktivität und der spezifische Knock-out von *Trp53* in den Keulenzellen verursacht eine Hyperplasie eben diesen Zelltyps. Damit stehen epidemiologische Befunde einer *p53*-bedingten dysfunktionellen Veränderung des Bronchial- und Alveolarepithels bei der COPD den tierexperimentellen Ergebnissen einer protektiven Funktion von *Trp53* im Bronchialepithel und in den Makrophagen der Lunge gegenüber. Diese Arbeit untersucht deshalb die Lungen von *Trp53*-Nullmutanten im Vergleich zu Wildtypen unter der Fragestellung, ob ein konstitutiver *Trp53*-Knock-out ein adäquates genetisches Modell der COPD darstellt.

Die Lungen von *Trp53*-Nullmutanten weisen eine intakte Parenchymstruktur auf und zeigen auch im Alter keine relevante emphysematöse Aufweitung der Alveolarräume. Sie zeigen allerdings eine bisher nicht beschriebene spontane, peribronchiale Infiltration mit aktivierten, peripheren Makrophagen. Diese Beobachtung aggraviert in einem experimentellen Modell des Lungenemphysems. Trotz der verstärkten peribronchialen Makrophageninfiltration bei *Trp53*-Nullmutanten zeigen diese Tiere keine stärkere *Mmp12*-Expression als die Wildtypen, wie es für die COPD typisch ist. Sie weisen aber eine geringere Expression des Proteaseinhibitors TIMP1 auf, sodass eine stärkere enzymatische Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen bei *Trp53*-Knock-out-Tieren postuliert werden kann. Diese Arbeit beschreibt damit erstmals, dass sowohl MMP12 als auch TIMP1 in den Keulenzellen des Bronchialepithels exprimiert werden und damit das Epithel selbst an der chronischen Entzündung teilnimmt. Damit phänokopiert der konstitutive *Trp53*-Knock-out die COPD insofern, als dass eine verstärkte peribronchiale entzündliche Aktivität und eine Imbalance aus Proteasen und Antiproteasen besteht. Eine COPD-typische *Mmp12*-Überexpression und eine emphysematöse Gewebedestruktion fehlen aber.

Das respiratorische Epithel von *Trp53*-Nullmutanten besteht aus signifikant weniger Flimmerzellen als bei den Wildtypen. Dieser reduzierte Anteil an Flimmerzellen führt zu einer hochsignifikant reduzierten mukoziliären Transportgeschwindigkeit über dem respiratorischen Epithel von *Trp53*-Knock-out-Mäusen. Der Anteil an Becher- und Keulenzellen divergiert hingegen nicht. *Trp53*-Nullmutanten können also inhalierte Partikel

schlechter abtransportieren und sind so zusätzlich für bronchiale Infektionen und Entzündungen prädisponiert.

Damit sind *Trp53*-Nullmutanten auch hier ein partielles Modell der COPD, weil zwar der COPD-typische, frühe Mangel an zilierten Zellen sichtbar ist, die typische Becherzellhyperplasie aber ausbleibt. Die funktionellen Konsequenzen sind jedoch, wenn auch in reduzierter Ausprägung, gleich. Die Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Bronchialepithels sind bei *Trp53*-Nullmutanten nicht durch Alterationen bekannter Differenzierungspfade von Stammzellen (wie durch *TAp73* oder *Foxj1*) oder Keulenzellen (wie durch *Notch1*) zu Flimmerzellen zu erklären. Der Basalzellfaktor *Sox2* wird bei jungen Nullmutanten weniger stark exprimiert. Die Expression der Stammzellgene *Krt5* und *Nanog* zeigt sich bei Nullmutanten zwar erhöht, diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

Die epitheliale Regeneration der Bronchien verläuft in einem Regenerationsmodell auch bei *Trp53*-Nullmutanten regelrecht, sodass die Differenzen der Zellverteilung auf einen veränderten homöostatischen Zellumsatz zurückzuführen sind. Dieser veränderte Zellumsatz kann dabei nicht auf die reduzierte Expression des P53-Effektors *miR-34a* zurückgeführt werden, da Nullmutanten für diese zentrale Mikro-RNA ein hinsichtlich Parenchymstruktur, bronchialer Zellverteilung und entzündlicher Aktivität normale Lungen aufweisen. Die differenzierungsfördernde Funktion von P53 zu Flimmerzellen ist vermutlich durch CDKN1A vermittelt, auch wenn ein konstitutiver *Cdkn1a*-Knock-out den *Trp53*-Knock-out nicht vollständig phänotypiert.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass ein konstitutives Fehlen von P53 zu COPD-ähnlichen Veränderungen an der Lunge von Mäusen führt. Gleichzeitig zeigen andere Arbeiten, dass die P53-bedingte Apoptose und Seneszenz von bronchialen und alveolären Epithelzellen ebenso pathogenetisch relevant sind für die COPD. Entsprechend lässt sich konstatieren, dass physiologisch reguliertes P53 im gesunden Bronchialepithel durch die Induktion von Differenzierungsvorgängen und die Proliferationshemmung von Stammzellen und sekretorischen Zellen zu einem funktionellen Bronchialepithel beiträgt. Weiterhin kontrolliert und hemmt P53 epitheliale wie monozytäre Entzündungsreaktionen und schützt das Lungengewebe so vor entzündungsbedingten Schädigungen. Bei der COPD hingegen dominieren die proapoptotischen und Seneszenz-induzierenden Funktionen von P53, die zugleich einen Zellverlust und eine langfristige Stammzellerschöpfung bedingen.

6 Anhang

Tabelle A.1: Umfang der Bronchien von 16 Wochen alten *Trp53*-Wildtypen und -Nullmutanten.

