

Rolle des Transkriptionsfaktors
cAMP response element-binding protein (CREB)
bei der Lungenalterung

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau **Paulina Anna Rolewska**
geboren am 22. Juni 1981 in Lubań (Polen)

1. Gutachter: Prof. Klaus Humbeck
2. Gutachter: PD Babett Bartling
3. Guatcher: Prof. Lars-Oliver Klotz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24.06.2015

„Jeder, der sich
die Fähigkeit erhält,
Schönes zu erkennen,
wird nie alt werden“.

Franz Kafka

Für meine Familie - ganz besonders für meine Mutti!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	10
2.1. Die Anatomie der Lunge bei Mensch und Maus.....	10
2.1.1. Die Zelltypen der Lunge.....	11
2.1.2. Die extrazelluläre Matrix in der Lunge.....	12
2.2. Lungenalterung.....	13
2.3. Alterung und seine biologischen Mechanismen.....	15
2.3.1. Zelluläre Seneszenz.....	16
2.3.2. Oxidativer Stress.....	17
2.3.3. Modifikation von Proteinen.....	18
2.4. Das <i>cAMP response element-binding protein</i> (CREB).....	21
2.4.1. Proteinstruktur und Isoformen von CREB.....	22
2.4.2. Aktivierung von CREB.....	23
2.4.3. Posttranskriptionelle Regulation von CREB.....	25
2.4.5. Physiologische Rolle von CREB.....	26
3. Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
4. Material.....	29
4.1. Chemikalien.....	29
4.2. Enzyme.....	31
4.3. Kits.....	31
4.4. Zellkulturchemikalien.....	32
4.5. Geräte.....	32
4.6. Software.....	33
4.7. Zelllinien.....	34
4.8. Mäuse.....	34
4.9. Primer.....	35
5. Methoden.....	37
5.1. Zellbiologische Methoden.....	37
5.1.1. Kultivierung und Passagierung der adhärenenten Zellen.....	37
5.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	37
5.1.3. Mykoplasmentest.....	38
5.1.4. Bestimmung der zellulären Seneszenz.....	38
5.1.4.1. Die Wachstumskinetik.....	38
5.1.4.2. Nachweis der sauren β -Galaktosidase-Aktivität.....	38
5.1.5. Zellversuche.....	39
5.1.5.1. CREB-Aktivierung.....	39
5.1.5.2. Induktion von oxidativem Stress in Zellen.....	40
5.1.5.3. Indirekte Zellkokultur.....	40

5.1.5.4. Gewinnung der extrazellulären Matrix von Fibroblasten.....	40
5.1.5.5. Herstellung von AGE-modifiziertem Kollagen.....	41
5.1.5.6. Kultivierung/Behandlung von Zellen auf/mit AGE-modifiziertem Kollagen.	41
5.1.5.7. Zelltodanalysen: Trypanblau-Färbung	41
5.1.5.8. siRNA-Transfektion humaner Zellen	41
5.2. Molekularbiologische Methoden	42
5.2.1. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen	42
5.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe	42
5.2.3. Isolation von microRNA aus Zellen und Gewebe	43
5.2.4. Bestimmung der Konzentration, Reinheit und Qualität von RNA.....	43
5.2.5. Reverse Transkription von RNA.....	43
5.2.6. Reverse Transkription von microRNA	44
5.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
5.2.8. Agarose-Gelelektrophorese	45
5.2.9. <i>Real-time</i> PCR.....	46
5.2.10. <i>Real-time</i> PCR von microRNA	46
5.2.10.1. Auswertung der <i>Real-time</i> PCR	47
5.2.11. DNA-Mikroarray.....	48
5.3. Proteinbiochemische Methoden	49
5.3.1. Herstellung von Proteinlysaten aus Mauslungengewebe	49
5.3.2. Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen	49
5.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
5.3.4. Immunopräzipitation	50
5.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
5.3.6. Western-Blot	51
5.3.7. Coomassie-Färbung.....	53
5.3.8. Immunocytochemie	53
5.3.9. Immunohistochemie	53
5.4. Kollagenanalytik.....	54
5.4.1. Isolation von fibrillärem Kollagen	54
5.4.2. Kollagenquantifizierung mittels 4-Hydroxyprolin-Assay.....	56
5.4.3. AGE-Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung und Bräunungsgrad	57
5.4.4. Spot-/Slot-Blot	57
5.5. Statistik	58
6. Ergebnisse	59
6.1. Einfluss der Alterung auf den Gehalt von totalem und aktiviertem/phosphoryliertem CREB in der Mauslunge.....	59
6.2. Einfluss der Alterung auf den Gehalt, die Verdaubarkeit und AGE-Modifizierung von Kollagen in der Mauslunge	62
6.3. Ursachen für den altersabhängigen verminderten Gehalt und die Aktivierung von CREB.....	65
6.3.1. Zelluläre Seneszenz.....	66
6.3.2. AGE-modifizierte Matrix und oxidativer Stress	69

6.4. Regulation des altersabhängigen CREB-Proteingehalts	73
6.5. Zellbiologische Bedeutung der verminderten CREB Proteinmenge	75
6.5.1. CREB <i>knockdown</i> und Zellverhalten	75
6.5.2. CREB <i>knockdown</i> und Genexpressionsveränderungen	78
6.5.3. Einfluss von Lungenalterung, zellulärer Seneszenz und AGE-modifiziertem Kollagen auf den mRNA-Gehalt potentieller CREB-Targetgene	80
7. Diskussion	81
7.1. Reduktion von totalem und aktiviertem CREB während der Lungen-alterung der Maus	82
7.2. CREB-Reduktion als mögliche Folge von oxidativem Stress und zellulärer Seneszenz	83
7.3. Post-transkriptionelle/-translationale Regulation von CREB während Lungenalterung	85
7.4. Einfluss der Lungenalterung der Maus auf Expression und AGE-Modifizierung von Kollagen als mögliche Ursache der CREB-Reduktion	86
7.5. CREB-Targetgene während der Lungenalterung	91
7.6. Biologische Auswirkungen der CREB-Reduktion	93
8. Literaturverzeichnis.....	95
9. Anhang	110
Danksagung.....	110
Lebenslauf.....	111
Veröffentlichungen.....	113
Eidesstattliche Erklärung	114

Abkürzungsverzeichnis

Der Buchstabencode verwendeter Protein- und Gen-Bezeichnungen wurde jeweils im Text bei der ersten Nennung erklärt.

Englische Termini und Anglizismen wurden als solche beibehalten und durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Abb.	Abbildung
AGEs	<i>advanced glycation end-products</i>
AGE-R1	AGE-bindender Rezeptor 1 auch OST-48 (Oligosaccharyltransferase)
AGE-R2	AGE-bindender Rezeptor 2
AGE-R3	AGE-bindender Rezeptor 3
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AT I	Alveolarepithelzellen vom Typ I
AT II	Alveolarepithelzellen vom Typ II
ATF1	<i>activating transcription factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATXN1	Ataxin1
A549	Zelllinie, humanes Adenokarzinom der Lunge
BASIC	basische Domäne
bp	Anzahl der DNA-Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bZIP	Leuzinzipper Domäne
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Cesium
ca.	circa, ungefähr
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAMK	Calmodulin-abhängige Kinase
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CEL	Carboxyethyllysin
cm	Zentimeter
CML	Carboxymethyllysin
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>

CREM	<i>cAMP response element modulatory protein</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cys	Aminosäure Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
ERK1/2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
EZM	extrazelluläre Matrix
F1	Pepsin-verdaubare Fraktion von fibrillärem Kollagen
F2	Kollagenase Typ I-verdaubare Fraktion von fibrillärem Kollagen
F3	enzymatisch-unverdaubare Fraktion von fibrillärem Kollagen
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
His	Histidin
H358	Zelllinie, humanes Adenokarzinom der Lunge
4-Hyp	4-Hydroxyprolin
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
IGFBP3	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>
<i>in vivo</i>	lat. „im Lebendigen“, im lebendigen Organismus
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“, außerhalb eines lebenden Organismus
K	Kilo
kb	Kilo-Basenpaaren (1000 Basenpaaren)
KID	Kinase-induzierbare Domäne
KPD	kumulative Populationsverdopplung
l	Liter
log	Logarithmus
LuFi	Lungenfibroblasten
Lys	Lysin
M	Molar (mol/l)
µg	Mikrogramm
min	Minute
miRNA	micro-RNA

ml	Mililiter
µl	Mikroliter
MLI	<i>mean linear intercept</i>
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinukloetidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OST-48	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	<i>potential hydrogen</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD-1	Proteinkinase D1
Pol II	Polymerase II
PP	Proteinphosphatase
p-Wert	Signifikanzwert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	<i>poliovirus receptor</i>
RAB27A	<i>member ras oncogene family</i>
RAGE	Rezeptor für <i>advanced glycation end-products</i>
RHA	RNA Helikase A
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	<i>ribonuclease</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen per Minute
RT	Raumtemperatur

SA-β-Gal	<i>senescence-associated-β-Galaktosidase</i>
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUMO3	<i>small ubiquitin-like modifier 3</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TATs	<i>TBP associated factors</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline tween 20</i>
TEMED	<i>N,N,N,N'-Tetramethylethan-1,2-diamin</i>
TET2	<i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i> (Tetraspanin2)
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitors of matrix metalloproteases</i>
TORC	<i>transducer of regulated CREB activity coactivator</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit, Einheit für katalytische Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslatierte Region von mRNA
UV	Ultraviolettstrahlung
Q1/Q2	Glutaminreiche Domäne 1 oder 2
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen
WI-38	embryonale Lungenfibroblasten
w/v	Masse pro Volumen
× g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung $g = 9,80665 \text{ ms}^{-2}$
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D- galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Häufig sind mit dem zunehmenden Alter allgemeiner Funktionsverlust und Erkrankungen der Lunge verbunden. Die alte Lunge ist dabei durch viele morphologische und physiologische Veränderungen gekennzeichnet, deren molekulare Ursachen jedoch nur wenig verstanden sind. Da Transkriptionsfaktoren wie das *cAMP response element-binding protein* (CREB) viele Gene regulieren und so ein ganzes Spektrum von Prozessen beeinflussen können, war das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung von CREB bei der Lungenalterung zu untersuchen. Diese Untersuchungen zeigten am Mausmodell, dass der Proteingehalt an totalem und phosphoryliertem (aktiviertem) CREB mit der Lungenalterung reduziert wird. Am Beispiel von humanen Zellmodellen (A549 als immortale Lungenepithelzellen sowie primäre fetale und adulte Lungenfibroblasten) konnten zelluläre Seneszenz sowie chronischer oxidativer Stress als mögliche Ursachen der altersvermittelten CREB-Abnahme identifiziert werden. Dabei war die Abnahme von CREB nicht transkriptionell sondern post-transkriptionell/-translational reguliert. In diesem Zusammenhang wurde ein Anstieg der microRNA-34b, welche die CREB-Translation blockieren kann, sowie eine stark zunehmende Ubiquitinierung von CREB identifiziert. Am Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass es mit zunehmendem Alter zu post-translationalen Veränderungen der extrazellulären Kollagene durch Zucker, den sogenannten *advanced glycation end-products* (AGEs), kommt. Obwohl auch diese einen negativen Einfluss auf die Proteinexpression von CREB hatten, konnte hier der molekulare Hintergrund nicht ausreichend geklärt werden. Stimulationsversuche von CREB zeigten zudem, dass die Aktivierbarkeit von CREB über den cAMP/Proteinkinase A-Signalweg in Lungenzellen, die auf AGE-modifiziertem Kollagen kultiviert worden sind, und besonders in seneszenten Lungenzellen reduziert war. Die potentielle Bedeutung von CREB bei der Lungenalterung wurde durch *knockdown*-Experimente mit *small interference* RNA untersucht, die einen negativen Effekt der CREB-Abnahme auf die Zellproliferation und -vitalität bei gleichzeitiger Zunahme seneszenten Zellen zeigten. Vergleichende Genexpressionsanalysen von humanen Lungenzellen mit und ohne CREB *knockdown*, seneszenten und prä-seneszenten Lungenzellen sowie Lungengewebe junger und alter Mäuse konnten vor allem RAB27A und IGFBP3 als Targetgene von CREB identifizieren, welche bei der Lungenalterung eine Rolle spielen könnten. Neben anderen Zelltypen ist RAB27A besonders in den Epithelzellen der terminalen Bronchiolen exprimiert, wo immunohistochemische Färbungen auch eine auffallende CREB-Lokalisierung nachwiesen. Somit kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass die Reduktion des Transkriptionsfaktors CREB in der Lungenalterung, und hier besonders in den Bronchiolen, beim altersbedingten Funktionsverlust und der erhöhten Sensibilität gegenüber Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

Summary

Increasing age is often associated with a general loss of function and diseases of the lung. An old lung is characterized by many morphological and physiological changes, however the molecular processes causing the changes are poorly understood. Because transcription factors such as cAMP response element-binding protein (CREB) can regulate many genes and thus affect a whole range of processes, the aim of this work was to investigate the role of CREB in lung aging. This study demonstrated, using a mouse model, that the protein content of total and phosphor-activated CREB in lungs reduces with age. As exemplified by human cell models (immortal lung epithelial cells A549, primary fetal and adult lung fibroblasts) cellular senescence and chronic oxidative stress have been identified as possible causes of age-mediated CREB reduction. The decrease of CREB was not transcriptionally regulated, but post-transcriptionally/-translational regulated. An increase of microRNA-34b, which can repress CREB translation, as well as a strong increase in ubiquitination of CREB was also identified. It has also been shown on mouse model that aging leads to post-translational alterations of the extracellular collagens by sugars, the so-called advanced glycation end-products (AGEs). Although they had a negative effect on the protein expression of CREB, the molecular background could not be fully clarified. CREB stimulation experiments also showed that the activation capacity of CREB through the cAMP/protein kinase A pathway in lung cells that have been cultured on modified AGE-collagen was reduced, particularly in senescent lung cells. The potential importance of CREB in lung aging was investigated by knock down experiments using small interference RNA, which showed a negative effect of CREB reduction on cell proliferation and viability with a concomitant increase of senescent cells. Comparative gene expression analysis of human lung cells with and without knock down of CREB, senescent and pre-senescent lung cells and lung tissues of young and old mice identified RAB27A and IGFBP3 as target genes of CREB, which could play a role in lung aging. Among other cell types, RAB27A is particularly expressed in the epithelial cells of the terminal bronchioles. Immunohistochemical staining of these cells demonstrated a striking CREB presence. It can be concluded from the results of the present study that the reduction of the transcription factor CREB in the lung aging, especially in the bronchioles, plays an important role in age-related functional loss and increased susceptibility for diseases.

2. Einleitung

2.1. Die Anatomie der Lunge bei Mensch und Maus

Die Lunge ist ein Bestandteil des Atmungsapparates und dient dem Gasaustausch durch die Bereitstellung von alveolären und kapillären Kontaktflächen. Sie ist in eine rechte und linke Lunge unterteilt, welche jeweils aus mehreren Lappen bestehen, die wiederum in Segmente, Subsegmente und Lungenläppchen eingeteilt werden. Beim Menschen besteht die rechte Lunge aus drei Lappen und die linke Lunge aus zwei Lappen. Die rechte Lunge ist weiterhin in zehn und die linke Lunge in neun Lungensegmente gegliedert. Bei der Maus ist die rechte Lunge in vier Lappen unterteilt und die linke Lunge besteht aus einem Lappen. Zentraler Bestandteil der Lunge ist der Bronchialbaum, der sich bis zu den terminalen Bronchiolen immer weiter verzweigt und schließlich in die Lungenbläschen (Alveolen) mündet (Abb. 1A). Der Gasaustausch findet im distalen Abschnitt des Bronchialbaums, dem sogenannten respiratorischen System statt, welches aus den respiratorischen Bronchiolen und den Lungenbläschen (Alveolen) besteht (Moll KJ & Moll M, 2002; Fritsch & Kühnel, 2003). Die Aufzweigungen des menschlichen Bronchialsystems sind dichotom, wohingegen bei der Maus die Verzweigungen monopodial sind (Irvin & Bates, 2003).

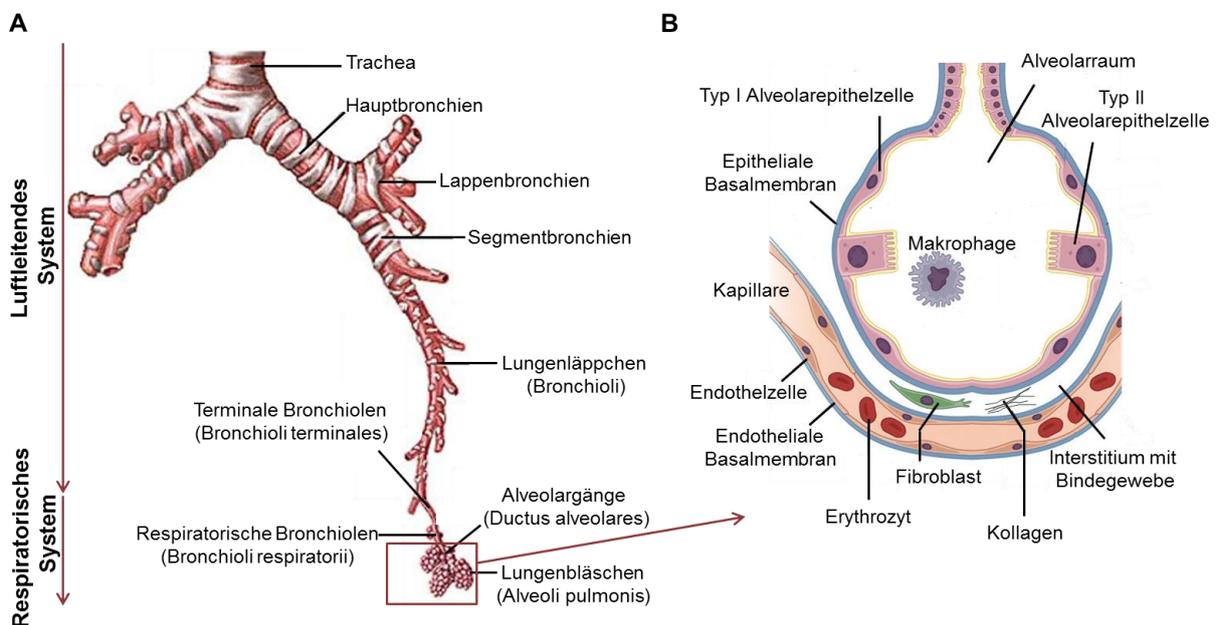


Abbildung 1: Aufbau der Lunge

A) Gliederung des Bronchialbaumes (modifiziert nach Moll KJ & Moll M. Anatomie. Elsevier Verlag 17. Auflage 2002)

B) Aufbau der Lungenbläschen (modifiziert nach Harrisons Innere Medizin. 18. Auflage 2012)

2.1.1. Die Zelltypen der Lunge

Die Lunge besitzt eine komplexe Gewebestruktur mit einer starken Kompartimentierung und setzt sich aus mehr als 40 unterschiedlichen Zelltypen zusammen (Jeffery & Reid, 1975). Die luftleitenden Wege bestehen aus 12 verschiedenen Typen von Epithelzellen (Mercer *et al.*, 1994). Die Trachea und Hauptbronchien sind von einem mehrreihigen, respiratorischen Epithel ausgekleidet, das aus Flimmerepithelzellen, Basalzellen, Becherzellen, Bürstensaumzellen, neuroendokrinen Zellen und Clarazellen besteht. Die Bronchiolen sind von einem einschichtigen Flimmerepithel ausgekleidet. Die Wandstärke des Flimmerepithels nimmt entlang des Bronchialbaums in Richtung der Alveolen kontinuierlich ab. Die Alveolargänge bestehen aus dünnen Wänden mit einem einreihigen Epithel und ringförmig liegenden glatten Muskelzellen. Die benachbarten Alveolen sind durch schmale interalveoläre Septen voneinander getrennt, die aus Bindegewebe aufgebaut sind und ein Kapillarsystem tragen. Dieses interstitielle Bindegewebe bildet das Bindegewebsgerüst der Lunge (Adler *et al.*, 1989) und besteht aus vernetzten elastischen und kollagenen Fasern, welches eingelagerte Fibroblasten, Makrophagen, Leukozyten und Mastzellen enthält (Abb. 1B). Die humanen Alveolen (*mean linear intercept* (MLI) von 210 μm) sind größer als die Alveolen der Maus (80 μm MLI) (Irvin & Bates, 2003). Die Alveolaroberfläche besteht hauptsächlich aus zwei Zelltypen, den großen Alveolarepithelzellen Typ I (AT I-Zellen) bzw. Deckzellen und den kleinen Alveolarepithelzellen Typ II (AT II-Zellen) bzw. Nischenzellen (Abb. 1B). Die flachen Deckzellen repräsentieren beim Menschen ca. 8 % aller Zellpopulationen der Lunge, jedoch kleiden sie ca. 95 % der inneren Alveolaroberfläche aus (Crapo *et al.*, 1982). Zu den Funktionen der AT I-Zellen gehören Beteiligung am Gasaustausch und die Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität der Alveolen. AT I- und AT II-Zellen sind über *tight junctions* miteinander verbunden und bilden so ein kontinuierliches Epithel. Die AT II-Zellen treten sporadisch mit nur 7 % in Nischen der Alveolarwände auf, aber ihr Anteil an der Gesamtzellpopulation der Lunge beträgt 16 % (Crapo *et al.*, 1982). AT II-Zellen sind für die Regeneration des Alveolarepithels verantwortlich, was auch wichtig ist, da die AT I-Zellen sehr empfindlich gegenüber exogenen schädigenden Einflüssen (Ward & Nicholas, 1984) sind. Nach Schädigung von AT I-Zellen können AT II-Zellen nämlich in diese differenzieren und sie dadurch ersetzen (Adamson & Bowden, 1974; Fehrenbach *et al.*, 1999). Die AT II-Zellen erfüllen auch andere wichtige Funktionen wie das Sezernieren von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin, Prokollagen Typ IV und Kollagen Typ V) sowie die Produktion von Surfactant (Sage *et al.*, 1983; Crouch *et al.*, 1987). Surfactant ist ein Phospholipidfilm, der das Alveolarlumen ausfüllt und durch Reduktion der Oberflächenspannung ein Kollabieren der Alveolen verhindert (Johansson & Curstedt, 1997). Im Alveolarlumen befinden sich zudem Makrophagen als Immunzellen der Lunge. Sie sind von großer Bedeutung für die körpereigene

Abwehr gegenüber inhalierten Partikeln und Mikroorganismen (Soukup & Becker, 2001). Die Makrophagen produzieren Sauerstoffradikale und Zytokine wie den Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukine im Rahmen der bakteriellen Abwehr (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994). Außerdem existiert in der Lunge ein Pool an B- und T-Lymphozyten sowie dendritische Zellen zur zellulären Immunabwehr (Holt *et al.*, 1988; Blank *et al.*, 2008). Alveoläre Kapillaren bilden ein dichtes Netz aus Gefäßen, die mit Endothelzellen ausgekleidet sind. Die Erythrozyten in den Kapillaren bilden zusammen mit diesen Endothelzellen, der anliegenden Basalmembran sowie dem interstitiellen Bindegewebsfasern und den ATI-Zellen die Blut-Luft-Schranke (Abb. 1B). Hier findet die Aufnahme von Sauerstoff in das Blut und die Abgabe von Kohlenstoffdioxid in die Atemwege statt. Die Oberfläche der Blut-Luft-Schranke ist 25mal größer als die äußere Oberfläche des menschlichen Körpers.

2.1.2. Die extrazelluläre Matrix in der Lunge

Die Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) werden von den Zellen selbst synthetisiert und in den Extrazellularraum abgegeben. Sie erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Zum einen führen sie zur Stabilität und Elastizität des Bindegewebes. Zum anderen sind EZM-Moleküle wichtig für die Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation und sind somit an der Signaltransduktion zwischen den Zellen als auch zwischen Zellen und ihrer Umgebung beteiligt (Dunsmore & Rannels, 1996). Die EZM setzt sich aus einer Grundsubstanz (Proteoglykane, Glykoproteine, Wasser) und kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern zusammen. Das Bindegewebe der Lunge besteht zu 60 % aus Kollagenen, zu 35-40 % aus elastischen Fasern (Elastin, Mikrofibrillen) und zu 1-2 % aus Proteoglykanen (Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat) (Hance & Crystal, 1975). Als die wichtigsten Strukturproteine der extrazellulären Matrix der Lunge wurden 11 unterschiedliche Typen von Kollagenen identifiziert, die 15-20 % des Lungentrockengewichtes ausmachen (Laurent, 1986).

Kollagenmoleküle sind aus 3 helikalen Polypeptidketten (α -Ketten) aufgebaut, die in Form einer rechtshändigen Tripelhelix umeinander gewunden sind. Die Ketten besitzen zahlreiche Wiederholungen des Sequenzmotivs Glycin-X-Y, wobei auf den Positionen X und Y jede beliebige Aminosäure außer Tryptophan und selten Tyrosin vorkommen kann. Häufig wird die Position X durch Prolin und die Position Y durch Hydroxyprolin ersetzt (Fietzek & Kuhn, 1976; Beck & Brodsky, 1998). Der Anteil am Gesamtaminosäuregehalt einer Polypeptidkette beträgt für Glycin 33 %, für Hydroxyprolin 14 % und für Prolin 10 % (Lin & Kuan, 2010). Die Familie der Kollagene lässt sich auf Grund ihrer Struktur als auch Lokalisation und Anordnung im Gewebe in verschiedene Typen unterteilen. Nach ihrer Struktur unterscheidet man fibrilläre

Kollagene (I, II, III, V, XI), nicht-fibrilläre Kollagene (IV, VI, VII, VIII, X) und Fibrillen-assoziierte Kollagene (IX, XII, XIV) (Gelse *et al.*, 2003).

Die gesunde menschliche Lunge besteht zu 90 % aus den interstitiellen, fibrillären Kollagenfasern Typ I und III, die sich nicht nur im Interstitium sondern auch in den Hauptbronchien und in den Blutgefäßen befinden. Kollagen Typ II ist in den Knorpelplatten der Bronchiolen zu finden und Kollagen Typ IV ist ein zentraler Bestandteil der *Lamina densa*, der Basalmembran, und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Form und Dehnbarkeit der Lungenbläschen (Kirk *et al.*, 1984; Amenta *et al.*, 1988). Die Basalmembran ist eine dünne Schicht der EZM, die neben Kollagen Typ IV auch Laminin, die Glykoproteine Fibronectin und Entactin, sowie die Proteoglykane Perlecan und Chondroitinsulfat enthält (Carlin *et al.*, 1981; Kleinman *et al.*, 1985; Iozzo, 1994; Dunsmore & Rannels, 1996). Diese EZM-Komponenten werden von AT II-Zellen und mesenchymalen Zellen synthetisiert (Crouch *et al.*, 1987; Rannels *et al.*, 1987; Ekblom *et al.*, 1994). Das Lungeninterstitium besteht außer aus den fibrillären Kollagenen Typ I und Typ III auch aus Elastin und den Proteoglykanen Versican und Decorin (Pelosi *et al.*, 2007). Fibroblasten sind Hauptproduzenten der Kollagene I und III, Elastin, Fibronectin und der Proteoglykane (Hance *et al.*, 1976; Castor *et al.*, 1983; Campagnone *et al.*, 1987; Heremans *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988). Kollagen vom Typ VI befindet sich auch im Lungeninterstitium und vernetzt Fibrillen aus den Kollagentypen I und III miteinander (Bonaldo *et al.*, 1990).

2.2. Lungenalterung

Alterung ist ein komplexer, biologischer Prozess, der alle höheren Organismen nach Abschluss der Entwicklungsprozesse begleitet und letztendlich zum Tod führt. Während des Alterungsprozesses verringert sich die Anpassungs- und Widerstandsfähigkeit des Körpers gegenüber Stress. Die physiologischen Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Funktion der Organe dienen, laufen nicht mehr mit ausreichender Schnelligkeit und Genauigkeit ab, die Homöostase ist gestört. Daraus resultierende Veränderungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, an einer Alterskrankheit zu sterben.

Der Großteil der Alveolen (85 % beim Mensch und fast 100 % bei der Maus) werden postnatal gebildet (Gilbert & Rannels, 1999). Beim Menschen ist das Ende der Alveolarisation zwischen dem 8. und 12. Lebensjahr erreicht, und zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr ist die Lunge dann vollständig entwickelt (Janssens *et al.*, 1999; Burri, 2006). Nach Abschluss von Wachstum und Reife beginnt die Lunge langsam zu altern. Mit zunehmendem Alter kommt es zu vielen morphologischen Veränderungen im Bereich des respiratorischen Systems. Die Bronchiolen und Alveolen weiten sich, wobei die Anzahl der Alveolen abnimmt. Außerdem verringert sich die Zahl der Lungenkapillaren pro Alveole (Butler & Kleinerman, 1970; Verbeke *et al.*, 1992).

Diese Veränderungen führen u.a. zur Abnahme der Gasaustauschfläche und der Diffusionskapazität. Eine weitere wichtige Veränderung der Lunge ist deren Elastizitätsverlust, der vermutlich auf der Abnahme von funktionellem Elastin beruht (Reiser *et al.*, 1987). Dadurch wird die Rückfaltung der Lunge bei der Ausatmung eingeschränkt und somit bleibt mehr verbrauchte Luft in den Alveolen (Zunahme des Residualvolumens) (Turner *et al.*, 1968). Die maximale Lungenfunktion als auch die Brustwandcompliance (Brustwanddehnbarkeit) nehmen ab, weil die Rippenknorpel und die Gelenke verkalken und das Zwerchfell und die Muskeln zwischen den Rippen schwächer werden (Begin *et al.*, 1975; Polkey *et al.*, 1995). Die morphologischen und daraus resultierenden physiologischen Veränderungen der alternden Lunge sind in Tab.1 zusammengefasst. Zusätzlich lässt mit zunehmendem Alter auch die immunologische Abwehrreaktion der Lunge nach, wodurch das Risiko für eine Lungenentzündung steigt. Das Nachlassen der Immunabwehr beruht auf der abnehmenden Produktion von T-Zellen sowie der Reduktion der B-Zell-vermittelten Antikörperantwort in der Lunge (Jackola *et al.*, 1994; Meyer, 2005). Zudem führt die verminderte mucoziliäre Clearance infolge vergrößerter Alveolargänge sowie schwächerer Hustenstärke zu einer schlechteren Abwehr von eindringenden Keimen (Gillooly & Lamb, 1993; Voynow & Rubin, 2009). Neben der erhöhten Anfälligkeit für Lungenentzündungen ist die alternde Lunge auch anfälliger für Krankheiten wie Lungenkrebs und insbesondere chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD), zu denen die chronisch obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem zählen (Fukuchi, 2009).

Tabelle 1: Morphologische und physiologische Veränderungen der alternden Lunge

Bereich	Morphologische Veränderungen	Physiologische Veränderungen
Respiratorisches System	<ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerung der Bronchiolen- und Alveolenoberfläche <ul style="list-style-type: none"> ↳ Abnahme der Anzahl der Alveolen • Geringere Dichte der Kapillaren pro Alveole • Fensterung der Alveolenwände durch Zunahme der Anzahl der Kohn'schen Poren 	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger Gasaustauschfläche • Abfall des arteriellen pO₂ • Anstieg der Lungencompliance (Dehnbarkeit) • Abnahme der Diffusionskapazität
	<ul style="list-style-type: none"> • Zunahme der Alveolargangdurchmesser 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere mucoziliäre Clearance
	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme des Gehalts an funktionellem Elastin • Expression von Pseudoelastin <ul style="list-style-type: none"> ↳ Abnahme der Elastizität von Alveolenwänden 	<ul style="list-style-type: none"> • Einschränkungen der Rückfaltung bei der Ausatmung • Anstieg der Lungencompliance
Luftleitendes System	<ul style="list-style-type: none"> • Luftraumerweiterung • Abnahme des Gehalts an funktionellem Elastin <ul style="list-style-type: none"> ↳ Abnahme der Elastizität von Wänden der Bronchien 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme der Lungenfunktionsleistung
Thorax	<ul style="list-style-type: none"> • Verkalkung von Rippenknorpeln und Gelenken <ul style="list-style-type: none"> ↳ Steifheit von Brustgewebe 	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der maximalen Kraft beim Ein- und Ausatmen <ul style="list-style-type: none"> ↳ Abnahme der maximalen Lungenfunktion ↳ Verminderte Reaktion auf Hypoxie und Hyperkapnie
	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der maximalen Kraft beim Ein- und Ausatmen <ul style="list-style-type: none"> ↳ Verringerte Dehnungsfähigkeit ↳ Veränderungen in motorischen Endplatten 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme der Brustwandcompliance • Zunahme des Residualvolumens und der Residualkapazität • Abnahme der Vitalkapazität und der forcierten Vitalkapazität

2.3. Alterung und seine biologischen Mechanismen

Bislang wurden unterschiedlichste Theorien über die Ursachen des Alterns publiziert. Medvedev zählte mehr als 300 Theorien, von denen einige konkurrieren oder einander ausschließen, sich viele allerdings gegenseitig ergänzen (Medvedev, 1990). Diese Anzahl deutet darauf hin, dass das Altern ein sehr komplexer Prozess ist und daher eine spezifische Ursachenfindung schwierig ist. Im vorliegenden Kapitel werden vor allem zelluläre Seneszenz, oxidativer Stress und

Modifikation von Proteinen mit *advanced glycation end-products* (AGEs) als Ursachen der Organalterung und somit Entstehung altersassoziierter Krankheiten nachfolgend genauer erläutert.

2.3.1. Zelluläre Seneszenz

Unter zellulärer Seneszenz versteht man die Alterung einer Zelle. Diese ist mit einem irreversiblen Zellzyklusarrest verbunden. Die zelluläre Seneszenz lässt sich nach replikativer Seneszenz und Stress-induzierter Seneszenz unterscheiden. Die replikative Seneszenz wird durch sich wiederholender Zellteilungen hervorgerufen (Hayflick, 1965). Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal von Hayflick beobachtet und als sogenanntes Hayflick Limit bezeichnet (Hayflick & Moorhead, 1961). Als Grund für die replikative Seneszenz werden die kontinuierlichen Telomerverkürzungen angesehen (Harley *et al.*, 1990). Mit Ausnahmen von Keim- und Stammzellen gehen die meisten Zellen nach etwa 50 bis 80 Zellteilungszyklen in die zelluläre/replikative Seneszenz über (Harley, 1991). Bei der Stress-induzierten Seneszenz (*stress induced premature senescence* [SIPS]) handelt es sich um eine vorzeitige Alterung der Zelle, welche durch Stressoren wie z.B. UV- oder Gamma-Strahlung, Onkogene und oxidativer Stress, ausgelöst werden kann (Serrano *et al.*, 1997; von Zglinicki *et al.*, 2005). Diese Form der Seneszenz ist Telomer unabhängig, und als Ursache werden DNA-Doppelstrangbrüche gesehen. Die Begriffe replikative Seneszenz und Stress-induzierte Seneszenz sind allerdings sehr theoretisch. *In vivo* treten beide Formen der zellulären Seneszenz parallel auf. Neben dem irreversiblen Proliferationsstop weisen senescente Zellen Veränderungen in ihrer Morphologie und Funktion auf. So zeigen sie häufig eine Zunahme des Zellvolumens. Außerdem besitzen senescente Zellen eine erhöhte saure β -Galaktosidase-Aktivität. Diese wird daher auch *senescence-associated- β -Galaktosidase* (SA- β -Gal) genannt. Die Bestimmung der Aktivität der SA- β -Gal ist ein typischer Marker für die zelluläre Seneszenz, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurde (Dimri *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2006a). Ein anderes alters-assoziertes Protein ist Lipofuszin, welches sich während der zellulären Seneszenz in Zellen ablagert (Brunk & Terman, 2002). Bei Lipofuszin, das umgangssprachlich auch Alterspigment genannt wird, handelt es sich um quervernetzende und fluoreszierende AGEs (Strehler *et al.*, 1959). Die AGEs werden in 2.3.3 noch genauer erläutert.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen zellulärer Seneszenz und Alterung von Organismen basiert auf der Beobachtung, dass isolierte Zellen aus alten Organismen kürzere Telomere aufweisen und schneller in die replikative Seneszenz *in vitro* übergehen als Zellen aus jüngeren Organismen (Martin *et al.*, 1970; Pignolo *et al.*, 1992; Shiels *et al.*, 1999; Lanza *et al.*, 2000). Durch die limitierte Teilungsfähigkeit steht den Zellen nur eine begrenzte Zeit für die Regeneration von Organen zur Verfügung. Dennoch sind senescente Zellen stoffwechselaktiv und

treten über lange Zeiträume nicht in die Apoptose ein (Cristofalo *et al.*, 2004). Ausserdem hat die veränderte Funktion seneszenten Zellen auch Einfluss auf die Mikroumgebung in Geweben. Dieser erfolgt primär durch Ausschüttung löslicher Faktoren wie Matrixmetalloproteasen, Wachstumsfaktoren, Interferon γ und andere Zytokine aus (Krtolica & Campisi, 2002; Campisi, 2011; Crescenzi *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Zellkulturüberstände (konditionierte Medien) von seneszenten Lungenfibroblasten verstärkt oxidativen Stress in Lungenepithelzellen auslösen (Bartling *et al.*, 2006).