	<i>Trp53</i> -Wildtyp	<i>Trp53</i> -Knock-out
Bronchusumfang (Pixel)	25283	18472
	15660	28798
	36701	18772
	31264	16317
	32174	19021
	25567	40181
	17447	27952
	23112	30274
	22923	28914
	32656	18301
	26576	17317
	28949	20855
27373	17767	
Durchschnitt (Pixel)	26931	23601
Standardfehler des Mittelwerts (Pixel)	1780	1635
Ungepaarter T-Test	p = 0,1784	

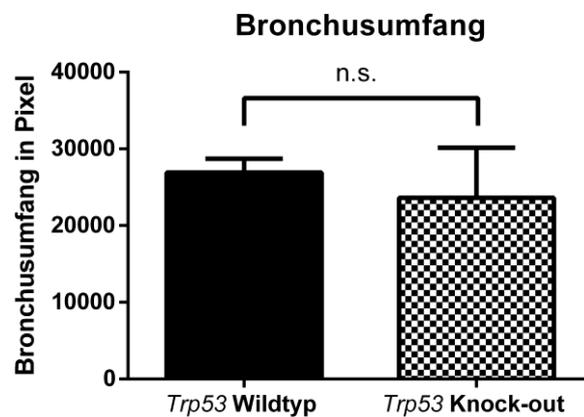


Abbildung A.1: Vergleich des Umfangs der Bronchien in immunfluoreszenzmikroskopischen Bildern 16 Wochen alter Mauslungen, n = 16, p = 0,1784.

Die tabellarische Darstellung der errechneten möglichen Bindungsstellen von P53 an der 5' und 3' flankierenden Region des murinen *Timp1*-Gens sind unten dargestellt. Dabei wurden nur solche potentiellen Bindungsstellen aufgenommen, die einen hohen relativen Score ($> 0,85$) aufweisen. Eine Bindung an diesen DNA-Abschnitten kann als *Enhancer* die Expression des *Timp1*-Gens induzieren. Ebenso ist allerdings auch eine Funktion von P53 als Repressor an diesen Stellen möglich. Für die Vorhersage möglicher Bindungsstellen wurde die JASPAR-Datenbank in der fünften Erweiterung (publiziert und genutzt 2016) genutzt (Mathelier et al. 2016). Der experimentelle Nachweis der Bindung (beispielsweise mittels Chromatin-Immunpräzipitation) von P53 an diesen DNA-Abschnitten sowie die Veränderung der *Timp1*-Expression nach Überexpression von P53 sind aber notwendig, um die errechneten Bindungsstellen zu überprüfen (vergleiche dazu Abschnitt 4.1.2.2).

Tabelle A.2: Potentielle Bindungsstellen von P53 5' oberhalb des murinen *Timp1*-Gens (Allel 1).

Model ID	Modelname	Score	Relativer Score	Start	Ende	Strang	Vorhergesagte Sequenz
MA010 6.2	TP53	16.30 8	0.9124118 11966073	5398	5412	1	acatgcacagtcatg
MA010 6.2	TP53	17.50 3	0.9269367 84699936	1036 5	10379	1	gcaagtccaggcaa g
MA010 6.2	TP53	13.54 1	0.8787795 11083562	1464 2	14656	1	acctgccaagacaa g
MA010 6.2	TP53	12.80 0	0.8697728 12509677	1940 1	19415	-1	acaagaccaaacag g

Tabelle A.3: Potentielle Bindungsstellen von P53 3' unterhalb des murinen *Timp1*-Gens (Allel 1).

Model ID	Modelname	Score	Relativer Score	Start	Ende	Strang	Vorhergesagte Sequenz
MA010 6.2	TP53	11.93 8	0.8592953 84479058	564	578	1	acatgccatggcag g
MA010 6.2	TP53	12.00 0	0.8600489 81390773	565	579	-1	gcctgccatggcatg
MA010 6.3	TP53	12.13 5	0.8558299 23387941	8932	8949	-1	agcatgccctggtat gcc
MA010 6.2	TP53	12.72 1	0.8688125 84186685	8934	8948	-1	gcatgccctggtatg

Tabelle A.4: Potentielle Bindungsstellen von P53 5' oberhalb des murinen *Timp1*-Gens (Allel 2).

Model ID	Modelname	Score	Relativer Score	Start	Ende	Strang	Vorhergesagte Sequenz
MA010 6.2	TP53	16.30 8	0.9124118 11966073	5453	5467	1	acatgcacagtcag
MA010 6.2	TP53	11.49 3	0.8538865 03419167	5556	5570	1	acatgtacacgcata
MA010 6.2	TP53	17.50 3	0.9269367 84699936	1042 0	10434	1	gcaagtccaggcaa g
MA010 6.2	TP53	13.54 1	0.8787795 11083562	1469 7	14711	1	acctgccaagacaag
MA010 6.2	TP53	12.80 0	0.8697728 12509677	1945 6	19470	-1	acaagaccaaacag g

Tabelle A.5: Potentielle Bindungsstellen von P53 3' unterhalb des murinen *Timp1*-Gens (Allel 2).

Model ID	Modelname	Score	Relativer Score	Start	Ende	Strang	Vorhergesagte Sequenz
MA010 6.2	TP53	12.00 0	0.8600489 81390773	567	581	-1	gcctgccatggcatg
MA010 6.3	TP53	12.13 5	0.8558299 23387941	8934	8951	-1	agcatgccctggtat gcc
MA010 6.2	TP53	12.72 1	0.8688125 84186685	8936	8950	-1	gcatgccctggtatg