2.3.2. Oxidativer Stress

Eine Ursache der zellulären Seneszenz und somit Alterung ist permanent oxidativer Stress. Dieser entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und anti-oxidativen Schutzmechanismen. Zu den ROS gehören zum einen freie Radikale, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen und dadurch eine erhöhte Reaktivität besitzen, als auch sehr reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter (Tab.2).

Tabelle 2: Radikalische und nicht-radikalische ROS

Radikalische ROS	Nicht-radikalische ROS
Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)	Singulett-Sauerstoff (1O_2)
Hydroxylradikale (OH^{\cdot})	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Alkoxyradikale (RO^{\cdot})	Alkylhydroperoxid (ROOH)
Alkylperoxyradikale (ROO^{\cdot})	Peroxynitrit ($ONOO^-$)

R=Alkylrest

ROS sind ein Nebenprodukt des Sauerstoffmetabolismus der Zelle und können auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen. Zum einen entstehen sie durch biochemische Umsetzung von O_2 als Substrat und zum anderen bei der Zellatmung in den Mitochondrien (Beckman & Ames, 1998). Sie sind in geringen Konzentrationen für physiologische Zellabläufe als *second messenger* bei einigen Signaltransduktionswegen, als Regulatoren der Genexpression und als Kofaktoren unverzichtbar. Allerdings führt ein Überschuss an ROS bevorzugt an der mitochondrialen DNA zu Mutationen, welche wiederum die Effizienz der Atmungskette beeinträchtigen. So wiesen mehrere Studien eine verstärkte Produktion von ROS in Mitochondrien alter Tiere in unterschiedlichen Geweben nach (zu Übersicht Richter, 1995). Durch die hohe Reaktivität der ROS (vor allem des Hydroxylradikals und des Singulett-Sauerstoffs) werden neben der DNA auch andere Makromoleküle, also Proteine, Kohlenhydrate und Lipide, durch diese geschädigt. In der Folge wird beispielsweise die Struktur der Zellmembran modifiziert und die Aktivität membrangebundener Enzyme (z.B. die der

Atmungskette) verändert (Yakes & Van Houten, 1997). Insgesamt sind vermehrt oxidative Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden mit zunehmenden Alter in mehreren Organen, einschließlich der Lunge, nachgewiesen worden (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999).

Aerobe Lebewesen verfügen über Mechanismen zum Schutz vor oxidativer Schädigung. ROS können sowohl durch enzymatische als auch durch nichtenzymatische Mechanismen inaktiviert werden. Zu den enzymatischen Mechanismen gehören Superoxiddismutasen, Katalasen, Thioredoxinreduktasen, die Glutathionperoxidase, Glutathiondisulfidreduktase und Glutathion-S-Transferase (Sies, 1993). Zu den nichtenzymatischen Mechanismen zählen Antioxidantien wie α -Tocopherol (Vitamin E), β -Carotin (Vitamin A), α -Carotin, Coenzym Q10, Ascorbinsäure (Vitamin C), Ubichinon, Glutathion, Selen und Zink.

In der Lunge können sich Alveolarepithelzellen Typ II im Gegensatz zu Typ I-Zellen gut gegen oxidativen Stress schützen, da sie eine hohe Katalaseaktivität besitzen (Heffner & Repine, 1989). Außerdem sind sie in der Lage, unter oxidativer Belastung durch Hyperoxie die Produktion des Antioxidans Vitamin E zu erhöhen (Tolle *et al.*, 1997). Das von den Typ II-Zellen gebildete Surfactant enthält zudem verschiedene Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin E (Halliwell & Gutteridge, 1990; Rustow *et al.*, 1993). Zudem können mit dem Surfactant aktiv Enzyme für den Lipidperoxidabbau (Phospholipase A₂, PAF-Acetylhydrolase) transportiert werden (Stremmler *et al.*, 1989; Triggiani *et al.*, 1997). Das mit 36 % mengenmäßig bedeutendste Phospholipid des alveolären Surfactants, Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), ist wegen seiner zwei gesättigten Fettsäuren an zwei Enden relativ unempfindlich gegen oxidative Schädigung (Creuwels *et al.*, 1997). Andererseits besitzt der Surfactantfilm viele andere Phospholipide sowie Cholesterin, die aufgrund der Ausrichtung ihrer aliphatischen Gruppen zur Luftseite im Alveolarraum sehr schnell durch Oxidantien angegriffen werden können (Rustow *et al.*, 1988).

2.3.3. Modifikation von Proteinen

Ein großer Teil der Proteine ist post-translational modifiziert. Post-translationale Proteinmodifikationen erfolgen durch enzymatische oder nicht-enzymatische Prozesse. Bei den alters-abhängigen Veränderungen spielen insbesondere die nicht-enzymatischen Proteinmodifikationen eine entscheidende Rolle. Zu diesen zählen neben den bereits beschriebenen Oxidationen durch ROS, die Glykierungen von Proteinen. Häufig gehen Glykierungen gleichzeitig mit Oxidationsvorgängen einher. Modifikationen an Proteinen und Peptiden, die aus einer nicht-enzymatischen Glykierung und Oxidation hervorgehen, sind unter dem Begriff *advanced glycation end-products* (AGEs) zusammengefasst. AGEs treten intra- und extrazellulär auf und beeinflussen die Funktionalität der Zellen auf verschiedenen Ebenen. Da sie mit zunehmendem Alter und besonders bei altersbedingten Erkrankungen wie *Diabetes mellitus* und

Nierendysfunktion auftreten, wird ihnen eine besondere Rolle bei der Organalterung zugesprochen. Im Gegensatz zur Diabetes- und Nierenforschung sind allerdings Lungen-spezifische Studien zu den AGEs bisher selten.

AGEs entstehen *in vivo* hauptsächlich als Folge der sog. Maillard-Reaktion zwischen Zuckern und Proteinen (Maillard & Gaultier 1912). Die Maillardreaktion lässt sich in drei Phasen einteilen. In der initialen Phase kommt es zur reversiblen Addition zwischen einer Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers und einer freien Aminogruppe eines Proteins. Nach Abspaltung eines Wassermoleküls entsteht das Schiff'sche Baseprodukt, welches dann in ein Amadori-Produkt (Aminoketose) umgelagert wird (Abb. 2). Amadori-Produkte können sich an Proteinen akkumulieren (Nawroth *et al.*, 1999; Ulrich & Cerami, 2001). Im letzten Schritt der Maillard-Reaktion werden die Amadori-Produkte in reaktive α -Dicarbonyle abgebaut, welche nun die eigentliche Grundlage der AGE-Bildung darstellen (Abb. 2). Zu den bekanntesten α -Dicarbonylen zählen Glyoxal und Methylglyoxal (Glomb & Monnier, 1995; Thornalley *et al.*, 1999). α -Dicarbonyle können aber auch über einen Nebenweg direkt aus dem Schiff'sche Baseprodukt gebildet werden (Abb. 2). Die reaktiven α -Dicarbonyle reagieren nun bevorzugt mit den Aminogruppen der Seitenketten von Lys und Arg an Proteinen über mehrere Zwischenstufen irreversibel zu AGEs weiter. Bei dieser Reaktion spielt auch die Entstehung von ROS sowie deren erneute Reaktion eine wichtige Rolle. Neben Proteinen können auch Lipide und Nukleinsäuren über ihre freien Aminogruppen glykiert und daher AGE-modifiziert werden, was bei Alterungsprozessen ebenfalls eine Rolle spielen dürfte (Ulrich & Cerami 2001; Singh *et al.*, 2001).

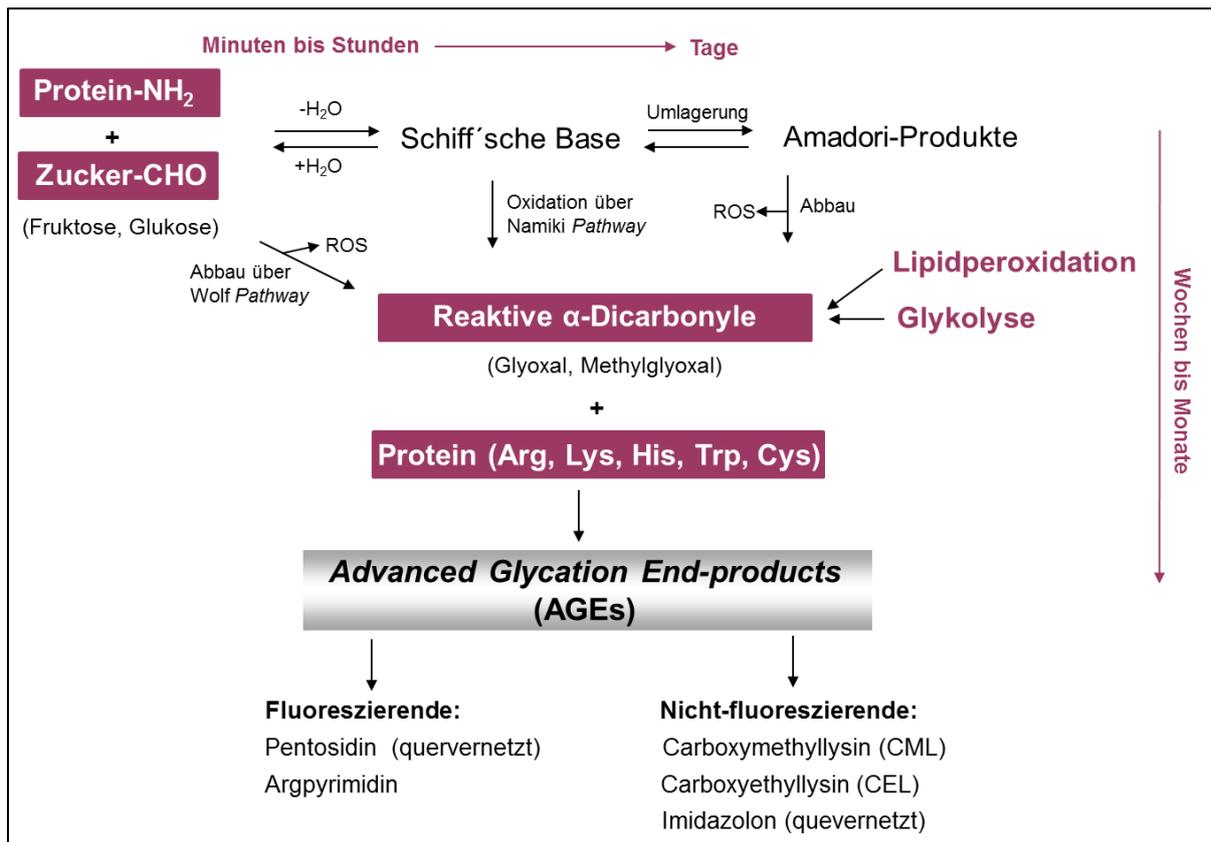


Abbildung 2: Darstellung der AGE-Bildung durch die nicht-enzymatische Glykierungs-/Maillard-Reaktion

Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften wie Fluoreszenz und Ausbildung von quervernetzten Strukturen werden AGEs in verschiedene Gruppen klassifiziert (Abb. 2). Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften werden AGEs auch in nicht-toxische (CML, Pentosidin) und toxische (Glyceraldehyd- und Glycolaldehyd-Derivate) AGEs eingeteilt (Sato *et al.*, 2006).

Bevorzugt findet man AGE-Modifikationen an langlebigen Proteinen wie den Strukturproteinen. So konnte eine altersabhängige Akkumulation von AGEs in Kollagenen in unterschiedlichen Geweben wie z.B. Knorpelgewebe oder Linsenmatrix (Lyons *et al.*, 1991; Dyer *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 2000; Verzijl *et al.*, 2000a) nachgewiesen werden. AGE-Modifikationen von Kollagenen bewirken, dass diese zunehmend resistenter gegenüber enzymatischem Abbau sind (Bakerman, 1962; Hamlin *et al.*, 1978; Rolewska *et al.*, 2013). AGEs induzierte pathologische Quervernetzungen von Kollagenen führen zudem zu einer erhöhten Starrheit der Proteinmatrix, was eine verringerte Elastizität des Gewebes zur Folge hat (Reddy, 2004; Avery & Bailey, 2006). Letzteres spielt eine große Rolle bei der Alterung von Haut und Gefäßen und so vermutlich auch der Lunge (Yamauchi *et al.*, 1987; Avery & Bailey, 2005; Goh & Cooper, 2008). Neben der Akkumulation AGE-modifizierter Proteine in der Zelle, deren Funktion und Lebensfähigkeit dadurch beeinträchtigt sein kann, hat auch die extrazelluläre Akkumulation AGE-modifizierter

Proteine einen Einfluss auf die Adhäsion von Zellen (Paul & Bailey, 1999; McCarthy *et al.*, 2001; Obrenovich & Monnier, 2005).

Die Wirkung von AGEs erfolgt nicht nur durch die Beeinflussung von Proteinen in ihrer intra- oder extrazellulären Funktion, sondern AGEs können auch über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren direkt Signalwege in der Zelle induzieren. Der am besten untersuchte Zelloberflächenrezeptor für AGEs ist der *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE). RAGE ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, bindet neben AGEs auch weitere Liganden (Bierhaus *et al.*, 2005; Yonekura *et al.*, 2005). Obwohl RAGE besonders stark im Lungengewebe exprimiert wird (Brett *et al.*, 1993), ist seine Lungen-spezifische Wirkung bisher kaum verstanden (Buckley & Ehrhardt, 2010). Die Bindung von AGEs an RAGE führt zur Aktivierung von NADPH-Oxidasen, was eine gesteigerte Produktion von ROS als Folge hat (Wautier *et al.*, 2001). Neben RAGE sind weitere AGE-bindende Rezeptoren identifiziert worden, zu denen der AGE-R1 (Oligosaccharyltransferase OST-48), AGE-R2 (80K-H Phosphoprotein), AGE-R3 (Galektin-3) sowie die Scavenger Rezeptoren der Klasse A und B (CD36, Srb1) (Li *et al.*, 1996; Barondes *et al.*, 1994; Ohgami *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2014) zählen. Als intrazelluläre Signalwege bzw. -moleküle konnten beispielsweise die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 (Huttunen *et al.*, 2002) und p38 (Taguchi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2004) sowie Stress-aktivierte Proteinkinase/c-Jun-NH₂-terminaler Kinase (SAPK/JNK), als auch Januskinase/*signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT) (Huang *et al.*, 2001; Bierhaus *et al.*, 2005) nachgewiesen werden, die entweder durch RAGE oder eine der anderen AGE-Rezeptoren induziert worden sind. Besonders häufig wird die Aktivierung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) Transkriptionsfaktors durch AGEs mit oder ohne direkten Nachweis eines AGE-bindenden Rezeptors beschrieben (Lu *et al.*, 2004; Bierhaus *et al.*, 2006). Weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB sind nicht beschrieben.

2.4. Das cAMP response element-binding protein (CREB)

Das *cAMP response element-binding protein* (CREB) wurde 1987 von Montminy und Bilezikjian als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Transkription von Genen in Abhängigkeit von cAMP vermittelt (Montminy & Bilezikjian, 1987). CREB ist ein hochkonserviertes Protein, das von *Drosophila melanogaster* bis zu den Säugetieren vorkommt. CREB wird ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert. Seine Funktion ist bisher am besten im Nervensystem erforscht, wohingegen zur Lunge nur wenige Erkenntnisse vorliegen. Aufgrund der Sequenzhomologie wird CREB mit dem *cAMP response element modulatory protein* (CREM) (Jenden *et al.*, 1996) und dem *activating transcription factor 1* (ATF1) zur CREB/ATF-Familie zusammengefasst, die

wiederum zu einer Unterfamilie von Leucinzipper-Proteinen mit Leucin-reichen DNA-Bindungsdomäne/n (bZIP) gehören (Hoeffler *et al.*, 1988; Foulkes *et al.*, 1991).

2.4.1. Proteinstruktur und Isoformen von CREB

CREB hat ein Molekulargewicht von 43 kDa und besteht aus mehreren funktionellen Domänen. Zentral befindet sich eine *kinase inducible domain* (KID) (Mizuuchi *et al.*, 1994), die 60 Aminosäure umfasst und von zwei glutaminreichen Regionen (Q1 und Q2) flankiert ist (Abb. 3) (Brindle *et al.*, 1993; de Groot *et al.*, 1993). Die KID-Region ist reich an Serinresten und enthält neben einer Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Phosphorylierungsstelle auch Phosphorylierungsstellen für andere Proteinkinasen. Am carboxy-terminalen Ende von CREB liegt die bZIP-Domäne, die amino-terminal von einer basischen Region flankiert ist (Abb. 3). Über die bZIP-Domäne bindet CREB dann als Homodimer an eine spezifische Sequenz in der DNA, die als *cAMP response element* (CRE) bezeichnet wird (Gonzalez *et al.*, 1989). CRE ist eine palindromische DNA-Sequenz bestehend aus den 8 Basen TGACGTCA (Montminy *et al.*, 1986). Zudem gibt es abweichende CRE-Sequenzen, zu denen die halb palindromische Sequenz CGTCA zählt (Fink *et al.*, 1988; Schumacher *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2001).

CREB kann auch als Heterodimer mit ATF1 oder CREM an CRE-Sequenzen binden, in der Regel mit geringerer Affinität (Foulkes *et al.*, 1991; Hurst *et al.*, 1991). Die DNA-Bindungsstärke von CREB als Homodimer oder Heterodimer mit ATF1 bzw. CREM ist zudem durch andere Faktoren bestimmt. Dazu zählen die Anzahl der CRE-Bindungsstellen und das Vorhandensein von essentiellen Kofaktoren (Deleage *et al.*, 1987; Hurst *et al.*, 1990).

Humanes und murines CREB wird durch das Gen CREB1 kodiert, welches sich aus 11 Exonen zusammensetzt. Das humane CREB-Gen ist zu 99 % identisch mit dem murinen CREB-Gen (Berkowitz & Gilman, 1990; Ruppert *et al.*, 1992). Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen von CREB, die als Aktivatoren oder Repressoren direkt/indirekt wirken können (Delmas *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996). Die nicht funktionellen Isoformen bilden untereinander oder mit den funktionellen Isoformen Dimere (Molina *et al.*, 1993). Bei der Bindung an die DNA können diese die funktionellen Isoformen von der DNA verdrängen. Bisher sind nur drei Isoformen beschrieben, die zu funktionellen Proteinen führen. Diese werden CREB Δ , CREB α und CREB β genannt (Abb. 3). Alle drei Formen werden in den meisten somatischen Zellen von adulten Säugern ubiquitär exprimiert (Ruppert *et al.*, 1992). CREB Δ ist die am häufigsten vorkommende Isoform und wird dreimal höher als CREB α exprimiert, wobei CREB β ca. 15 % aller translatierten Isoformen ausmacht (Blendy *et al.*, 1996). CREB α (341 Aminosäuren) enthält zwischen den Q1- und KID-Domänen eine 14 Aminosäuren große Region (α -Peptid). Abgesehen

von 40 fehlenden Aminosäuren am Aminoterminus, ist die CREB β (287 Aminosäuren) Isoform identisch mit CREB Δ (327 Aminosäuren) (Blendy *et al.*, 1996; Lonze & Ginty, 2002).

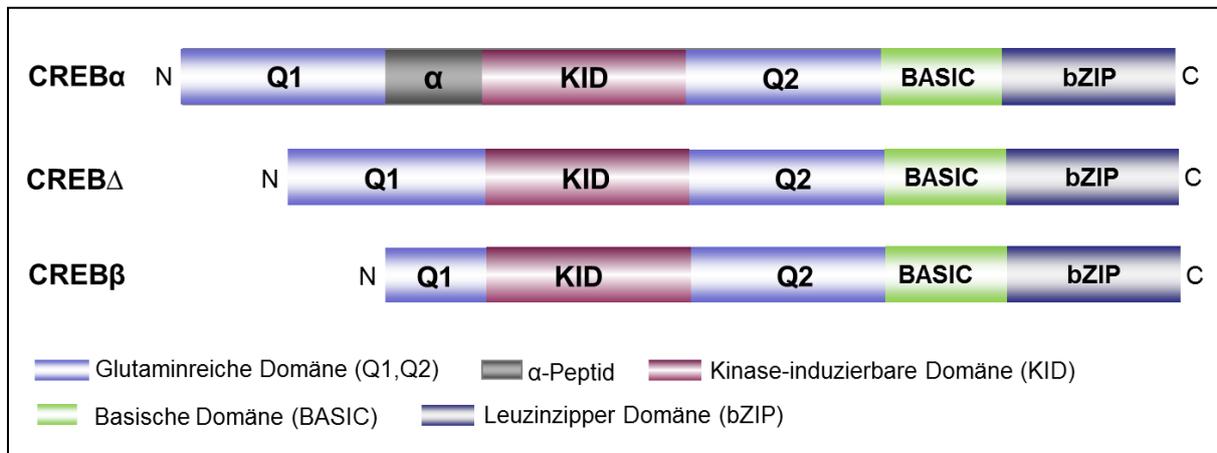


Abbildung 3: Funktionelle Domänen und Isoformen von humanem und murinem CREB

2.4.2. Aktivierung von CREB

Bisher wurden über 300 verschiedene Stimulanzen identifiziert, die abhängig oder auch unabhängig von cAMP zur Aktivierung von CREB führen. Dazu zählen verschiedene Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren. Die klassische CREB-Aktivierung erfolgt mittels Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA), aber auch andere Kinasen können CREB durch Phosphorylierung aktivieren (Johannessen *et al.*, 2004). Dazu zählen die Proteinkinase C (PKC), Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMKI, II und IV), Ras-abhängige Proteinkinasen (RSK1 und 2) sowie die p70 S6-Kinase (Johannessen *et al.*, 2004).

Die meisten Stimulanzen führen durch cAMP-Anstieg zur CREB-Aktivierung. Dieser bewirkt die Aktivierung der PKA. Dabei wird die katalytische C-Untereinheit der PKA freigesetzt, die dann in den Zellkern transloziert und dort CREB in der KID-Region am Serin133 phosphoryliert (Abb. 4). Die Phosphorylierung von CREB am Ser-133 ist essentiell für die PKA-vermittelte CREB-Aktivierung, da die Mutation dieses Serins zum Alanin die Aktivierung von CREB durch PKA verhindert (Gonzalez & Montminy, 1989). Andere Kinasen hingegen wie CAMK II oder CaMK IV phosphorylieren CREB am Serin-142, -143 oder -63 (Sun *et al.*, 1994). Zudem ist die Aktivierungsdomäne Q2 wichtig für eine vollständige Transaktivierung von CREB, da deren Deletion zu einer verringerten CREB-Aktivität durch die PKA führen kann (Brindle *et al.*, 1993). Infolge der Phosphorylierung am Ser-133 interagiert die Q2-Domäne mit dem Faktor TAF $_{II}$ 130/135, was eine Konformationsänderung von CREB zur Folge hat (Quinn, 2002) (Abb. 4). TAF $_{II}$ 130/135 ist Bestandteil des TF $_{II}$ D-Komplexes, welcher aus dem TATA-binding

protein (TBP) und weiteren mit TBP-assoziierten Faktoren(TAFs) besteht (Nakajima *et al.*, 1997; Saluja *et al.*, 1998).

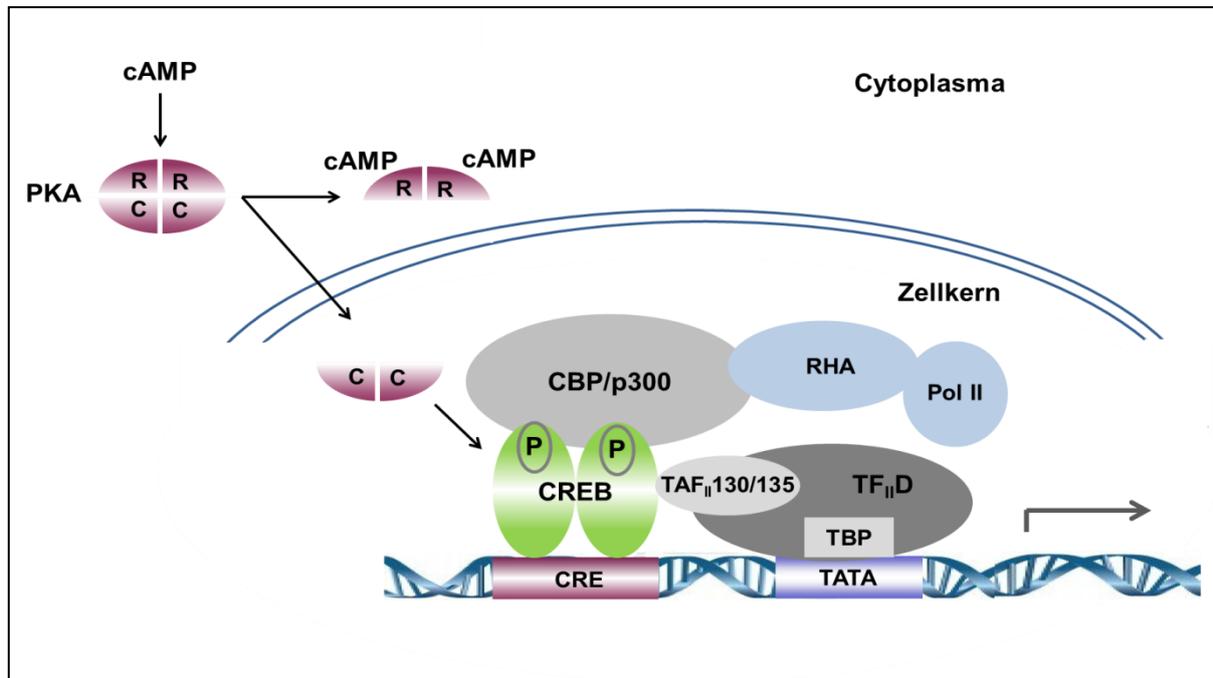


Abbildung 4: Schematische Darstellung der klassischen CREB-Aktivierung durch PKA und Bildung des Transkriptionsaktivierung-Komplexes Der intrazelluläre cAMP-Anstieg bewirkt die Freisetzung der katalytischen Untereinheit (C) der PKA, die im Zellkern CREB phosphoryliert. Durch die schrittweise Rekrutierung verschiedener Koaktivatoren, wie CBP/p300, TAF_{II}D-Komplex mit TAF_{II}130/135 sowie RNA-Helikase A (RHA) mit Polymerase II, erfolgt die Bindung des aktivierten CREB-Homodimers an CRE in der Promotorregion vieler Gene, was dann zur Transkriptionsaktivierung führt. (modifiziert nach Mayr and Montminy *et al.*, 2001)

Die Ser-133-Phosphorylierung von CREB bewirkt auch die Bindung weiterer Koaktivatoren wie dem CREB binding protein (CBP) und der Histonacetyltransferase p300 (Kwok *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1996). CBP interagiert dabei mit der RNA-Helikase A, die den RNA-Polymerase II-Komplex bindet. Damit assoziiert ist auch die Histonacetyltransferase, die die Acetylierung von Histonen erhöht (Kee *et al.*, 1996). Dadurch wird die Chromatinstruktur aufgelockert und die Bindung des Transkriptionsapparates an die DNA ermöglicht. Interessanterweise führt nicht jede Phosphorylierung von CREB auch zu seiner Aktivierung. Dies ist für bestimmte Substanzen bzw. Bedingungen wie Serum, Dibutyryl cAMP, Hypoxie oder TGF- β *in vitro* gezeigt worden (Bonni *et al.*, 1995; Johannessen *et al.*, 2004). Andererseits kann CREB auch mit den *transducer of regulated CREB activity coactivators* (TORC) 1, 2 und 3 interagieren (Conkright *et al.*, 2003). Wie bei anderen Transkriptionsfaktoren auch ist für die CREB-DNA-Interaktion die intrazelluläre Konzentration an Magnesium wichtig, das am Lys-304 bindet und dadurch die Bindung des CREB-Transkriptionsfaktorkomplexes an die DNA stabilisiert (Dwarki *et al.*, 1990; Schumacher

et al., 2000). Je höher die Magnesium Konzentration ist, desto mehr CREs werden besetzt (Craig *et al.*, 2001).

Die Phosphorylierung von CREB und somit die Transkriptionsaktivierung seiner Zielgene sind zeitlich limitiert, denn CREB wird durch Serin-Threonin-spezifische Proteinphosphatasen wieder dephosphoryliert. Zu diesen Proteinphosphatasen zählt die *protein phosphatase 1* (PP-1) und die PP-2, welche CREB 30-mal effizienter als PP-1 dephosphoryliert (Hagiwara *et al.*, 1992; Wadzinski *et al.*, 1993). Zudem kann CREB durch die Tyrosin-spezifische Phosphatase 1B (PTP-1B) indirekt dephosphoryliert werden (Gum *et al.*, 2003).

2.4.3. Posttranskriptionelle Regulation von CREB

CREB wird sowohl transkriptional als auch posttranskriptional auf mRNA- und Proteinebene reguliert. Auf mRNA-Ebene spielt die Regulation durch kleine, nicht kodierende micro-RNAs (miRNA) eine wichtige Rolle. Diese erzielen ihre Wirkung durch das Binden an die 3' untranslatierte Region (UTR) ihrer Ziel-mRNA. Das führt entweder zur mRNA-Degradierung oder zur Inhibition der Translation und dadurch zur Reduktion der Menge an Ziel-Protein (Ambros, 2004). In diesem Zusammenhang konnte in leukämischen Zellen gezeigt werden, dass die miRNA-34b an die 3' UTR der CREB mRNA bindet, was die Inhibition der CREB-Translation zur Folge hat (Pigazzi *et al.*, 2009). Auch die Überexpression von miRNA-155 in Präadipozyten der Maus führt zur Reduktion des CREB-Proteingehalts (Liu *et al.*, 2011). Zudem sind andere miRNAs identifiziert worden (miRNA-1, miRNA-28-A und miRNA-296-3p), die CREB-mRNA potentiell binden, aber deren Einfluss auf den CREB mRNA-Gehalt sind noch unklar (Leone *et al.*, 2011).

Auf Proteinebenen wird CREB durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) reguliert. Durch das UPS werden Proteine in zwei Schritten degradiert, dabei wird das Protein zunächst durch kovalente Bindung einer poly-Ubiquitinkette markiert und dann erfolgt die Degradation durch das 26S Proteasom erfolgt (Ciechanover, 1998). Der Ubiquitin-abhängige Proteinabbau dient dem Recycling und dem Entfernen gealterter bzw. abnormaler oder fehlgefalteter Proteine in der Zelle (Schubert *et al.*, 2000). Des Weiteren spielt das UPS eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription, da es sowohl die Konzentration von Transkriptionsaktivatoren bzw. Transkriptionsfaktoren als auch Repressorproteinen reguliert (Lipford & Deshaies, 2003). So konnte auch die Polyubiquitinierung von CREB und dessen Proteasom-regulierter Abbau in mehreren Studien gezeigt werden (Taylor *et al.*, 2000; Garat *et al.*, 2006; Costes *et al.*, 2009).

2.4.5. Physiologische Rolle von CREB

CREB aktiviert die Expression einer Vielzahl von Genen, deren Genprodukte eine Rolle bei Metabolismus, Transkription, Neurotransmission, Zellzyklus, Zellüberleben, Transport und Zellstruktur während der Embryonalentwicklung und postnatal spielen (Mayr & Montminy, 2001). Bisher konnten mehr als 4 000 potentielle Zielgene von CREB identifiziert werden, die ein CRE in ihrer Promotorregion enthalten (Zhang *et al.*, 2005). Am besten wurde die Funktion von CREB und seinen Isoformen mithilfe von *knockout*-Mäusen untersucht. Einzelne oder mehrere CREB-Isoformen wurden durch homologe Rekombination in der Maus ausgeschaltet. Bei den CREB $\alpha\Delta$ knockout-Mäusen, bei denen die funktionellen CREB-Isoformen α und Δ fehlen, wird kompensatorisch die Expression von CREB β und CREM im Gehirn stark hochreguliert. Dies dürfte ein Grund sein, warum diese Tiere den gleichen Phänotyp wie die Wildtyp-Tiere zeigen. Dennoch sind bei diesen Mäusen funktionelle Unterschiede im Lernverhalten und Erinnerungsvermögen zu beobachten (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1998). CREB *null*-Mäuse, bei denen alle drei funktionellen CREB-Isoformen inaktiviert werden, zeigen ebenfalls eine vermutlich kompensatorische Hochregulation von CREM. Trotz des erhöhten CREM-Gehaltes sterben diese Mäuse innerhalb von 15 Minuten nach der Geburt an einer Atelektase der Lunge (Rudolph *et al.*, 1998). Dieser Befund deutet auf eine essentielle Rolle von CREB bei der Lungenentwicklung hin. Neben den pulmonalen Veränderungen weisen diese Tiere eine Verkleinerung bestimmter Hirnstrukturen sowie eine gestörte T-Zellentwicklung auf (Rudolph *et al.*, 1998).

Neben den *knockout*-Tier/Mausmodellen weisen auch transgene Tiermodelle auf eine entscheidende Rolle von CREB für das Überleben verschiedener Zelltypen hin. So führt die Überexpression von dominant negativem CREB α zum Zwergenwuchs, was auf eine Hemmung der Chondrozyten-Proliferation zurückzuführen ist (Ionescu *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2001). Des Weiteren induziert die Überexpression von dominant negativem CREB α verstärkt Apoptose *in vivo* (Bonni *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 1999). Zellulär spielt CREB eine wichtige Rolle bei der Gluconeogenese und der Hypoxieregulation (Quinn & Granner, 1990; Liu *et al.*, 1991; Herzig *et al.*, 2001; Kronke *et al.*, 2003; Abramovitch *et al.*, 2004; Chiueh *et al.*, 2005; St-Pierre *et al.*, 2006).

Über die physiologische Rolle von CREB in der Lunge ist im Vergleich zu anderen Organen relativ wenig bekannt. Dennoch weisen auch hier einige Studien auf eine wichtige Rolle von CREB in der Lunge hin. So fördert die permanent erhöhte CREB-Aktivierung in Tumoren der Lunge deren Progression via Stimulation von Proliferation und Apoptoseresistenz (Abramovitch *et al.*, 2004; Al-Wadei *et al.*, 2005; Linnerth *et al.*, 2005). In mehreren Lungenzellen konnte auch die CREB-Aktivierung durch Serum, Ethanol und Adenosin nachgewiesen werden, was

nachfolgend die Fibronectin-Expression stimuliert. Eine abnormal gesteigerte Fibronectin-Expression verursacht nachteilige morphologische Veränderungen der Lunge (Michaelson *et al.*, 2002; Roman *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2006).

3. Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor CREB spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der Alterung des Organismus. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-vermittelte Stimulation von CREB die Lebensdauer des Nematoden *C. elegans* verlängert (Mair *et al.*, 2011). Ferner wiesen Gewebeuntersuchungen an Gehirnen sowie Aorten geringere Gehalte an totalem und/oder aktiviertem CREB in alten Ratten und/oder Mäusen nach. Da aber der konkrete Beitrag von CREB bei der Alterung von Organen und speziell der Lunge noch unbekannt ist, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Alterns auf die Expression und Aktivierbarkeit des Transkriptionsfaktors CREB in der Lunge untersucht und potentielle Regulationsmechanismen sowie Auswirkungen herausgearbeitet werden. Die Thematik sollte sowohl *in vivo* im Mausmodell als auch *in vitro* mittels Kulturen humaner Lungenfibroblasten oder Alveolarepithelzellen beleuchtet werden.