7 Literaturverzeichnis

- Aaron SD, Vandemheen KL, Ramsay T, Zhang C, Avnur Z, Nikolcheva T, Quinn A (2010): Multi-analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Respir Res* 11, 41
- Abegglen LM, Caulin AF, Chan A, Lee K, Robinson R, Campbell MS, Kiso WK, Schmitt DL, Waddell PJ, Bhaskara S, et al. (2015): Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA* 314, 1850
- Åberg E, Saccoccia F, Grabherr M, Ore WYJ, Jemth P, Hultqvist G (2017): Evolution of the p53-MDM2 pathway. *BMC Evol Biol* 17, 177
- Adamson I, Bowden D (1975): Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. - PubMed - NCBI. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 736–745
- Agusti A, Decramer M, Celli BR, Chen R, Criner G, Frith P, Halpin D, Varela MVL, Nishimura M, Rodriguez-Roisin R, Vogelmeier C (2017): Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention.
- Ak P, Levine AJ (2010): p53 and NF- κ B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J* 24, 3643–3652
- Akram K, Patel N, Spiteri M, Forsyth N (2016): Lung Regeneration: Endogenous and Exogenous Stem Cell Mediated Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 17, 128
- Al Jord A, Lemaître A-I, Delgehyr N, Faucourt M, Spassky N, Meunier A (2014): Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature* 516, 104–107
- Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern J-B, Noureddine H, Sapin E, Rideau D, et al. (2011): Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1358–1366
- Aoshiba K, Zhou F, Tsuji T, Nagai A (2012): DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. *Eur Respir J* 39, 1368–1376
- Arif E, Vibhuti A, Deepak D, Singh B, Siddiqui MS, Pasha MAQ (2008): COX2 and p53 risk-alleles coexist in COPD. *Clin Chim Acta* 397, 48–50
- Armit CJ, O’Dea S, Clarke AR, Harrison DJ (2002): Absence of p53 in Clara cells favours multinucleation and loss of cell cycle arrest. *BMC Cell Biol* 3, 27
- Arpino V, Brock M, Gill SE (2015): The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* 44–46, 247–254
- Ashcroft M, Vousden KH (1999): Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18, 7637–7643
- Bagdonas E, Raudoniute J, Bruzauskaite I, Aldonyte R (2015): Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 10, 995–1013

- Balasoorya GI, Goschorska M, Piddini E, Rawlins EL (2017): FGFR2 is required for airway basal cell self-renewal and terminal differentiation. *Dev Camb Engl* 144, 1600–1606
- Banerjee B, Ling K-M, Sutanto EN, Musk M, Yerkovich ST, Hopkins PMA, Stick SM, Kicic A, Chambers DC (2011): The airway epithelium is a direct source of matrix degrading enzymes in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 30, 1175–1185
- Barnes PJ, Celli BR (2009): Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 33, 1165–1185
- Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE (2019): Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 200, 556–564
- Bartel DP (2009): MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233
- Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, Holtz A, Shah S, Sharma V, Ferrucci L, et al. (2020): A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLOS Biol* 18, e3000599
- Belade E, Chrusciel S, Armand L, Simon-Deckers A, Bussy C, Caramelle P, Gagliolo J-M, Boyer L, Lanone S, Paireon J-C, et al. (2015): The role of p53 in lung macrophages following exposure to a panel of manufactured nanomaterials. *Arch Toxicol* 89, 1543–1556
- Botta GP, Reichert M, Reginato MJ, Heeg S, Rustgi AK, Lelkes PI (2013): ERK2-regulated TIMP1 induces hyperproliferation of K-Ras(G12D)-transformed pancreatic ductal cells. *Neoplasia N Y N* 15, 359–372
- Bourdon J-C (2007): p53 Family isoforms. *Curr Pharm Biotechnol* 8, 332–336
- Brien GL, Bracken AP (2015): The PCL1-p53 axis promotes cellular quiescence. *Cell Cycle* 15, 305–306
- Brooks CL, Gu W (2011): The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* 2, 456–462
- Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, et al. (2001): Jun NH2-Terminal Kinase Phosphorylation of p53 on Thr-81 Is Important for p53 Stabilization and Transcriptional Activities in Response to Stress. *Mol Cell Biol* 21, 2743–2754
- Candi E, Amelio I, Agostini M, Melino G (2015): MicroRNAs and p63 in epithelial stemness. *Cell Death Differ* 22, 12–21
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998): Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677–1679
- Carr SM, Munro S, La Thangue NB (2012): Lysine methylation and the regulation of p53. *Essays Biochem* 52, 79–92
- Carrasco-Garcia E, Moreno M, Moreno-Cugnon L, Matheu A (2017): Increased Arf/p53 activity in stem cells, aging and cancer. *Aging Cell* 16, 219–225
- Castaldi PJ, Cho MH, Cohn M, Langerman F, Moran S, Tarragona N, Moukhachen H, Venugopal R, Hasimja D, Kao E, et al. (2010): The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Hum Mol Genet* 19, 526–534

- Chand HS, Montano G, Huang X, Randell SH, Mebratu Y, Petersen H, Tesfaigzi Y (2014): A genetic variant of p53 restricts the mucous secretory phenotype by regulating SPDEF and Bcl-2 expression. *Nat Commun* 5, 5567
- Chang J, Davis-Dusenbery BN, Kashima R, Jiang X, Marathe N, Sessa R, Louie J, Gu W, Lagna G, Hata A (2013): Acetylation of p53 stimulates miRNA processing and determines cell survival following genotoxic stress. *EMBO J* 32, 3192–3205
- Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, et al. (2007): Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745–752
- Chao CC-K (2015): Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 438, 139–147
- Chaudhary R, Lal A (2017): Long noncoding RNAs in the p53 network. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8, e1410
- Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, Gregorieff A, Clevers H, Whitsett JA (2009): SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest* 119, 2914–2924
- Chiappara G, Gjomarkaj M, Virzi A, Sciarrino S, Ferraro M, Bruno A, Montalbano AM, Vitulo P, Minervini MI, Pipitone L, Pace E (2013): The role of p21 Waf1/Cip1 in large airway epithelium in smokers with and without COPD. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1473–1481
- Chilosi M, Doglioni C (2001): Constitutive p63 expression in airway basal cells. A molecular target in diffuse lung diseases. - PubMed - NCBI.
- Choi B-K, Dayaram T, Parikh N, Wilkins AD, Nagarajan M, Novikov IB, Bachman BJ, Jung SY, Haas PJ, Labrie JL, et al. (2018): Literature-based automated discovery of tumor suppressor p53 phosphorylation and inhibition by NEK2. *Proc Natl Acad Sci* 115, 10666–10671
- Chrusciel S, Zysman M, Caramelle P, Tiendrebeogo A, Baskara I, Le Gouvello S, Chabot F, Giraudier S, Boczkowski J, Boyer L (2016): Lack of Transcription Factor p53 Exacerbates Elastase-Induced Emphysema in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54, 188–199
- Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, Graham BB, Reynolds PR, Reynolds SD (2010): Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. *Am J Pathol* 177, 362–376
- Crocker JC, Grier DG (1996): Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *J Colloid Interface Sci* 179, 298–310
- Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME (2008): Airway Epithelial Cells: Current Concepts and Challenges. *Proc Am Thorac Soc* 5, 772
- Dagouassat M, Gagliolo J-M, Chrusciel S, Bourin M-C, Duprez C, Caramelle P, Boyer L, Hue S, Stern J-B, Validire P, et al. (2013): The cyclooxygenase-2-prostaglandin E2 pathway maintains senescence of chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 703–714
- Danilova N, Sakamoto KM, Lin S (2008): p53 family in development. *Mech Dev* 125, 919–931
- De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM (2018): Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm* 2018, 1309746

- Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, Pauwels RA, Brusselle GG (2006): Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 61, 196
- Dhital R, Basnet S, Paudel P, Acharya YP, Poudel DR (2018): Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) among rheumatoid arthritis: results from national inpatient database. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 8, 211–214
- Duffy SP, Criner GJ (2019): Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Evaluation and Management. *Med Clin North Am* 103, 453–461
- Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR, Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly (2010): An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 693–718
- Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, DeMayo FJ, Burns AR, Smith C, Reynolds SD, et al. (2004): Mucin Is Produced by Clara Cells in the Proximal Airways of Antigen-Challenged Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 382–394
- Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, Ronai Z (1998a): JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 12, 2658–2663
- Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z (1998b): MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10541–10546
- Gannon HS, Woda BA, Jones SN (2012): ATM Phosphorylation of Mdm2 Ser394 Regulates the Amplitude and Duration of the DNA Damage Response in Mice. *Cancer Cell* 21, 668–679
- Gensch E, Gallup M, Sucher A, Li D, Gebremichael A, Lemjabbar H, Mengistab A, Dasari V, Hotchkiss J, Harkema J, Basbaum C (2004): Tobacco Smoke Control of Mucin Production in Lung Cells Requires Oxygen Radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem* 279, 39085–39093
- Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G (2004): Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 24, 7987–7997
- Ghosh M, Miller YE, Nakachi I, Kwon JB, Barón AE, Brantley AE, Merrick DT, Franklin WA, Keith RL, Vandivier RW (2018): Exhaustion of Airway Basal Progenitor Cells in Early and Established Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 885–896
- Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR (2002): Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 161, 173–182
- Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM (2014): Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer. *Mol Cancer Res* 12, 3–13
- Goeman F, Strano S, Blandino G (2017): MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network. *Int Rev Cell Mol Biol* 333, 51–90
- Gogebakan B, Bayraktar R, Ulaşlı M, Oztuzcu S, Tasdemir D, Bayram H (2014): The role of bronchial epithelial cell apoptosis in the pathogenesis of COPD. *Mol Biol Rep* 41, 5321–5327

- Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, Detry BR, Bouzin C, Chevronay HG, Lecocq M, Weynand B, Ladjemi MZ, Pierreux CE, et al. (2015): Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition. *Eur Respir J* 45, 1258–1272
- Gong H, Zhang Y, Jiang K, Ye S, Chen S, Zhang Q, Peng J, Chen J (2018): p73 coordinates with $\Delta 133p53$ to promote DNA double-strand break repair. *Cell Death Differ* 25, 1063–1079
- Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA (2011): Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer* 2, 503–516
- Guha A, Vasconcelos M, Cai Y, Yoneda M, Hinds A, Qian J, Li G, Dickel L, Johnson JE, Kimura S, et al. (2012): Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12592–12597
- Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, Rajagopal J (2009): Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Dev Camb Engl* 136, 1751–1759
- Hancox RJ, Poulton R, Welch D, Olova N, McLachlan CR, Greene JM, Sears MR, Caspi A, Moffitt TE, Robertson SP, Braithwaite AW (2009): Accelerated decline in lung function in cigarette smokers is associated with TP53/HDM2 polymorphisms. *Hum Genet* 126, 559–565
- Harper J, Adami G, Wei N, Keyomarsi K, Elledge S (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. - PubMed - NCBI. *Cell* 75, 805–816
- Hasegawa H, Ueda M, Furukawa K, Watanabe M, Teramoto T, Mukai M, Kitajima M (1995): p53 gene mutations in early colorectal carcinoma. De novo vs. adenoma-carcinoma sequence. *Int J Cancer* 64, 47–51
- Hodge S (2005): Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J* 25, 447–454
- Hogan BLM, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CCW, Niklason L, Calle E, Le A, Randell SH, et al. (2014): Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 15, 123–138
- Hogg JC (2004): Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 364, 709–721
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR (2004): In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 286, L643–L649
- Houssaini A, Breau M, Kebe K, Abid S, Marcos E, Lipskaia L, Rideau D, Parpaleix A, Huang J, Amsellem V, et al. (2018): mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema. *JCI Insight* 3, e93203
- Hudgins AD, Tazearslan C, Tare A, Zhu Y, Huffman D, Suh Y (2018): Age- and Tissue-Specific Expression of Senescence Biomarkers in Mice. *Front Genet* 9
- Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melén E, Söderhäll C, Hallberg J, et al. (2009): MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med* 361, 2599–2608
- Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM (2005): Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 25, 250–258

- Ishikawa T (2017): Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a028076
- Isoe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM (1986): Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84–85
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA (1994): Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1–7
- Jain AK, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarek RJ, Zwaka TP, Kyba M, Barton MC (2012): p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol* 10, e1001268
- Joerger AC, Fersht AR (2008): Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77, 557–582
- Jung K-K, Liu X-W, Chirco R, Fridman R, Kim H-RC (2006): Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 25, 3934–3942
- Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D’Amario D, Sanada F, Zheng H, Ogórek B, Rondon-Clavo C, Ferreira-Martins J, et al. (2011): Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 364, 1795–1806
- Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K (2016): Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Pept Sci* 106, 598–612
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998): Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8292–8297
- Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stöppler C, Roth J, Döbelstein M (2002): p53 induces the expression of its antagonist p73 Δ N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 21, 4715–4727
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304–6311
- Kastenhuber ER, Lowe SW (2017): Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062–1078
- Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan Z-M, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S (2004): Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 36, 55–62
- Kessler R, Partridge MR, Miravittles M, Cazzola M, Vogelmeier C, Leynaud D, Ostinelli J (2011): Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J* 37, 264–272
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF (1998): ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 20, 398–400
- Khoury MP, Bourdon J-C (2010): The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000927
- Kim BR, Van de Laar E, Cabanero M, Tarumi S, Hasenoeder S, Wang D, Virtanen C, Suzuki T, Bandarchi B, Sakashita S, et al. (2016): SOX2 and PI3K Cooperate to Induce and Stabilize a Squamous-Committed Stem Cell Injury State during Lung Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis. *PLOS Biol* 14, e1002581

- Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T (2005): Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell* 121, 823–835
- Kim K-H, Burkhardt K, Chen P, Frevert CW, Randolph-Habecker J, Hackman RC, Soloway PD, Madtes DK (2005): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 271–279
- Kippin TE, Martens DJ, Kooy D van der (2005): p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* 19, 756–767
- Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan M-L, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, et al. (2005): p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 19, 1030–1032
- Krell J, Stebbing J, Frampton AE, Carissimi C, Harding V, Giorgio AD, Fulci V, Macino G, Colombo T, Castellano L (2015): The role of TP53 in miRNA loading onto AGO2 and in remodelling the miRNA–mRNA interaction network. *The Lancet* 385, S15
- Kubbutat MH, Vousden KH (1997): Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol* 17, 460–468
- Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, Hoe NB, Wei TS, Mu D, Sun Y, Joo LS, Dagher R, Zielonka EM, et al. (2011): Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell* 147, 525–538
- Lafkas D, Shelton A, Chiu C, de Leon Boenig G, Chen Y, Stawicki SS, Siltanen C, Reichelt M, Zhou M, Wu X, et al. (2015): Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* 528, 127–131
- Lamb P, Crawford L (1986): Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6, 1379–1385
- Le Quément C, Guénon I, Gillon J-Y, Lagente V, Boichot E (2008): MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L1076-1084
- Lerner CA, Lei W, Sundar IK, Rahman I (2016): Genetic Ablation of CXCR2 Protects against Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation and Injury. *Front Pharmacol* 7
- Li Y, Liu J, McLaughlin N, Bachvarov D, Saifudeen Z, El-Dahr SS (2013): Genome-wide analysis of the p53 gene regulatory network in the developing mouse kidney. *Physiol Genomics* 45, 948–964
- Li Y-C, Wahl GM (2012): What a Difference a Phosphate Makes: Life or Death Decided by a Single Amino Acid in MDM2. *Cancer Cell* 21, 595–596
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y (2005): p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7, 165–171
- Liu G, Park Y-J, Tsuruta Y, Lorne E, Abraham E (2009): p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury. *J Immunol Baltim Md 1950* 182, 5063–5071
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL (1999): p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202–1209

- Lizé M, Herr C, Klimke A, Bals R, Döbelstein M (2010): MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell Cycle* 9, 4579–4583
- Lose F, Thompson PJ, Duffy D, Stewart GA, Kedda M-A (2005): A novel tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphism associated with asthma in Australian women. *Thorax* 60, 623–628
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, et al. (2012): Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380, 2095–2128
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F: Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Luo Z, Cui R, Tili E, Croce C (2018): Friend or Foe: MicroRNAs in the p53 network. *Cancer Lett* 419, 96–102
- Lüthje L, Raupach T, Michels H, Unsöld B, Hasenfuss G, Kögler H, Andreas S (2009): Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respir Res* 10, 7
- Madenspacher JH, Azzam KM, Gowdy KM, Malcolm KC, Nick JA, Dixon D, Aloor JJ, Draper DW, Guardiola JJ, Shatz M, et al. (2013): p53 Integrates host defense and cell fate during bacterial pneumonia. *J Exp Med* 210, 891–904
- Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scrabble H (2004): Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 18, 306–319
- Malecka KA, Ho WC, Marmorstein R (2009): Crystal structure of a p53 core tetramer bound to DNA. *Oncogene* 28, 325–333
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA (1990): Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233–1238
- Marcel V, Petit I, Murray-Zmijewski F, Goulet de Rugy T, Fernandes K, Meuray V, Diot A, Lane DP, Aberdam D, Bourdon J-C (2012): Diverse p63 and p73 isoforms regulate $\Delta 133p53$ expression through modulation of the internal TP53 promoter activity. *Cell Death Differ* 19, 816–826
- Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi L-E, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, et al. (2011): Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 13, 694–701
- Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, Bilawchuk LM, Hendry RG, Robertson AG, Cheung CT, et al. (2014): A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat Med* 20, 493–502
- Marshall CB, Mays DJ, Beeler JS, Rosenbluth JM, Boyd KL, Santos Guasch GL, Shaver TM, Tang IJ, Liu Q, Shyr Y, et al. (2016): p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Rep* 14, 2289–2300
- Mateu MG, Fersht AR (1998): Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J* 17, 2748–2758

- Mathelier A, Fornes O, Arenillas DJ, Chen C, Denay G, Lee J, Shi W, Shyr C, Tan G, Worsley-Hunt R, et al. (2016): JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 44, D110–D115
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, Flores JM, Viña J, Blasco MA, Serrano M (2007): Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448, 375–379
- Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S (1984): Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 3, 3257–3262
- Mayo LD, Donner DB (2001): A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 98, 11598–11603
- McBride OW, Merry D, Givol D (1986): The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci* 83, 130–134
- McConnell AM, Yao C, Yeckes AR, Wang Y, Selvaggio AS, Tang J, Kirsch DG, Stripp BR (2016): p53 Regulates Progenitor Cell Quiescence and Differentiation in the Airway. *Cell Rep* 17, 2173–2182
- McKeon FD (2004): p63 and p73 in tumor suppression and promotion. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc* 36, 6–12
- McLure KG, Lee PW (1998): How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* 17, 3342–3350
- Meek DW (2015): Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J* 469, 325–346
- Meek DW, Anderson CW (2009): Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000950
- Mellert H, Sykes SM, Murphy ME, McMahon SB (2007): The ARF/Oncogene Pathway Activates p53 Acetylation within the DNA Binding Domain. *Cell Cycle* 6, 1304–1306
- Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, Giani F, Vigneri R, Frasca F (2012): Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer* 130, 2259–2270
- Mishra A, Brat DJ, Verma M (2015): P53 tumor suppression network in cancer epigenetics. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1238, 597–605
- Mizuno S, Ishizaki T, Kadowaki M, Akai M, Shiozaki K, Iguchi M, Oikawa T, Nakagawa K, Osanai K, Toga H, et al. (2017): p53 Signaling Pathway Polymorphisms Associated With Emphysematous Changes in Patients With COPD. *Chest* 152, 58–69
- Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L (2011): Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 17, 11–19
- Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, Planquois J-M, Delaval P, Lagente V (2005): Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res* 54, 31–36
- Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J (2008): Increased p53 Level, Bax/Bcl-x_L Ratio, and TRAIL Receptor Expression in Human Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 240–247