4. Material

4.1. Chemikalien

Aceton (C ₃ H ₆ O)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Acrylamid/Bisacrylamid (40 % w/v) (C ₃ H ₅ NO; C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	Serva, Heidelberg
Agarose (C ₁₂ H ₁₈ O ₉)	Biozym, Oldendorf
Amidoschwarz (C ₂₂ H ₁₄ N ₆ Na ₂ O ₉ S ₂)	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS) (H ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	Serva, Heidelberg
Annexin-V Fluos	Roche, Sigma, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) (C ₁₄ H ₁₅ BrClN)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Bio-Rad, München
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ ×2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Chloromin T-Trihydrat (CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂ NCINa×3H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau G 250 (C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂)	Merck, Darmstadt
Collagen A	Biochrom, Berlin
Diaminobenzidin (DAB) (C ₁₂ H ₁₄ N ₄ × 4HCl)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC) (C ₆ H ₁₀ O ₅)	Sigma, Taufkirchen
4-Dimethylaminobenzaldehyd (CH ₃) ₂ NC ₆ H ₄ CHO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylformid (C ₃ H ₇ NO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO) (C ₂ H ₆ OS)	Serva, Heidelberg
DL-Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenmarker (<i>Gene Ruler</i> TM 100bp DNA Ladder Plus, <i>Gene Ruler</i> TM 1kb DNA Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix, 10 mM	Promega, Mannheim
D-Ribose (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>ECL Plus Blotting Detection-System</i>	Amersham, Braunschweig
Ethanol (99,8 %) (C ₂ H ₆ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ H ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Serva, Taufkirchen
Essigsäure (100 %) (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung (≥36,5 %) (CH ₂ O)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Glycergel [®] -Eindeckmedium	Dako, Cambridgeshire, UK

Glycerin (C ₃ H ₈ O)	Roth, Karlsruhe
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva, Heidelberg
Glyoxal (C ₂ H ₂ O ₂)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Trans-4-Hydroxy-L-prolin (≥99 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histomount-Eindeckmedium	National Diagnostics, USA
2-Propanol-(C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Kaliumferricyanid (K ₃ [Fe[CN] ₆])	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumferrocyanid (K ₄ [Fe[CN] ₆]×3H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Luminol-Reagenz	Santa Cruz, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ×6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Methanol (CH ₄ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-MLV Reverse Transkriptions-Puffer	Promega, Mannheim
3-Morpholinostyrol (SIN-1) (C ₆ H ₁₀ N ₄ O ₂ ×HCl)	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Mowiol®-Eindeckmedium	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumdesoxycholat (DOC) (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P40	AppliChem, Darmstadt
Okadainsäure (C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃)	Merck-Calbiochem, Darmstadt
Oligo(dT)15-Primer	Promega, Mannheim
Orange G	Merck, Darmstadt
PCR-Mastermix	Promega, Mannheim
Perchlorsäure (70 %) (HClO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S (C ₂₂ H ₁₂ N ₄ Na ₄ O ₁₃ S ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1-Propanol (≥99,5 %) (C ₃ H ₈ O)	Roth, Karlsruhe

Propidiumjodid (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Proteinmolekulargewichtsmarker (<i>Magic Mark</i> TM XP) (<i>Page Ruler</i> TM <i>Prestained Protein Ladder</i>) <i>Random-Primer</i>	Invitrogen, Karlsruhe; Fermentas, St. Leon-Rot Promega, Mannheim
Salzsäure (37 %) (HCl)	Merck, Darmstadt
Sepharose Protein G 4 Fast Flow	Amersham, Braunschweig
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) (C ₆ H ₁₆ N ₂)	AppliChem, Darmstadt
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100 (C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _{n=9-10})	Roth, Karlsruhe
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Universitätsapotheke, Halle
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Serva, Heidelberg

4.2. Enzyme

Benzonase	Novagen-Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H(-)	Promega, Mannheim
Pepsin (aus <i>Porcine gastric mucosa</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
RQ1 RNase-freie DNase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

4.3. Kits

BCA TM Protein Assay-Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>BigDye</i> [®] Terminator v1.1 <i>Cycle Sequencing</i> -Kit	Applied Biosystems, Warrington, UK
<i>GoTaq</i> [®] <i>qPCR Master Mix</i> -Kit	Promega, Mannheim
<i>MinElute Gel Extraction</i> -Kit	Qiagen, Hilden
<i>Oligofectamine</i> TM -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
<i>QuantiTect SYBR</i> [®] <i>Green PCR</i> Kit	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep</i> -Kit	Qiagen, Hilden
<i>RNase-Free DNase</i> -Set	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini</i> -Kit	Qiagen, Hilden

4.4. Zellkulturchemikalien

Dulbecco's Modifiziertes <i>Eagle Medium</i> (DMEM), <i>High Glucose</i>	Invitrogen, Karlsruhe
epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Creative-Biolabs, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PB Perbio, Bonn
Forskolin	Calbiochem, Darmstadt
Opti-MEM® I	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (PS) 100×	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung 10×	Invitrogen, Karlsruhe

4.5. Geräte

Autoklav Systec V95	Systec GmbH, Wettenberg
Bakterienschüttler: Certomat® H	Brau Biotech International, Melsungen
Blot-Apparatur: Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Brutschränke: Hera cell	Heraeus-Instruments, Hanau
Elektrophorese: Sub-Cell GT (DNA)	Bio-Rad, München
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies, Offenburg
Feinwaage Sartorius BP210S	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage Sartorius portable	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage Sartorius TE1502S	Sartorius AG, Göttingen
Detektionssystem: LAS-3000 <i>imaging system</i>	Raytest, Straubenhardt
DNA-Mikroarray-Scanner	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Dot-Blot-Apparatur: Minifold Spot-Bloteinheit	Schleicher & Schuell, Düren
GeneChip Fluidics Station 400	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Heizplatte: Leica HI 1220	Leica, Nussloch
PCR-Gerät: Gene Amp® PCR system	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Gerät: iCycler Optical Module	Bio-Rad, München
PCR-Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät: TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Probenschüttler: Polymax 1040	Heidolph Instruments, Kelheim
Probenschüttler: KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Reinstwasseranlage Milli-Q® Biocel	Millipore, Schwalbach
Konzentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer: IKAMAG® REO	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop: Axiovert 200M	Carl Zeiss Microimaging, Göttingen
Mikroskop: Nikon Eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf

Mikrotom: Leica RM 2125RT	Leica, Nussloch
Sterilbank: Hera cell	Heraeus-Instruments, Hanau
Spannungsquelle: Power Pack 200	Bio-Rad, München
Spektrophotometer: NanoDrop™ 1000	PreqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischabzug: Captair	Erlab, Köln
Ultraschall-Gerät: Sonorex Digital 10P	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Ultra-Turrax: IKA	IKA Labortechnik, Staufen
UV-Bank	Biometra, Göttingen
Wasserbad: MEDAX	MEDAX GmbH& Co KG, Neumünster
Wasserbad: TYP 1008	GFL, Burgwedel
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zellhomogenisator: Minihomogenisator	Kontes, USA
Zellmessgerät: Casy® Cell Counter	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge: Biofuge fresco-/ stratos	Heraeus-Instruments, Hanau
Zentrifuge: Varifuge 3.OR	Heraeus-Instruments, Hanau

4.6. Software

Aida V.3.51	Raytest, Straubenhardt
Endnote 7.0	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
Gene Runner	Hastings Software
GeNorm	http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/
Literaturrecherchen	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
MetaMorph	Visitron Systems, Puchheim
Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA
Primer 3 v.0.4.0	Whitehead Institute, Cambridge, USA
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath

4.7. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen bzw. Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, USA) bezogen (Tab. 3). Zudem wurden Lungenfibroblasten (LuFi) verwendet, die zuvor aus dem Normallungenbereich des entnommenen Lungensegments von Patienten mit Lungenkrebs (Klinik und Poliklinik für Herz-und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Halle (Saale)) gewonnen und kryokonserviert worden sind. Die Nutzung von humanem Gewebematerial zu Forschungszwecken wurde von der Ethikkommission genehmigt (Medizinische Fakultät, Halle (Saale)).

Tabelle 3: Verwendete adhärente Zelllinien und primäre Zellen

Humane Zellen	ATCC-Nummer	Ursprung
A549	CCL-185	Adenokarzinom der Lunge (Zelllinie)
NCI-H358	CRL-5807	Adenokarzinom der Lunge (Zelllinie)
WI-38	CCL-171	embryonale Lungenfibroblasten (Primärzellen)
LuFi		adulte Lungenfibroblasten (Primärzellen)

4.8. Mäuse

Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten C57Bl/6NCr1-Mäuse wurden von Charles River WIAG GmbH (Sulzfeld) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit 23 °C Lufttemperatur, 60 % Luftfeuchte und einem künstlich erzeugten 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus. Für die Untersuchungen wurden drei Altersgruppen von Mäusen benutzt (Tab. 4). Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBI. I S. 1206, 1313; 2006) nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission (MLU Halle (Saale)).

Tabelle 4: Basisdaten der Versuchstiere

Altersgruppen	C57Bl/6-Mäuse		
	jung	adult	alt
Anzahl (n)	24	23	21
Alter (Monate)	5-6	12-15	25-34
Geschlecht (weiblich/männlich)	12/12	10/13	10/11
Gewicht (g)	20-33	25-38	26-34

4.9. Primer

Die verwendeten Primer wurden mit der Online-Software Primer 3 oder der Software Gene Runner generiert (Tab. 5).

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Primer

Gen	5'-3'-Sequenz	Genbank-nummer	Spezies	Produkt-Größe (bp)	Annealing-Temp. (°C)
ATXN1	se: CAACATGGGCAGTCTGAG as: AACTGGAAATGTGGACGTAC	NM_000332	H	211	60
ATP5A1	se: TATGCGGGTGTACGGGGTTATCTT as: TGAGCTTTCGCTCTGACTGTTCTG	NM_007505	M	157	60
β-Actin	se: GAAGTGTGACGTGGACATCCG as: AGCATTTGCGGTGGACGAT	NM_001101	H	290	58
CBP	se: ATCCCATAGACCCAGTTCC as: GAGGCGCTGCTGTAGGTATC	NM_001025432	M	327	56
COL I α2	se: CCAGCGAAGAAGTCCATACAGC as: AATGTCCAGAGGTGCAATGTC	NM_007743	M	414	56
COL III α1	se: TGGTATGAAAGGACACAGAGGC as: TCCAACCTTCACCCTTAGCACC	NM_009930	M, H	283	56
COL IV α1	se: GGGAGCATGAAGGGACAGAA as: AGGCACACCTTTTTCTCCAG	NM_009931	M	255	55
CREB	se: CATTGCCCTGGAGTTGTTATG as: TCTACGACATTCTCTTGCTGCCTC	NM_009952	M	124	60
CREB	se 1: AGCGGAGTGTGGTGAGTGAC as 3: CCTTCGCTTTTGGGAATCAG	NM_134442	H	512	55
CREB	se 4: CAGATTGCCACATTAGCCCAG as 3: CCTTCGCTTTTGGGAATCAG	NM_134442	H	280	55
CREM	se: AGGAAGAAGGGACACCACCT as: TCTGCTAGTTGCTGGGACT	NM_013498	M	229	56
CYC1	se: CCAGGTATACAAGCAGGTGTGCTC as: CATCATTAGGGCCATCCTGGAC	NM_025567	M	140	60
GAPDH	se: GACCACAGTCCATGCCATCAC as: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	NM_002046	M, H	453	60
IGFBP3	se: TCCAGGAAATGCTAGTGAGTCGGAG as: CTGCTCTGCATGCTGTAGCAGTGC	NM_31159	H	475	58
IGFBP3	se: AATGGCCGCGGTTCTGC as: TTCTGGGTGTCTGTGCTTTGAG	NM_008343	M	268	60
MMP-2	se: CCCTCAAGAAGATGCAGAGTT as: CCATCAAACGGGTATCCATC	NM_008610	M	340	56
MMP-3	se: ACCGGATTTGCCAAGACAGAGTG as: GCATCTCCATTAATCCCTGGTCC	NM_010809	M	218	56
MMP-9	se: AGACGACATAGACGGCATCC as: ATTGTCTGCCGACTCAAAG	NM_013599	M	298	61

MATERIAL

Myko	se: YGCCTGRGTAGTAYRYWCGC as: GCGGTGTGTACAARMCCCGA		M, H, R	510	60
PVR	se: GACGTCGTCGTGCAGGCGCCCA as: CAGGCAGGTGTAGTTGCCTTCAT	NM_006505	H	290	60
RAB27A	se: ATGTCTGATGGAGATTATGATTACCT as: TCAACAGCCACATGCCCTTTCTCCTT	NM_004580	H	665	58
RAB27A	se: TTCCTCAATGTCCGAAACTGGAT as: ACCGTACCACTCCCTCCG	NM_023635	M	282	60
18s RNA	se: GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG as: AGGGCAGGGACTTAATCAACGC	NR_003286	M, H	345	60
Sumo3	se: AATGACCACATCAACCTG as: ACCTCCCGTCTGCTGCTGGAAC	NM_006936	H	236	58
Sumo3	se: GATTCGATTCCGGTTTGATG as: TTCGGTGACTCTGGCTTCTG	NM_019929	M	225	60
TET2	se: CAAATGGGACTGGAGGAAGT as: GTTTGCTGCTGTTCTTGCTT	NM_001127208	H	468	58
TET2	se: GTCAACAGGACATGATCCAGGAG as: AACGGGCTTCCATTCTGGAG	NM_001040400	M	214	60
TIMP-1	se: AGACCACCTTATAACCAGCGTTAT as: GATAGATAAACAGGGAACACTG	NM_011593	M, H	320	56
TIMP-2	se: CTGGACGTTGGAGGAAAGAA as: TCTCTTGATGCAGGCGAAG	NM_011594	M	285	56
TIMP-3	se: CCACGTGCAGTACATTCACAC as: CCAGGTGGTAGCGGTAATTG	NM_011595	M	194	56

se= sense; as = antisense; Spezies: M = Maus; H = Mensch; R = Ratte

5. Methoden

5.1. Zellbiologische Methoden

5.1.1. Kultivierung und Passagierung der adhärennten Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in 10-cm-Zellkulturschalen mit Standardmedium (DMEM, 10 % FCS, Penicillin [100 U/ml] /Streptomycin [100 µg/ml]) bei 37 °C in einer 10 %igen CO₂ Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert. Vor der Zellpassage wurde die Zellkultur mikroskopisch hinsichtlich der Morphologie beurteilt. Für die Passagierung der Zellen wurden diese mit 37 °C-warmen PBS gespült und mit einer Trypsin-EDTA Lösung (0,1 % (w/v) Trypsin-EDTA) in PBS für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden Zellzahl und Zellvitalität mit Hilfe des *Casy*[®] *Cell Counter*-Gerätes bestimmt und die vitalen Zellen in einer definierten Zellzahl auf eine neue 10-cm-Zellkulturschale umgesetzt.

PBS; pH 7,4

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM NaH₂PO₄
10 mM KH₂PO₄

5.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Stammkulturen wurden in Kryogefäßen über flüssigem Stickstoff (Siedepunkt: ca. 160 °C) gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryogefäß für wenige Minuten in 40 °C heißes Wasser gehalten. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml warmen Medium aufgenommen und abzentrifugiert (500 × g, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium gelöst und auf eine 10-cm-Zellkulturschale ausgesetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht, um die Zelltrümmer zu entfernen. Zur Kryokonservierung von bereits kultivierten Zellen wurden die Zellen wie unter 5.1.1. beschrieben abgelöst und in 10 ml Standardmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Zellzahlmessgerät bestimmt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden ca. 10⁶ Zellen in 500 µl eiskaltem Zellkulturmedium resuspendiert und mit Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) im Verhältnis von 1:1 verdünnt. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und das schrittweise Einfrieren erfolgte im *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene[®] Labware, Wiesbaden). Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte über flüssigem Stickstoff.

5.1.3. Mykoplasmentest

Alle verwendeten Zellkulturen wurden regelmäßig mittels PCR auf einen möglichen Befall mit Mykoplasmen kontrolliert. Dazu wurden 100 µl Überstand von einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale verwendet. Der Überstand wurde zuerst bei -20 °C eingefroren, zentrifugiert (5 min, 900 × g) und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Nach einer 1:10 Verdünnung wurde der Überstand in eine PCR (siehe 5.2.7.) mit einem spezifischen Primerpaar (Tab. 5) sowie einem internen DNA-Standard eingesetzt (Uphoff & Drexler, 1999). Anschließend wurde die PCR im 1 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und analysiert (siehe 5.2.8.).

5.1.4. Bestimmung der zellulären Seneszenz

Primäre humane Lungenfibroblasten altern *in vitro*, was insbesondere durch die Abnahme der Zellproliferation bei gleichzeitiger Zunahme des Zelltodes sowie durch die Expression der sauren β-Galaktosidase gekennzeichnet ist (Dimri *et al.*, 1995).