- Mukaida N (2003): Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 284, L566–L577
- Mulhall JP, Barnas J, Kobylarz K, Mueller A (2010): p53-Associated Parkin-like cytoplasmic protein (Parc) short-interfering RNA (siRNA) alters p53 location and biology of Peyronie’s disease fibroblasts. *BJU Int* 106, 1706–1713
- Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon J-C (2006): p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 13, 962–972
- Nalluri S, Ghoshal-Gupta S, Kutiyawalla A, Gayatri S, Lee BR, Jiwani S, Rojiani AM, Rojiani MV (2015): TIMP-1 Inhibits Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells via Interaction with Bcl-2. *PloS One* 10, e0137673
- Nemajerova A, Kramer D, Siller SS, Herr C, Shomroni O, Pena T, Gallinas Suazo C, Glaser K, Wildung M, Steffen H, et al. (2016): TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev* 30, 1300–1312
- Nie L, Liu Z, Zhou W, Xiang R, Xiao Y, Lu B, Pang B, Gao J (2010): Chemokine receptor CXCR3 is important for lung tissue damage and airway remodeling induced by short-term exposure to cigarette smoking in mice. *Acta Pharmacol Sin* 31, 436–442
- Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W (2003): Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29–40
- Ortega-Martínez M, Rodríguez-Flores LE, de-la-Garza-González C, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G (2015): Detection of a novel stem cell probably involved in normal turnover of the lung airway epithelium. *J Cell Mol Med* 19, 2679–2681
- Ou C-Y, Chen C-Z, Hsiue T-R, Lin S-H, Wang J-Y (2015): Genetic variants of pulmonary SP-D predict disease outcome of COPD in a Chinese population. *Respirol Carlton Vic* 20, 296–303
- Parameswaran H, Bartolák-Suki E, Hamakawa H, Majumdar A, Allen PG, Suki B (2009): Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. *J Appl Physiol* 107, 583–592
- Park K-S, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, Whitsett JA (2006): Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 151–157
- Penyige A, Poliska S, Csanky E, Scholtz B, Dezso B, Schmelczler I, Kilty I, Takacs L, Nagy L (2010): Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. *BMC Med Genet* 11, 152
- Pérez-Rubio G, Silva-Zolezzi I, Fernández-López JC, Camarena Á, Velázquez-Uncal M, Morales-Mandujano F, Hernández-Zenteno RDJ, Flores-Trujillo F, Sánchez-Romero C, Velázquez-Montero A, et al. (2016): Genetic Variants in IL6R and ADAM19 are Associated with COPD Severity in a Mexican Mestizo Population. *COPD* 13, 610–615
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, et al. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2’s inhibition of p53. *Cell* 92, 713–723
- Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE (2012): The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One* 7, e47305

- Puchelle E, Zahm J, JM Tournier, Coraux C (2006): Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. - PubMed - NCBI. *Proc Am Thorac Soc* 3, 726–733
- Qu P, Du H, Wang X, Yan C (2009): Matrix Metalloproteinase 12 Overexpression in Lung Epithelial Cells Plays a Key Role in Emphysema to Lung Bronchioalveolar Adenocarcinoma Transition. *Cancer Res* 69, 7252–7261
- Raju SV, Jackson PL, Courville CA, McNicholas CM, Sloane PA, Sabbatini G, Tidwell S, Tang LP, Liu B, Fortenberry JA, et al. (2013): Cigarette Smoke Induces Systemic Defects in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function. *Am J Respir Crit Care Med* 188, 1321–1330
- Rawlins EL, Hogan BLM (2008): Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L231-234
- Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM (2009): The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* 4, 525–534
- Reed SM, Quelle DE (2015): p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* 7, 30–69
- Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang L-Y, Crapo JD, Reynolds HY (2005): The Mysterious Pulmonary Brush Cell: A Cell in Search of a Function. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 136–139
- Reynolds SD, Reynolds PR, Pryhuber GS, Finder JD, Stripp BR (2002): Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1498–1509
- Reynolds SD, Reynolds PR, Snyder JC, Whyte F, Paavola KJ, Stripp BR (2007): CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 293, L114–L123
- Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND (2003): p53 Represses Cyclin D1 Transcription through Down Regulation of Bcl-3 and Inducing Increased Association of the p52 NF- κ B Subunit with Histone Deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 23, 4713–4727
- Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM (2009): Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12771–12775
- Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BLM (2011): Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 639–648
- Romano R-A, Ortt K, Birkaya B, Smalley K, Sinha S (2009): An active role of the DeltaN isoform of p63 in regulating basal keratin genes K5 and K14 and directing epidermal cell fate. *PloS One* 4, e5623
- Rossi L, Ergen AV, Goodell MA (2011): TIMP-1 deficiency subverts cell-cycle dynamics in murine long-term HSCs. *Blood* 117, 6479–6488
- Ryan DM, Vincent TL, Salit J, Walters MS, Agosto-Perez F, Shaykhiev R, Strulovici-Barel Y, Downey RJ, Buro-Auriemma LJ, Staudt MR, et al. (2014): Smoking dysregulates the human airway basal cell transcriptome at COPD risk locus 19q13.2. *PloS One* 9, e88051