5.1.4.1. Die Wachstumskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik (kumulative Populationsverdopplung [KPD] per Zeit) wurden die Fibroblasten (WI-38, LuFi) in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro 10-cm-Zellkulturschale ($3,8 \times 10^4/\text{cm}^2$) ausgesetzt und aller 3 bis 4 Tage passagiert (siehe 5.1.1). Dabei wurden die Gesamtzellzahl und die Vitalität der Zellen aus zwei Parallelproben bestimmt. In jedem Experiment wurde überprüft, ob sich die untersuchten Zellen in Seneszenz befinden. Die hier verwendeten Fibroblasten sind nicht immortalisiert und unterliegen auch *in vitro* einem Alterungs- und Differenzierungsprozess. Der Grad der Differenzierung steigt mit der Anzahl der Teilungen. Die KPD wurden mit Hilfe der Gleichung 5 berechnet.

$$KPD_{neu} = KPD_{alt} + \frac{\ln \frac{N}{N_o}}{\ln 2} \quad (5)$$

KPD_{alt} : KPD der vorherigen Passage

N : Anzahl der vitalen Zellen

N_o : Anzahl der initial ausgesetzten vitalen Zellen

5.1.4.2. Nachweis der sauren β-Galaktosidase-Aktivität

Der Aktivitätsnachweis der sauren/SA-β-Gal erfolgte zytochemisch nach der Methode von Dimri *et al.*, 1995. Bei einer Expression der SA-β-Gal spaltet diese das Agylkon 5-Bromo-Chlorindol ab, welches oxidiert wird und im Zytosol blau gefärbte Präzipitate bildet. Dazu wurden die Fibroblasten auf Deckgläschen für 1-2 Tage kultiviert, mit PBS gewaschen und dann mit einer

PBS-gepufferten Lösung aus 2 % (v/v) Formaldehyd und 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS für 5 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit X-Gal-Färbelösung für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit Glycergel®-Medium eingebettet. Die Analyse der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch anhand der blauen Färbung des Zytoplasmas.

X-Gal-Färbelösung

- 1 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)
- 40 mM Zitronensäure
- 40 mM Na₃PO₄
- 150 mM NaCl
- 2 mM MgCl
- 5 mM Kaliumferrocyanid (K₄[Fe[CN]₆] × 3H₂O)
- 5 mM Kaliumferricyanid (K₃[Fe[CN]₆])

5.1.5. Zellversuche

Die verwendeten humanen Zellen (Tab. 3) wurden abhängig vom Versuch in verschiedenen Stadien des Wachstums untersucht. Für die Zellversuche während der logarithmischen Wachstumsphase (Subkonfluenz) wurden die Zellen in einer Dichte von $2,0 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesetzt und in FCS-haltigem Standardmedium kultiviert. Für konfluente Versuchsbedingungen wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesetzt. Nach Erreichen der Zellkonfluenz erfolgte für ausgewählte Versuche zuvor ein Serumentzug für 24 h (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammenstellung der Zellversuche und deren Zellkulturbedingungen

A: Subkonfluenz	B: Konfluenz	C: Konfluenz mit Serumentzug
<ul style="list-style-type: none"> - Wachstumsanalysen (5.1.4.1) - Transwell-Kokultur (5.1.5.3) - Inkubation auf AGE-modifiziertem Kollagen (5.1.5.4) - Transfektion mit siRNA (5.1.5.5) 	<ul style="list-style-type: none"> - Induktion von oxidativem Stress (5.1.5.2) - Zelltodanalysen (5.1.5.7) - RNA-Analytik (5.2.1; 5.2.3) - DNA-Mikroarray (5.2.12) - Protein-Analytik (5.3.2; 5.3.8) 	<ul style="list-style-type: none"> - CREB-Aktivierung (5.1.5.1)

5.1.5.1. CREB-Aktivierung

CREB wurde *in vitro* nach Serumentzug mit Forskolin aktiviert (10 μM, 10 min). Forskolin ist ein membrangängiger Stimulator der Adenylatzyklase, der via Erhöhung des cAMP-Spiegels und

Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung am Ser-133 führt (Gonzalez & Montminy, 1989). Als interne Kontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO), das zum Auflösen von Forskolin verwendet worden ist. Die Zellstimulation wurde mit Lysepuffer abgestoppt, und die Proteinlysate wurden weiter verarbeitet (siehe 5.3.2).

5.1.5.2. Induktion von oxidativem Stress in Zellen

Oxidativer Stress wurde durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; 0–200 μM für 48 h) oder 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1; 0–40 μM für 48 h) induziert. Wasserstoffperoxid ist ein langlebiges Oxidans, das zur Bildung der ROS wie Hydroxyl-Radikalen (HO^\bullet) beiträgt. SIN-1 setzt in wässrigen Lösungen sowohl NO als auch $^\bullet\text{O}_2^-$ frei, so dass es zur kontinuierlichen Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) und somit Lipidperoxidation kommt (Radi *et al.*, 1991).

5.1.5.3. Indirekte Zellkokultur

Das Modell der indirekten Kokultur wurde genutzt, um den Einfluss von Fibroblasten (WI-38, LuFi) auf die Expression von CREB in den A549-Zellen zu untersuchen (Abb. 5). Dazu wurden in einer 12-Wellplatte $2,0 \times 10^4$ A549-Zellen/ cm^2 ausgesetzt und nach 24 h zusätzlich ein Transwell-Insert (ThinCerts-TC Inserts; Greiner bio-one, Frickenhausen) mit konfluenten Fibroblasten auf einer porösen Membran (3 μm) in die Vertiefung gesetzt (Abb. 5). Nach 72-stündiger Kokultur wurden die Transwell-Inserts entfernt und die A549 Zellen mit Lysepuffer lysiert (siehe 5.3.2).

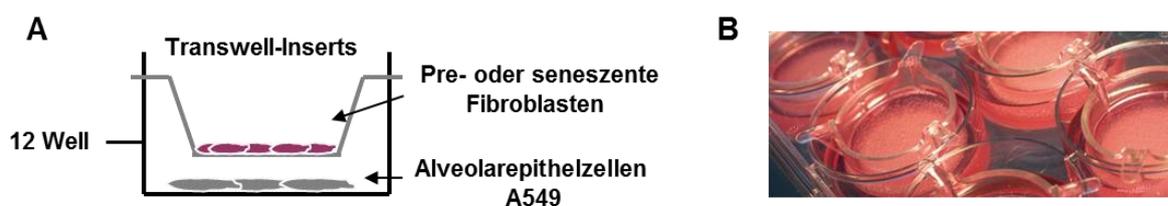


Abbildung 5: Transwell-Kokultur A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus B) Foto der ThinCert Transwell-Inserts 12-Well (Quelle: greinerbioone.com)

5.1.5.4. Gewinnung der extrazellulären Matrix von Fibroblasten

Die extrazelluläre Matrix (EZM) von präseneszenten und seneszenten Fibroblasten (WI-38 und LuFi) wurde nach dem Protokoll Queisser *et al.*, 2008 präpariert. Dazu wurden konfluente Fibroblasten mit 0,5 % (v/v) Triton-X 100 in PBS von der Zellkulturschale abgelöst und die auf der Schale verbleibende EZM in SDS-Lysepuffer (siehe 5.3.1) aufgenommen und mittels BCA-

Assay quantifiziert. Anschließend wurden A549-Zellen auf dieser Fibroblasten-EZM ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 72 h kultiviert.

5.1.5.5. Herstellung von AGE-modifiziertem Kollagen

Zur Herstellung von AGE-modifizierter EZM wurden $280 \mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen A (Biochrom, Berlin) mit 200 mM Ribose oder 20 mM Glyoxal für 4 Tage bzw. 20 mM Ribose oder 2 mM Glyoxal für 6 Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. Die AGE-Bildung wurde täglich nach steriler Entnahme kleiner Mengen im Vergleich zu Kollagenproben ohne Ribose oder Glyoxal überprüft (AGE-Messmethoden, siehe 5.4.3.1 und 5.3.10). Nach steriler Dialyse der Kollagenproben für 72 h wurden diese bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

5.1.5.6. Kultivierung/Behandlung von Zellen auf/mit AGE-modifiziertem Kollagen

Es wurden Zellen auf AGE-modifiziertem Kollagen kultiviert, um den Einfluss von AGE-modifizierter EZM auf adherente Zellen zu untersuchen. Dazu wurden 12-Wellplatten mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sterilem Kollagen mit und ohne AGE-Modifikationen über Nacht beschichtet. Anschließend wurden $2,0 \times 10^4/\text{cm}^2$ A549-Zellen oder $6,0 \times 10^5/\text{cm}^2$ NCI-H358-Zellen darauf ausgesetzt und unter Standardbedingungen für 72 h kultiviert.

5.1.5.7. Zelltodanalysen: Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung beruht auf der Tatsache, dass vitale Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, welche für Trypanblau impermeabel ist. Ist die Zellmembran jedoch geschädigt, kann der Farbstoff in das Zytosol eindringen und diese Zellen tiefblau anfärben. Für diese Färbung wurde eine Zellprobe von $100 \mu\text{l}$ mit $5 \mu\text{l}$ $0,4\%$ Trypanblau versetzt. Die Probe wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Anzahl der lebenden (ungefärbten) Zellen bestimmt.

5.1.5.8. siRNA-Transfektion humaner Zellen

Die *small interfering RNA* (siRNA) -Technik wurde angewandt, um die Expression von Genen zu unterdrücken (*knockdown*). Bei dieser Technik bringt man kurze, doppelsträngige (ds) RNAs oder RNA-DNA-Chimere mit einer Länge von 20 bis 23 Nukleotiden in die Zelle ein. Dies führt u.a. zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens und somit zur verminderten Proteinexpression (Meister & Tuschl, 2004). Die Transfektion humaner Zellen mit definierter siRNA (Tab. 7) erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenzes *Oligofectamine*TM (Invitrogen, Karlsruhe) in Opti-MEM[®] I-Medium nach Anleitung des Herstellers. Nach bis zu 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen für weitere Analysen verarbeitet. Die Effizienz des *knockdowns* wurde mittels Western Blot-Analysen untersucht (siehe 5.3.6).

Tabelle 7: Verwendete siRNAs

Humane siRNAs	Firma
CREB 1 (pre-design Chimera RNAi)	Abnova (Taipei, Taiwan)
Neito1 (pre-design Chimera RNAi; unspezifische siRNA als Kontrolle)	Abnova (Taipei, Taiwan)

Um den chronischen Einfluss des CREB *knockdowns* untersuchen zu können, wurden exemplarisch die WI-38-Fibroblasten mit CREB siRNAs transfiziert. Nach jeder Transfektion wurden die Zellen für 72 h inkubiert und anschließend wurden Wachstumskinetik (5.1.4.1) und Zelltod (5.1.5.7) bestimmt. Abbildung 6 zeigt eine schematische Übersicht über diesen Versuchsablauf.

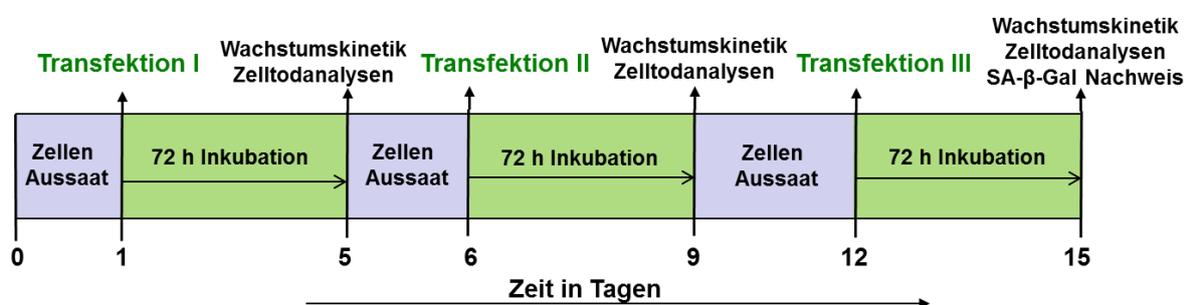


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Experimente zum chronischen CREB *knockdown* mittels siRNA Technik.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen

Die RNA-Isolation aus Zellen erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini-Kits* der Firma Qiagen. Die Zellen wurden in Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (RLT-Puffer) mit β -Mercaptoethanol (1 % Vol (v/v)) lysiert. Nach Bindung der RNA an die RNeasy-Säule wurde diese nach Anleitung des Herstellers gewaschen, potentielle DNA verdaut (*RNase-Free DNase-Set*) und mit 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert.

5.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Mauslungen erfolgte mit dem Trizol®-Reagenz. Dazu wurden ca. 50 mg Gewebe eingewogen, im gefrorenen Zustand mit Hilfe eines Hammers mechanisch in Alufolie pulverisiert und dieses in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol®-Reagenz überführt. Mittels eines Minihomogenisators wurde das Gewebe vollständig homogenisiert, anschließend abzentrifugiert (5 min, 10000 \times g) und der Überstand in ein neues

Gefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform/Isopropylalkohol (23:1) und 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (15 min, $7000 \times g$, 4 °C) in eine untere organische Phase, eine Interphase und eine wässrige obere Phase. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde abpipettiert, anschließend mit 500 µl Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und das Präzipitat abzentrifugiert (10 min, $7000 \times g$, 4 °C). Die pelletierte RNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, für ca. 5 min bei RT getrocknet und dann in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini*-Kits sowie deren Überprüfung wie unter 5.2.4 beschrieben.

5.2.3. Isolation von microRNA aus Zellen und Gewebe

MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 18-24 Nukleotiden. Die Isolation von miRNA aus Zellmaterial und murinen Lungengewebe erfolgte unter Verwendung des *RNA micro Isolation*-Kits (Bio & Sell, Feucht bei Nürnberg) nach den Angaben des Herstellers. Zur Isolation der miRNA wurden $2,0 \times 10^6$ Zellen oder ca. 20 mg mechanisch pulverisiertes Gewebe (siehe 5.2.2) verwendet.

5.2.4. Bestimmung der Konzentration, Reinheit und Qualität von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch. Dazu wurden je 2 µl RNA am NanoDropTM 1000 Spectrophotometer eingesetzt und die Absorption bei 260 nm sowie 230 und 280 nm gemessen. Hierbei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm (A_{260}) einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Durch den Quotienten A_{260}/A_{230} bzw. A_{260}/A_{280} können Rückschlüsse auf die Kontamination mit Phenol und Proteinen gezogen werden. Weiterhin wurde die RNA-Qualität durch gelelektrophoretische Trennung überprüft. Hierfür wurden 1-2 µg der isolierten RNA mit 5 µl Probenpuffer und 5 µl Wasser gemischt und elektrophoretisch in einem 1%igen Agarose-Gel (siehe) aufgetrennt und mittels dem Detektionssystem LAS-3000 sichtbar gemacht. Klare Banden für die 28S und 18S rRNA weisen auf eine intakte RNA hin, wobei im Idealfall die Banden in einem Verhältnis von 2:1 (28S/18S) vorliegen. Die Langzeitlagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

5.2.5. Reverse Transkription von RNA

Bei der reversen Transkription dient die einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA). Dazu wurde folgender Ansatz mit 400 ng Gesamt-RNA zunächst für 5 min bei 70 °C im Biometra TRIO-Thermoblock denaturiert und sofort auf 10 °C abgekühlt.

Gesamt-RNA (40 ng/μl)	10 μl
M-MLV RT-Puffer (5×)	4 μl
Oligo(dT)15-Primer (50 ng/μl)	1 μl
Random-Primer (50 ng/μl)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
RNAase-freies H ₂ O	3 μl

Anschließend wurden je 5 μl eines wie folgt zusammengesetzten Enzymmixes zugegeben.

M-MLV Reverse Transkriptase RNase H(-) (200 U/μl)	0,3 μl
M-MLV RT-Puffer (5×)	1 μl
RNase-Inhibitor (130 U/μl)	0,3 μl
RNAase-freies H ₂ O	3,4 μl

Die Reverse Transkription wurde bei 42 °C für 50 min durchgeführt und durch das Erhitzen auf 70 °C für 10 min beendet. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.6. Reverse Transkription von microRNA

MiRNA ist nicht wie mRNA polyadenyliert und muss daher für die Reverse Transkription zunächst polyadenyliert werden. Der Reaktionsmix enthielt sowohl eine poly(A)Polymerase als auch eine Reverse Transkriptase, so dass beide Reaktionen parallel abliefen. Die oligo(dT)Primer wurden so konstruiert, dass sie einen Anhang enthielten, der später bei der *Real-time* PCR als Bindesequenz für den sense-Primer genutzt werden konnte. Die Umschreibung der miRNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des *miScript II Reverse Transcription*-Kits im TRIO-Thermoblock. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

miRNA (40 ng/μl)	10 μl
miScript RT HiFlex-Puffer (5×)	4 μl
miScript RT-Mix	2 μl
Nucleics-Mix (10×)	2 μl
RNAase-freies H ₂ O	2 μl

Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 37 °C und wurde durch 5minütiges Erhitzen bei 95 °C beendet. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression individueller Gene wurde die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA in eine semiquantitative PCR eingesetzt. Dazu wurde ein PCR-Mastermix, der die *Taq*DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und den Reaktionspuffer enthielt, sowie Gen-

spezifische Primerpaare (Tab. 5) verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war wie folgt:

cDNA (aus 5.2.5.)	2 µl
PCR-Mastermix (2×)	10 µl
sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
bidest. H ₂ O	6 µl

Ein PCR-Zyklus bestand aus drei Reaktionsschritten: Denaturierung (94 °C, 30 sec), Primer-spezifisches *Annealing* (Sequenz-spezifische/Primer-abhängige Temperatur [siehe Tab. 4], 30 sec) und DNA-Synthese mit Hilfe einer *Taq*-Polymerase (72 °C, 30 sec). Durch mehrmaliges Wiederholen dieser drei Schritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten cDNA-Fragmente. Abschließend wurde die PCR durch eine 5minütige Synthesephase bei 72 °C und Abkühlen auf 4 °C beendet. In Vorversuchen wurde die optimale *Annealing*-Temperatur sowie die optimale Zyklenzahl bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression der individuellen Gene erfolgte semiquantitativ. Als Haushaltsgen wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, der mRNA-Gehalt der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder der 18S RNA-Gehalt bestimmt.

5.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Proben wurde in einem 1 % bis 1,5 %igem (w/v in 1× TAE-Puffer) Agarosegel aufgetrennt, welches zur Visualisierung der DNA/RNA mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid versetzt worden ist. Die Proben wurden zuvor mit 5 µl Orange G-Probenpuffer (50 % [v/v] Glycerin; 0,1 % Orange G) versetzt. Als Größenstandard für lineare DNA-Fragmente dienten der 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Größenmarker (Gene Ruler™), die zusammen mit den Proben auf das Gel geladen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Sub-Cell GT) in 1× TAE-Laufpuffer bei 80–110 V (Standard Power Pack 200).

1× TAE-Puffer (pH 8,0)

40 mM Tris-HCl
 1 mM Na₂EDTA
 0,11 % Essigsäure
 In bidest. H₂O

Mit Hilfe des LAS-3000 *imaging system* (Raytest, Straubenhardt) wurden die DNA-Fragmente anschließend detektiert und mit der Aida V.3.51 Image Software semiquantitativ ausgewertet.