- Sagiv A, Bar-Shai A, Levi N, Hatzav M, Zada L, Ovadya Y, Roitman L, Manella G, Regev O, Majewska J, et al. (2018): p53 in Bronchial Club Cells Facilitates Chronic Lung Inflammation by Promoting Senescence. *Cell Rep* 22, 3468–3479
- Saito S, Yamaguchi H, Higashimoto Y, Chao C, Xu Y, Fornace AJ, Appella E, Anderson CW (2003): Phosphorylation Site Interdependence of Human p53 Post-translational Modifications in Response to Stress. *J Biol Chem* 278, 37536–37544
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998): DNA damage activates p53 through a phosphorylation–acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831–2841
- Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E (2000): Damage-mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 through a Cascade Mediated by a Casein 1-like Kinase EFFECT ON Mdm2 BINDING. *J Biol Chem* 275, 9278–9283
- Salvi SS, Barnes PJ (2009): Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet Lond Engl* 374, 733–743
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208
- Shetty SK, Bhandary YP, Marudamuthu AS, Abernathy D, Velusamy T, Starcher B, Shetty S (2012): Regulation of Airway and Alveolar Epithelial Cell Apoptosis by p53-Induced Plasminogen Activator Inhibitor-1 during Cigarette Smoke Exposure Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 474–483
- Siganaki M, Koutsopoulos AV, Neofytou E, Vlachaki E, Psarrou M, Soultzis N, Pentilas N, Schiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG (2010): Deregulation of apoptosis mediators' p53 and bcl2 in lung tissue of COPD patients. *Respir Res* 11, 46
- Sohal SS (2018): Airway Basal Cell Reprogramming and Epithelial–Mesenchymal Transition: A Potential Key to Understanding Early Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 1644–1645
- Sohal SS, Reid D, Soltani A, Ward C, Weston S, Muller HK, Wood-Baker R, Walters EH (2010): Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirol Carlton Vic* 15, 930–938
- Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen M-H, Chuang P-T (2012): Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17531–17536
- Song R, Walentek P, Sponer N, Klimke A, Lee JS, Dixon G, Harland R, Wan Y, Lishko P, Lize M, et al. (2014): miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* 510, 115–120
- Spassky N, Meunier A (2017): The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 423
- Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM (2002): Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* 277, 14177–14185

- Stindt MH, Muller P a. J, Ludwig RL, Kehrloesser S, Dötsch V, Vousden KH (2015): Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* 34, 4300–4310
- Stoller JK, Aboussouan LS (2005): Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet Lond Engl* 365, 2225–2236
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998): The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17, 5001–5014
- Sulak M, Fong L, Mika K, Chigurupati S, Yon L, Mongan NP, Emes RD, Lynch VJ (2016): TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. *eLife* 5, e11994
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K (2009): Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533
- Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, Cooper J, Sin DD, Mohn WW, Hogg JC (2012): The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 1073–1080
- Tao W, Levine AJ (1999): Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3077–3080
- Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM, Vinarsky V, Cho JL, Breton S, Sahay A, et al. (2013): Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature* 503, 218–223
- Tennis M, Krishnan S, Bonner M, Ambrosone CB, Vena JE, Moysich K, Swede H, McCann S, Hall P, Shields PG, Freudenheim JL (2006): p53 Mutation analysis in breast tumors by a DNA microarray method. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 15, 80–85
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT (1999): A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13, 152–157
- Titz B, Sewer A, Schneider T, Elamin A, Martin F, Dijon S, Luettich K, Guedj E, Vuillaume G, Ivanov NV, et al. (2015): Alterations in the sputum proteome and transcriptome in smokers and early-stage COPD subjects. *J Proteomics* 128, 306–320
- Toledo F, Wahl GM (2006): Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909–923
- Toledo F, Lee CJ, Krummel KA, Rodewald L-W, Liu C-W, Wahl GM (2007): Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol Cell Biol* 27, 1425–1432
- Tophkhane C, Yang S-H, Jiang Y, Ma Z, Subramaniam D, Anant S, Yogosawa S, Sakai T, Liu W-G, Edgerton S, et al. (2012): p53 inactivation upregulates p73 expression through E2F-1 mediated transcription. *PloS One* 7, e43564
- Toskala E, Smiley-Jewell SM, Wong VJ, King D, Plopper CG (2005): Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 289, L454–L459

- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2006): Alveolar Cell Senescence in Patients with Pulmonary Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 886–893
- Uhal BD (1997): Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 272, L1031–L1045
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, et al. (2015): Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 394
- Valdez JM, Nichols KE, Kesserwan C (2017): Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition. *Br J Haematol* 176, 539–552
- van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM (2011): Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts. *Respir Res* 12, 57
- Vaughan AE, Brumwell AN, Xi Y, Gotts JE, Brownfield DG, Treutlein B, Tan K, Tan V, Liu FC, Looney MR, et al. (2015): Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury. *Nature* 517, 621–625
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (1998): The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 17, 4668–4679
- Vertii A, Hung H-F, Hehnly H, Doxsey S (2016): Human basal body basics. *Cilia* 5, 13
- Vitenberga Z, Pilmane M, Babjoniševa A (2019): An Insight into COPD Morphopathogenesis: Chronic Inflammation, Remodeling, and Antimicrobial Defense. *Med Kaunas Lith* 55, 496
- Vogelmeier C, Buhl R, Burghuber O, Criée C-P, Ewig S, Godnic-Cvar J, Hartl S, Herth F, Kardos P, Kenn K, et al. (2018): S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD).
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310
- Wang S-Z, Rosenberger CL, Espindola TM, Barrett EG, Tesfaigzi Y, Bice DE, Harrod KS (2001): CCSP modulates airway dysfunction and host responses in an Ova-challenged mouse model. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 281, L1303–L1311
- Wang Y, Prives C (1995): Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376, 88–91
- Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X (2018): Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13, 3341–3348
- Warwick E, Scourfield A, Quint J (2015): Systemic manifestations of chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Hosp Med* 76, 324–329
- Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SFP, Pare PD, Sin DD (2005): Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 60, 570–575
- Weinberg RL, Freund SMV, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR (2004): Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol* 342, 801–811

- Wildung M: MiRNAs and tumor suppressors form a gene regulatory network to protect multiciliogenesis. Göttingen 2018
- Wildung M, Esser TU, Grausam KB, Wiedwald C, Li L, Zylla JLS, Günther A-K, Wienken M, Ercetin E, Bremmer F, et al. (2018): Transcription factor TAp73 and miRNA-449 cooperate in multiciliogenesis. *bioRxiv* 273375
- Wildung M, Esser TU, Grausam KB, Wiedwald C, Volceanov-Hahn L, Riedel D, Beuermann S, Li L, Zylla J, Guenther A-K, et al. (2019): Transcription factor TAp73 and microRNA-449 complement each other to support multiciliogenesis. *Cell Death Differ* 26, 2740–2757
- Williams AB, Schumacher B (2016): p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6
- Winkelmann A, Noack T (2010): The Clara cell: a “Third Reich eponym”? *Eur Respir J* 36, 722–727
- Woywodt A, Lefrak S, Matteson E (2010): Tainted eponyms in medicine: the „Clara“ cell joins the list. *Eur Respir J* 36, 706–708
- Wunderlich R, Ruehle P-F, Deloch L, Unger K, Hess J, Zitzelsberger H, Lauber K, Frey B, Gaipf US (2017): Interconnection between DNA damage, senescence, inflammation, and cancer. *Front Biosci Landmark Ed* 22, 348–369
- Yaghi A, Zaman A, Cox G, Dolovich MB (2012): Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respir Med* 106, 1139–1147
- Yatera K, Morimoto Y, Kim HN, Yamato H, Tanaka I, Kido M (2001): Increased expression of matrix metalloproteinase in Clara cell-ablated mice inhaling crystalline silica. *Environ Health Perspect* 109, 795–799
- Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Respiratory Failure Research Group in Japan (2004): Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125, 626–632
- Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD (2009): COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J* 34, 380–386
- Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, Baumbach J, Herrmann M, Grünwald C, Dienemann H, et al. (2013): Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS One* 8, e68302
- Zhang P, Li J, Qi Y, Tang X, Duan J, Liu L, Wu Z, Liang J, Li J, Wang X, et al. (2016): Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1 Knockdown Suppresses the Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016, 4761507
- Zhang W, Lu Q, Xie ZJ, Mellgren RL (1997): Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene* 14, 255–263
- Zhou F, Onizawa S, Nagai A, Aoshiba K (2011): Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Respir Res* 12, 78
- Zhu J, Zhou W, Jiang J, Chen X (1998): Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* 273, 13030–13036

- Ziora D, Dworniczak S, Kozielski J (2008): Induced sputum metalloproteinases and their inhibitors in relation to exhaled nitrogen oxide and sputum nitric oxides and other inflammatory cytokines in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 59 Suppl 6, 809–817
- Zuo W, Zhang T, Wu DZ, Guan SP, Liew A-A, Yamamoto Y, Wang X, Lim SJ, Vincent M, Lessard M, et al. (2015): p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature* 517, 616–620

Danksagung

Bei der Durchführung der Versuche sowie die Verschriftlichung der Arbeit habe ich von vielen Menschen wertvolle Hilfe bekommen, für die ich mich hier ausdrücklich bedanken möchte. Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Andreas für die Erstbetreuung der Dissertation und für die Förderung des Forschungsprojektes aus den Mittel der AG molekulare und experimentelle Pneumologie. Außerdem danke ich Prof. Dr. Matthias Dobbstein für die Zweitbetreuung der Dissertation. Sie beide haben durch Anregungen im persönlichen Gespräch und durch die Diskussionen der Fortschrittsberichte konstruktive Kritik geäußert und wichtige Einordnungen gegeben sowie Perspektiven der Arbeit aufgezeigt.

Ich danke Dr. Muriel Lizé für die gemeinsame Entwicklung wichtiger Forschungsrichtungen, für methodische Beratung und Kritik während der experimentellen Phase der Arbeit, für die inhaltliche Durchsicht der verschriftlichen Arbeit, für die Unterstützung bei der Vernetzung mit anderen Wissenschaftler*innen sowie für die stete Motivation in dem Projekt.

Für die Unterstützung und Beratung bei den Experimenten, für Rat und Beispiel bei der Verschriftlichung und Darstellung von Ergebnissen und die gute und unterstützende Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei Dr. Merit Wildung bedanken.

Für eine gute Arbeitsatmosphäre, für gemeinsame Vorversuche, für methodisch-praktische Unterstützung und für die gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei den Mitarbeitenden der ehemaligen Arbeitsgruppe molekulare und experimentelle Pneumologie, Cornelia Wiedwald, Sabine Beuermann, Larisa Volceanov-Hahn, Evrim Ercetin, Lydia Bartsch und Tilman Esser bedanken. Cornelia Wiedwald danke ich besonders für die Hilfe bei der Genotypisierung der Versuchstiere. Mihai Alvera hat mich in die Nutzung des Konfokalmikroskops für die mukoziliäre Reinigungsuntersuchung eingearbeitet und mich bei der Auswertung der Daten unterstützt. Vielen Dank dafür.

Die Mitarbeitenden des Instituts für molekulare Onkologie und der Arbeitsgruppe für translationale Tumorepigenetik haben mich durch konstruktive Kritik an meinen Ergebnissen und durch praktische Ratschläge bei den Versuchen dabei unterstützt, das Forschungsprojekt erfolgreich abzuschließen.

Die Friedrich-Ebert-Stiftung hat mein Studium ideell und finanziell gefördert und hat mir zusätzliche Studienzeiten für die Forschung finanziert und aktiv ermöglicht. Dafür möchte ich mich bedanken.

Ich danke Folke Brodersen für die aufmerksame sprachliche Korrektur der Dissertationsschrift und für das Stellen wichtiger Fragen, die zu klaren Formulierungen und eindeutigen Argumentationen beigetragen haben. Für die emotionale und organisatorische Unterstützung während der Versuchsphase und der Verschriftlichung möchte ich mich außerdem bedanken.