5.2.9. *Real-time* PCR

Die *Real-time* PCR bietet die Möglichkeit, die Expression einzelner Transkripte zu quantifizieren. In dieser Arbeit basiert die Quantifizierung auf der Fluoreszenz-Messung des in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffes *SYBR Green*. Die *Real-time* PCR wurde im *iCycler* Optical Module System (Bio-Rad, München) durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

cDNA (aus 5.2.5.)	2 µl
<i>GoTaq</i> [®] <i>qPCR</i> Master Mix-Kit (2×)	11 µl
sense-Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
antisense-Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
RNase-freies H ₂ O	4 µl

Alle PCRs erfolgten im Doppelansatz nach folgendem Ablauf:

1.	95 °C	5 min	Denaturierung
2.	94 °C	15 sec	Denaturierung
3.	Sequenz-spezifische/Primer-abhängige °C	30 sec	<i>Annealing</i>
4.	72 °C	30 sec	Synthese
5.	88 °C	5 sec	Daten-/Fluoreszenzaufnahme

Die Schritte 2-4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

6.	72 °C	2 min	Nachsynthese
7.	55–100 °C	10 min	Schmelzkurve
8.	4 °C		

In Vorversuchen wurde die optimale *Annealing*-Temperatur bestimmt. Die Schmelzkurvenanalyse gibt die Spezifität der Primerbindung bzw. Reinheit der PCR-Amplifikation an.

5.2.10. *Real-time* PCR von microRNA

Die Amplifikation von miRNAs in der *Real-time* PCR wurde mit Hilfe des *miScript SYBR Green* PCR-Kits und definierten Primern (Tab. 8) durchgeführt. Zur Normalisierung der PCR-Daten wurde die humane/murine *small nuclear* (sn) RNA U6 untersucht (Tab. 8). Alle Messungen erfolgten im Doppelansatz nach dem folgenden Reaktionsansatz:

cDNA (10 ng/µl)	2 µl
<i>QuantiTect SYBR</i> [®] <i>Green</i> Mastermix (2×)	12,5 µl
<i>miScript</i> Universal Primer (10×)	2,5 µl
Spezifischer Primer (10×)	2,5 µl
RNase-freies H ₂ O	5,5 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- | | | | |
|----|-------|--------|---|
| 1. | 95 °C | 15 min | Aktivierung der <i>HotStart</i> -DNA-Polymerase |
| 2. | 94 °C | 15 sec | Denaturierung |
| 3. | 55 °C | 30 sec | <i>Annealing</i> |
| 4. | 70 °C | 30 sec | Synthese |
| 5. | 88 °C | 5 sec | Daten-/Fluoreszenzaufnahme |

Die Schritte 2-4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

- | | | | |
|----|-----------|--------|--------------|
| 6. | 55–100 °C | 10 min | Schmelzkurve |
| 7. | 4 °C | | |

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Primer für die Real-Time PCR von miRNA

miRNA	Spezies	Sequenz 5' → 3'	Firma
U6 (RNU6B)	M, H	unbekannt	Exiqon (Woburn, USA)
Mm_miR-34b-3p_1	M	AAUCACUAACUCCACUGCCAUC	Qiagen (Hilden)
Hs_miR-34b_2	H	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU	Qiagen (Hilden)

Spezies: M = Maus; H = Mensch

5.2.10.1. Auswertung der *Real-time* PCR

Die Menge der in der *Real-time* PCR amplifizierten cDNA-Fragmente wurde anhand der Werte für den sogenannten Ct (*Cycle threshold*) am Anfang der exponentiellen PCR-Phase ausgewertet. Dieser Ct-Wert gibt die Anzahl des PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz des während der PCR eingebauten Fluorochroms erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die Ermittlung des Ct-Wertes erfolgte mit der Auswertesoftware Optical System Version 3.1 (Bio-Rad). Anhand einer Verdünnungsreihe mit bekannten cDNA-Konzentrationen wurde zudem die Effizienz der *Real-time* PCR für jedes Gen ermittelt. Dazu wurde die logarithmierte Konzentration gegen den erhaltenen Ct-Wert aufgetragen, eine lineare Regression durchgeführt und die PCR-Effizienz (E) anhand des Anstieges (m) der Regression berechnet ($E = 10^{-XY}$; Excel-Software). Für jede Probe wurde anschließend der Δ Ct-Wert berechnet (Δ Ct = Mittelwert der Ct_{Kontrollen} - Einzelwert der Ct_{Behandlung}). Danach wurde die relative Transkripthäufigkeit mit Hilfe des Δ Ct-Wertes und der berechneten Effizienz nach der Formel E^{Δ Ct bestimmt. Abschließend wurde ein Ratio zwischen der relativen Transkripthäufigkeit des Zielgens und der relativen Transkripthäufigkeit des Haushaltsgens gebildet.

Die Auswertung der *Real-time* PCR-Daten des Zielgens erfolgte relativ zu den Daten eines Referenzgens. Dieses Referenzgen sollte idealerweise in unterschiedlichen Zelltypen ähnlich

exprimiert, ubiquitär vorhanden und nicht reguliert sein, d.h. ein sogenanntes Haushaltsgen sein. In dieser Arbeit wurden die mRNA-Expressionen von fünf potentiellen Haushaltsgenen (GAPDH, 18S rRNA, β -Actin, CYC-1 (Cytochrom c-1) und ATP5A1 (ATP Synthase 5A1)) im murinen Lungengewebe untersucht und mit dem Programm GeNorm hinsichtlich ihrer Stabilität analysiert. Dabei wird anhand der Ct-Werte ein Normalisierungsfaktor M für die jeweilige mRNA-Expression für jede getestete Probe berechnet. Je kleiner dieser Normalisierungsfaktor M ist, desto stabiler ist die Expression des Haushaltsgens (Vandesompele *et al.*, 2002). Da diese Untersuchungen zeigten, dass die ATP5A1 am stabilsten in der Mauslunge exprimiert ist, wurde die ATP5A1 als Haushaltsgen verwendet.

5.2.11. DNA-Mikroarray

Die Mikroarray-Technik basiert auf der komplementären Basenpaarung von Nukleotidsequenzen und ermöglicht die Detektion vieler verschiedener Transkripte in einem einzigen Experiment (Lockhart *et al.*, 1996). Für die Mikroarrayanalysen wurden *High Density*-Oligonukleotid-Mikroarrays sowie das technische Equipment der Firma Affymetrix verwendet. Der für diese Arbeit verwendete Human Genome U133 Plus 2.0 Array analysiert 47400 mRNA-Transkripte, von denen 38500 beschriebene Gene sind (Affymetrix 2003). Der Mouse Genome 430 2.0 Array analysiert über 45 000 mRNA-Transkripte, welche in 34 000 Fällen bekannte murine Gene repräsentieren (Hardiman, 2004).

Die Bestimmung der mRNA-Expression in humanen Zellen (WI-38 und A549) sowie murinen Lungengeweben (junge und alte Mäusen) wurde mittels DNA-Mikroarrays am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (Medizinische Fakultät, Halle/Saale) durch Dr. V. Christov untersucht. Dazu wurden 5 μ g der Gesamt-RNA eingesetzt. Nach der Erststrang- und Zweitstrang-cDNA Synthese, *in vitro*-Transkription in biotinylierte cRNA, Aufreinigung, Fragmentierung und Hybridisierung wurden die Arrays gewaschen, mit einem Fluorochromgekoppelten Antikörpersystem gefärbt und letztlich die Fluoreszenzsignale eingescannt (Abb. 7). Die Auswertung der eingescannten Mikroarrays und Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mit der Software Robin (Lohse *et al.*, 2010).

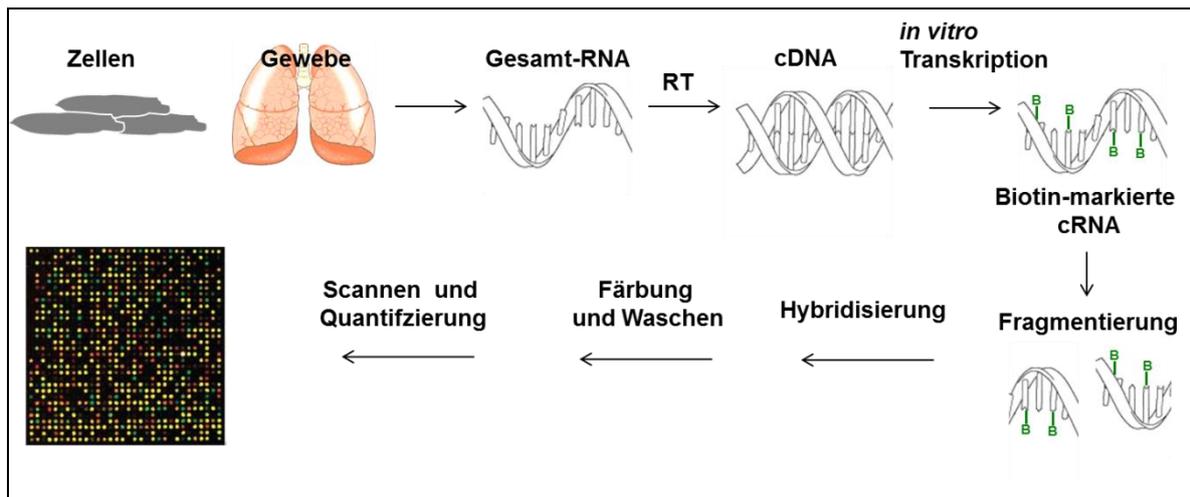


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Mikroarrayversuches
RT = Reverse Transkription

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Herstellung von Proteinlysaten aus Mauslungengewebe

Für die Herstellung der Proteinlysate aus Mauslungengewebe wurde der linke Lungenflügel (ca. 20 mg) wie unter 5.2.2. beschrieben pulverisiert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 250 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 1 mM Na₃VO₄, 0,1 µM Okadainsäure, 1 x Protease-Inhibitor, pH 6,7) überführt. Die Proben wurden durch Ultraschallbehandlung mit dem Ultra-Turrax (5 × 5 sec) homogenisiert, mit Benzonase (75 U; 30 min, 37 °C) behandelt und für weitere 2 h im Ultraschallbad inkubiert, um die DNA zu zerstören. Die Proteinlysate wurden bei 13000 × g für 10 min abzentrifugiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteingehalte mittels BCA-Methode (siehe 5.3.3.) bestimmt.

5.3.2. Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen wurden diese in 12-Wellplatten kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit 100 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 1 mM Na₃VO₄, 0,1 µM Okadainsäure, 1 x Protease Inhibitor, 75 U Benzonase; pH 6,7) unter Schütteln (1 h, 37 °C) lysiert. Nach Überführung der Lysate in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden die Proteingehalte mit dem BCA-Test (siehe 5.3.3.) bestimmt. Anschließend wurden die Proben mit 4× SDS-Probenpuffer (40 % Glycerin, 8 % SDS, 80 mM DTT, 4 mM Na₂EDTA, 0,01 % Bromphenolblau, 500 mM Tris-HCl; pH 6,8) versetzt und für weitere 90 min im Ultraschallbad inkubiert. Die so hergestellten Zelllysate wurden bei -20 °C gelagert.

5.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem *BCA Protein Assay*-Kit (Pierce) bestimmt. Dieser Assay beruht auf der chemischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , das im Komplex mit BCA (Bicinchoninsäure) einen violetten Farbkomplex (562 nm Absorption) bildet (Smith *et al.*, 1985). Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (BSA; 0–1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet, das zusammen mit den jeweiligen Proteinproben im 96-Wellformat nach Anleitung des Herstellers pipettiert worden ist. Die Absorptionsmessung bei 562 nm sowie die Berechnung der Proteinkonzentration anhand des BSA-Standards erfolgte im FLUOstar OPTIMA-Plattenmessgerät mit Hilfe der Software FLUOstar Optima V1.20-0 (BMG Labtechnologies).

5.3.4. Immunopräzipitation

Es wurden Proteinlysate aus Mauslungen (siehe 5.3.1) sowie Zellen (siehe 5.3.2) in die Immunpräzipitation eingesetzt. Zunächst wurden die für die Immunpräzipitation notwendige Protein G-Sepharose 4 Fast Flow-Granulate (Amersham) zweimal mit 1× IP-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation (600 x g für 30 sec) sedimentiert und in 100 μl 1× IP-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 80 μg Proteinlysat im gleichen Verhältnis mit 2× IP-Puffer sowie 50 μl Protein G-Sepharose gemischt und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert, um zunächst unspezifische Proteinbindungen auszufällen. Um CREB zu präzipitieren, wurde die Sepharose durch Zentrifugation abgetrennt, der gereinigte Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser mit CREB-Antikörper (1:100, anti-CREB, Kaninchen monoklonal IgG; Cell Signaling) versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 4 °C wurden 50 μl der gewaschenen Protein G-Sepharose hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Protein-Antikörper-Sepharose-Komplexe abzentrifugiert, zweimal mit 1× IP-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2× SDS-Probenpuffer (siehe 5.3.2) und Denaturierung bei 95 °C für 5 min im Thermomixer (Eppendorf) wurden die Immunopräzipitate im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (siehe 5.3.5. und 5.3.6.).

1x IP-Puffer

0,1 % SDS

0,5 % Na-deoxycholat

1 % Triton X-100

150 mM NaCl

2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

1× Protease-Inhibitor

5.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größen- bzw. Molekulargewicht-abhängige Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE nach Laemmli *et al.* 1970, in vertikalen Gelkammern (*Mini-Protean*[®] 2-D *Electrophoresis Cell*, Bio-Rad). Abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins wurde entweder ein 10 oder 12,5 %iges Trenngel sowie ein 5 %iges Sammelgel eingesetzt (Tab. 9). Die Proben (20–100 µg Protein) wurden mit 4× SDS-Probenpuffer (siehe 5.3.2.) versetzt und bei 95 °C für 5 min im Thermomixer (Eppendorf) erhitzt, wodurch die Proteine vollständig denaturiert worden sind und eine negative Ladung erhalten haben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1× Tris-Glycin-Laufpuffer (24,8 mM Tris, 191,7 mM Glycin, 5,2 mM SDS; pH 8,6) zunächst bei 60 V für 15 min und danach bei 130 V für ca.2 h. Neben den Proteinproben wurde auch ein Größenmarker (Prestained Protein Marker; Fermentas) zur späteren Größenbestimmung der Proteine verwendet.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gele für die SDS-PAGE

Stammlösung	Sammelgel		Trenngel	
	5 %	10 %	10 %	12,5 %
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 37,5:1	1,0 ml	3,0 ml		3,8 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,0 ml	-		-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	4,5 ml		4,5 ml
90 % Glycerol	-	2 ml		2 ml
10 % SDS	80 µl	120 µl		120 µl
10 % APS	50 µl	100 µl		100 µl
TEMED	10 µl	10 µl		10 µl
mit bidest. H ₂ O auf	8,0ml	12 ml		12 ml

5.3.6. Western-Blot

Bei der Western-Blot-Analyse werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen und über eine immunologische Nachweisreaktion sichtbar gemacht, wodurch Aussagen über die vorhandene Menge eines Proteins getroffen werden können. Die für den Transfer verwendete PVDF-Membran (Roche) wurde zunächst in Methanol hydrophilisiert und anschließend zusammen mit dem PAGE-Gel und zwei Filterpapieren in Glycin-Blottingpuffer (192 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,0375 % SDS, 25 mM Tris-HCl; pH 8,2) äquilibriert. Die Komponenten (1 Filterpapier, Gel, Membran, 1 Filterpapier) wurden luftblasenfrei übereinandergelegt und der Protein-Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² Membran über einen Zeitraum von 90 min durchgeführt. Zur Überprüfung der Qualität des Transfers wurde die Membran anschließend mit 0,1 % (w/v) Ponceau-Rot in 5%iger Essigsäure (v/v) gefärbt. Durch Entfärbung der Membran in bidest. H₂O wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Danach wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS-T300

[50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,15 % Tween 20; pH 7,5]) bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu belegen. Gleichzeitig erfolgte die Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie-Färbelösung (siehe 5.3.7) zur Überprüfung der noch im Gel verbliebenen Proteinmengen. Anschließend wurde die Membran mit primärer Antikörperlösung (primärer Antikörper (Tab. 10) in TBS-T150 [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,15 % Tween 20; pH 7,5] mit 0,03 % NaN₃) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach 30-minütigem Waschen mit TBS-T 300 die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in TBS-T150 für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran mit TBS-T 300 für 3x 10 min gewaschen. Die Chemilumineszenzentwicklung wurde nach Substratzugabe (Western Blot Luminol-Reagenz (Santa Cruz) oder ECL Plus Western Blotting Detection-Reagenz (Amersham)) am LAS-3000 *imaging system* detektiert und mit der Software AIDA V.3.51 ausgewertet. Um Schwankungen in der Proteinmenge auszugleichen, wurden alle Proben auf die Beladungskontrolle GAPDH oder auf die Gesamtproteinmenge (Coomassie-Färbung von PVDF Membran; siehe 5.3.7.) normalisiert. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tab. 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Western-Blot-Analysen

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Größe des Zielproteins (kDa)
anti-AGE-R1 (OST-48), Maus monoklonal IgG	Santa Cruz, USA	1:1000	48
anti- CREB, Maus monoklonal IgG	Cell Signaling, USA	1:1000	43
anti-CREB, Kaninchen monoklonal IgG	Cell Signaling, USA	1:1000	43
anti-GAPDH, Kaninchen polyklonal IgG	Santa Cruz, USA	1:2000	37
anti-phospho-CREB, Kaninchen monoklonal IgG	Cell Signaling, USA	1:1000	43
anti-PKA $\alpha/\beta/\gamma$, Kaninchen polyklonal IgG	Santa Cruz, USA	1:500	40/53/40
anti-Ubiquitin, Maus monoklonal IgG	Cell Signaling, USA	1:1000	
anti-CML (2868), Kaninchen polyklonal IgG	Herstellung durch Firma in unserem Auftrag	1:1000	
anti-ArgPyrimidin (6B), Maus	Biologo, Kronshagen	1:1000	
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung	
anti-Kaninchen polyklonal IgG, Esel, Peroxidase-gekoppelt	Dianova, Hamburg	1:10 000	
anti-Maus polyklonal IgG, Ziege, Peroxidase-gekoppelt	Dianova, Hamburg	1:10 000	

5.3.7. Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteinen in SDS-Gelen wurden diese zunächst 3× in frischem dest. H₂O für 1 min bei 600 W in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Zugabe der Coomassie-Färbelösung (80 mg/l Coomassie Brilliant Blau G-250, 3 % HCl [v/v]) wurde das Gel erneut 1 min aufgeköcht, in der heißen Färbelösung für weitere 30 min inkubiert und in dest. H₂O entfärbt. Die stabile Färbung von Proteinen auf der PVDF-Membran erfolgte ebenfalls in Coomassie-Färbelösung (0,05 % Coomassie G-250, 10 % Eisessig, 50 % Methanol) mit nachfolgender Entfärbung in Entfärbelösung (5 % Methanol, 1 % Eisessig) für 3 × 5 min. Die gefärbten Gele bzw. Membranen wurden mit dem Image-Reader LAS-3000 aufgenommen und mit der Software AIDA V.3.51 ausgewertet.

5.3.8. Immunozytochemie

Für die zytochemische Färbung von Zellen wurden diese für einen Tag auf sterilen Deckgläschen (Menzel-Gläser, Braunschweig) kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen in PBS und 10-minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und 1 h in 10 % Ziegen Serum in PBS in einer feuchten Kammer blockiert. Zum Nachweis von CREB wurden Zellen mit dem anti-CREB-Antikörper (1:500; anti-CREB, Kaninchen monoklonal IgG) in PBS mit 0,5 % Ziegen Serum über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 × mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem anti-Maus- Antikörper (Envision + System-HRP Labelled Polymer anti-Maus; Dako) bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS und ca. 20-minütiger Inkubation mit Diaminobenzidin-Lösung (DAB; Invitrogen) wurde die DAB-Färbung der Präparate unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Die Präparate wurden in Glycergel[®]-Medium eingebettet und am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit der Spot RT Kamera aufgenommen.

5.3.9. Immunohistochemie

Für die immunohistochemische Untersuchung der Mauslunge wurden diese direkt nach der Entnahme in 4 % Formaldehyd in PBS fixiert und nach 24 Stunden in 70 % Ethanol überführt und bis zur Einbettung darin gelagert. Nach der Einbettung in Paraffin (Institut für Pathologie, Med. Fakultät) wurden am Mikrotom 5-µm-dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern (Süsse Labortechnik) fixiert. Die Präparate wurden zur Verflüssigung des Paraffins und Trocknung über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank gelagert. Die Entparaffinierung erfolgte durch Behandlung der Schnitte mit HistoClear als Xylenersatzstoff und einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol → 90 % → 80 % → 70 % → 50 % → 30 % Ethanol). Anschließend wurde jeweils einmal mit destilliertem H₂O und mit PBS-T-Waschpuffer (PBS mit 0,1 % Tween 20) gespült. Die

Demaskierung der Proteine erfolgte durch Kochen der Präparate in 10 mM Citratpuffer (100 mM Zitronensäure, 100 mM Na-Citrat; pH 6,0) für 3×5 min. Danach wurden die Präparate abgekühlt, in PBS-T gewaschen und für 25 min in 3 % H_2O_2 in Methanol inkubiert, um endogene Peroxidaseaktivitäten zu blockieren. Danach erfolgte die Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen durch Behandlung der Schnitte mit 10 % Ziegenserum in PBS-T. Zur Färbung von CREB wurden dann die Schnitte mit dem primären anti- CREB, Maus monoklonal IgG in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 1 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate zunächst $3 \times$ mit PBS-T gewaschen und dann mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Envision + System-HRP Labelled Polymer anti-Maus; Dako) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach $3 \times$ Waschen mit PBST erfolgte die Färbung der Präparate für 20 min bei RT mit DAB-Substrat (Stable DAB; Invitrogen), welches nach Oxidation durch die Peroxidase des Antikörpers an der Stelle des Zielantigens ein braunes Endprodukt bildet. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das DAB-Substrat abgegossen und die Präparate 5 min unter fließendem H_2O gewässert. Abschließend wurden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe (30 % \rightarrow 50 % \rightarrow 70 % \rightarrow 80 % \rightarrow 90 % Ethanol \rightarrow Isopropanol) und Histoclear entwässert und mit dem Histological Mounting-Medium (National Diagnostics) luftdicht abgeschlossen.

5.4. Kollagenanalytik

5.4.1. Isolation von fibrillärem Kollagen

Die Isolation von fibrillären Kollagenen, insbesondere die Kollagene vom Typ I und III, aus dem Mauslungengewebe erfolgte in drei Schritten. Diese führten zur Pepsin-verdaubaren Fraktion (**F1**), Kollagenase Typ I und Proteinase K-verdaubare Fraktion (**F2**) und enzymatisch unverdaubaren Fraktion (**F3**), die durch Säurehydrolyse zugänglich gemacht worden ist (Abb. 8).

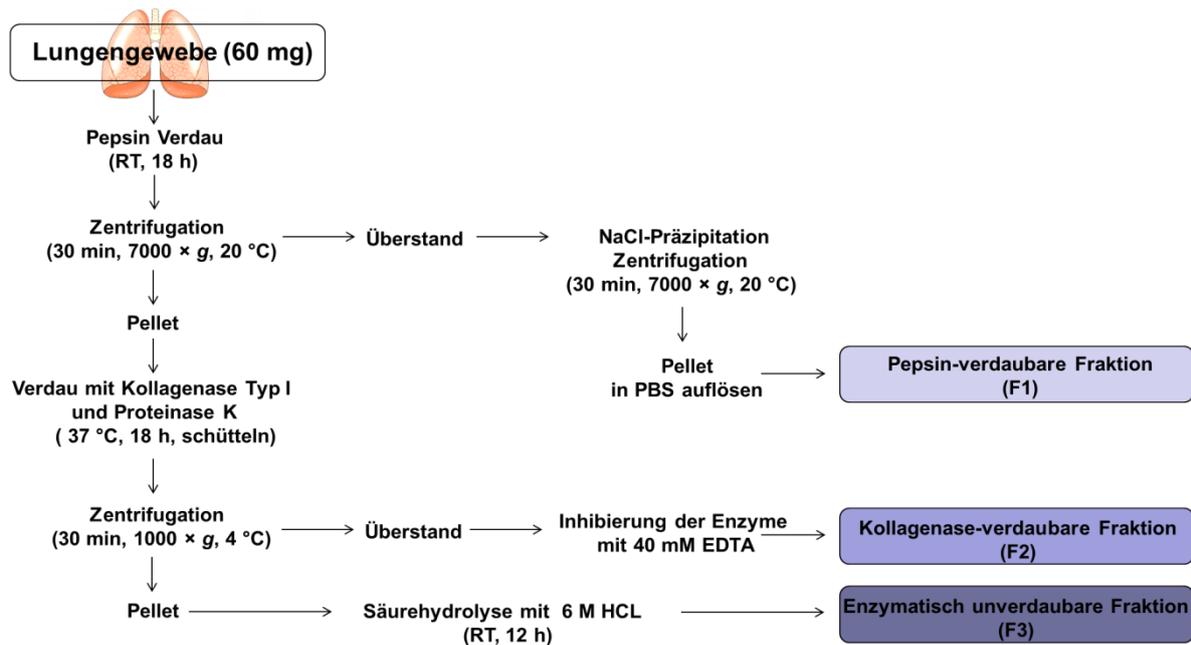


Abbildung 8: Schema zum Versuchsaufbau der Isolation von fibrillären Kollagenen aus der Mauslunge

Das Lungengewebe (60 mg Nassgewicht) wurde mit 50 mM Tris/1M NaCl (pH 7,2) und anschließend mit 0,5 M Essigsäure gewaschen. Danach wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert, mit 1,8 mg Pepsin (≥ 250 units/mg, Sigma, P-7000) in 1 ml 0,5 M Essigsäure versetzt, mit einem Pistill homogenisiert und für 18 h bei RT verdaut. Das Homogenat wurde am nächsten Tag abzentrifugiert und 1 ml des Überstandes abgenommen. Dieser wurde mit 1 ml 1,4 M NaCl versetzt, um die Kollagene Typ I und III auszufällen, und erneut für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 μ l PBS aufgenommen und lag nun als **F1** vor. Die Gewinnung der Pepsin-verdaubaren Fraktion von fibrillären Kollagenen erfolgte nach der Methode von Maurel *et al.*, 1990, und wurde mittels SDS-PAGE (siehe 5.3.5) überprüft (Abb. 9).

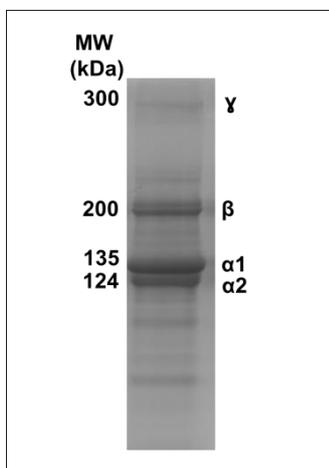


Abbildung 9: Nachweis der fibrillären Kollagene in der Pepsin-löslichen Fraktion (F1) nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels.

Die $\alpha 2$ -Ketten von Kollagen I und III zeigen sich bei ca. 124 kDa und die $\alpha 1$ -Kette bei ca. 135 kDa. Die β -Kette (Dimer, aus zwei $\alpha 1$ -Ketten oder Dimer aus einer $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette) zeigt sich bei ca. 200 kDa und die γ -Kette (Trimer aus α - Ketten, bei ca. 300 kDa).

Die Isolation der Kollagenase-verdaubaren Fraktion (**F2**) erfolgte nach dem Protokoll von Turk *et al.*, 1999. Dazu wurde das unverdaute Gewebehomogenat nach dem Pepsinverdau mit PBS und dann zweimal mit 1 ml Verdauungspuffer (1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5) gewaschen. Das gewaschene Gewebehomogenat wurde in Verdauungspuffer mit 0,1 mg/ml Kollagenase Typ I (≥ 125 units/mg, Sigma, C-0130) und 0,1 mg/ml Proteinase K (Applichem) aufgenommen und für 18 h bei 37 °C unter Schütteln (400 rpm) inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde 1 ml des Überstands abgenommen (**F2**) und mit 40 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ versetzt, um die Enzyme zu inhibieren.

Das restliche Gewebepellet enthielt das enzymatisch nicht-verdaubare fibrilläre Kollagen (**F3**). Dieses Pellet wurde mit PBS gewaschen, um restliche Bestandteile der Enzymlösung zu entfernen, und dann durch Zugabe von 200 μl 6 M HCl einer Säurehydrolyse (12 h bei RT) unterzogen, um die unlösliche Kollagenfraktion für weitere Analysen zugänglich zu machen. Diese unverdaubare Fraktion F3 sowie die beiden enzymatisch verdaubaren Fraktionen F1 und F2 wurden bei -20 °C gelagert.

5.4.2. Kollagenquantifizierung mittels 4-Hydroxyprolin-Assay

Der Gehalt an 4-Hydroxyprolin (4-HyP) im Kollagen beträgt 13–14 % und ist außer in Elastin (1,5–2,3 %) in keinem anderen Protein in signifikanten Mengen enthalten (Hamlin & Kohn, 1971). Daher wurde der Kollagengehalt via 4-HyP-Messung nach dem Protokoll von Lin & Kuan, 2010, durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Bestimmung des 4-Hydroxyprolin-Gehaltes zur Ermittlung des Kollagengehaltes einer Probe.

Zunächst wurden 50 μl jeder Kollagenprobe mit 50 μl 12 M HCl bei 121 °C für 60 min hydrolysiert. Anschließend wurden die Hydrolysate unter Vakuum bei 60 °C getrocknet und mit 50 μl 1,2 M NaOH gelöst. Die 4-HyP-Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines 4-HyP-Standards in 2 M NaOH (0–1000 $\mu\text{g/ml}$). Die 50 μl Probe bzw. der 4-HyP-Standard wurden mit 450 μl Chloramin T-Reagenz versetzt und für 25 min bei RT inkubiert. Danach wurden 500 μl Ehrlich's Reagenz zu jedem Reaktionsansatz pipettiert, bei 65 °C für 60 min inkubiert und anschließend im 96er-Wellformat die Absorption bei 550 nm im FLUOStar Optima-Plattenmessgerät bestimmt. Ausgegangen von 13,5 % 4-HyP im Kollagen erhält man durch Multiplikation der 4-HyP-Werte der Proben mit dem Faktor 7,46 den Gehalt an Kollagen (Neuman & Logan, 1950; Maurel *et al.* 1990).

Acetat-Citrat-Puffer (pH 6,5)

0,880 mM Natriumacetat

239 mM Zitronensäure

850 mM NaOH

200 mM Essigsäure

Chloramin T-Reagenz

46 mM Chloramin T

10 % (v/v) n-Propanol
in Acetat-Citrat-Puffer**Ehrlich's Reagenz**

1 M 4-Dimethylaminobenzaldehyd

2:1 (v/v) n-Propanol/Perchlorsäure

5.4.3. AGE-Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung und Bräunungsgrad

Zur Quantifizierung der AGE-Modifikationen am Kollagen wurde die allgemeine AGE-spezifische Bräunung sowie die spezifische Fluoreszenz einiger AGEs genutzt (Monnier *et al.*, 1986; Mulder *et al.*, 2006). Jede Kollagenprobe aus den Fraktionen F1–3 wurde im Fraktions-internen Puffer auf die gleiche Konzentration (10 µg/ml Kollagen) eingestellt. Die Bräunungsgradmessung wurde von 2 µl einer vorher eingestellten Kollagenprobe mit Hilfe des Spektrophotometers (NanoDrop™ 1000) bei einer Absorption von 340 nm durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte für 200 µl Probenvolumen in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten bei einer Anregungswellenlänge von 370/10 nm und einer Emissionswellenlänge von 440/10 nm am FLUOStar Optima.

5.4.4. Spot-/Slot-Blot

Beim Spot-/Slot-Blot-Verfahren werden die Proteine ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung auf die Membran aufgetragen. Da eine größenabhängige Zuordnung der Proteine somit nicht möglich ist, wird dieses Verfahren insbesondere für immunologische Nachweise an isolierten Proteinen wie z.B. Kollagen verwendet. Dazu wurde die PVDF-Membran in Methanol hydrophilisiert und zusammen mit Filterpapier in PBS getränkt. Anschließend erfolgte der Aufbau der Blot-Apparatur nach Herstellerangaben (Minifold® I Spot Blot System, Schleicher & Schuell) und die Vakuum-Pumpe wurde angeschlossen. Die Membran wurde kurz in TBS-T-300 gewaschen und anschließend mit Blockierlösung (5 % Milchpulver, 3 % H₂O₂ in TBS-T-300) für 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Antikörpern wie beim Western-Blot-Verfahren beschrieben (siehe 5.3.6.). Als interner AGE-Standard wurde eine Konzentrationsreihe aus Ribose-modifiziertem Kollagen (siehe 5.1.5.5.) verwendet.

5.5. Statistik

Die statistische und grafische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Microsoft Office Excel 2010 sowie SigmaPlot Version 10.0. Die meisten Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SD, *standard deviation*) angegeben. In diesem Fall erfolgte die Signifikanzanalyse mit dem *Student t*-Tests, wenn zwei Gruppen verglichen werden sollten, oder bei mehr als zwei Gruppen mit dem einfaktoriellen ANOVA (*analysis of variance*)-Test. Einige Ergebnisse wurden als Box-Plot mit Median (50 % Percentile), 25/75 % Quartile und 5/95 % Whisker angegeben und die Signifikanzauswertung erfolgte mit *Rank Sum*-Test. Weiterhin wurde für die Darstellung der Ergebnisse ein Streudiagramm mit dem Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* verwendet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($P \leq 0,05$) zugrunde gelegt. Signifikante Ergebnisse wurden in den Abbildungen entsprechend mit $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ bzw. $***P \leq 0,001$ gekennzeichnet.

6. Ergebnisse

6.1. Einfluss der Alterung auf den Gehalt von totalem und aktiviertem/ phosphoryliertem CREB in der Mauslunge

Für die Untersuchungen wurden die Lungen von Mäusen unterschiedlichen Alters (jung, adult und alt) genutzt (Tab. 4). In mRNA-Analysen konnte die Expression des CREB1 Gens gezeigt werden. Das Altern hatte keinen Einfluss auf den Gehalt an CREB mRNA in der Mauslunge (Abb. 10).

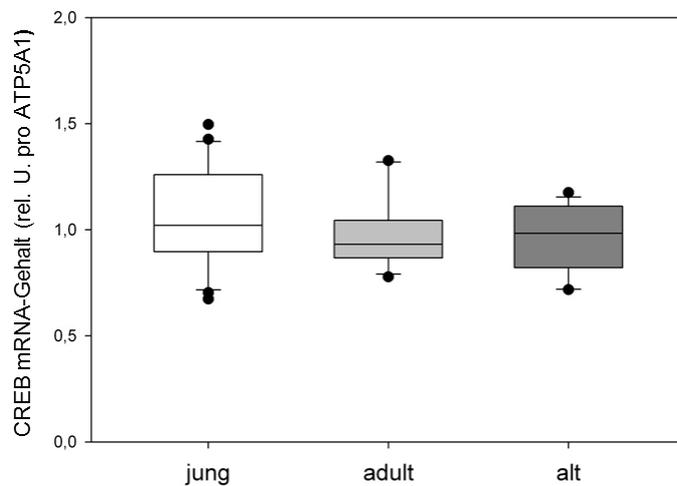


Abbildung 10: Einfluss der Alterung auf den CREB mRNA-Gehalt in der Mauslunge

Der CREB mRNA-Gehalt wurde mit quantitativer *Real-Time* PCR per ATP5A1 mRNA ermittelt. Die Ergebnisse sind als Box-Plots mit jung n=30, adult n=27 und alt n=30 dargestellt.

Im Gegensatz dazu war der Proteingehalt an CREB durch das Altern verändert. Im Vergleich zu jungen Mäusen trat mit zunehmendem Alter eine stetige Abnahme von totalem und phosphoryliertem CREB in der Mauslunge auf (Abb. 11A, B).

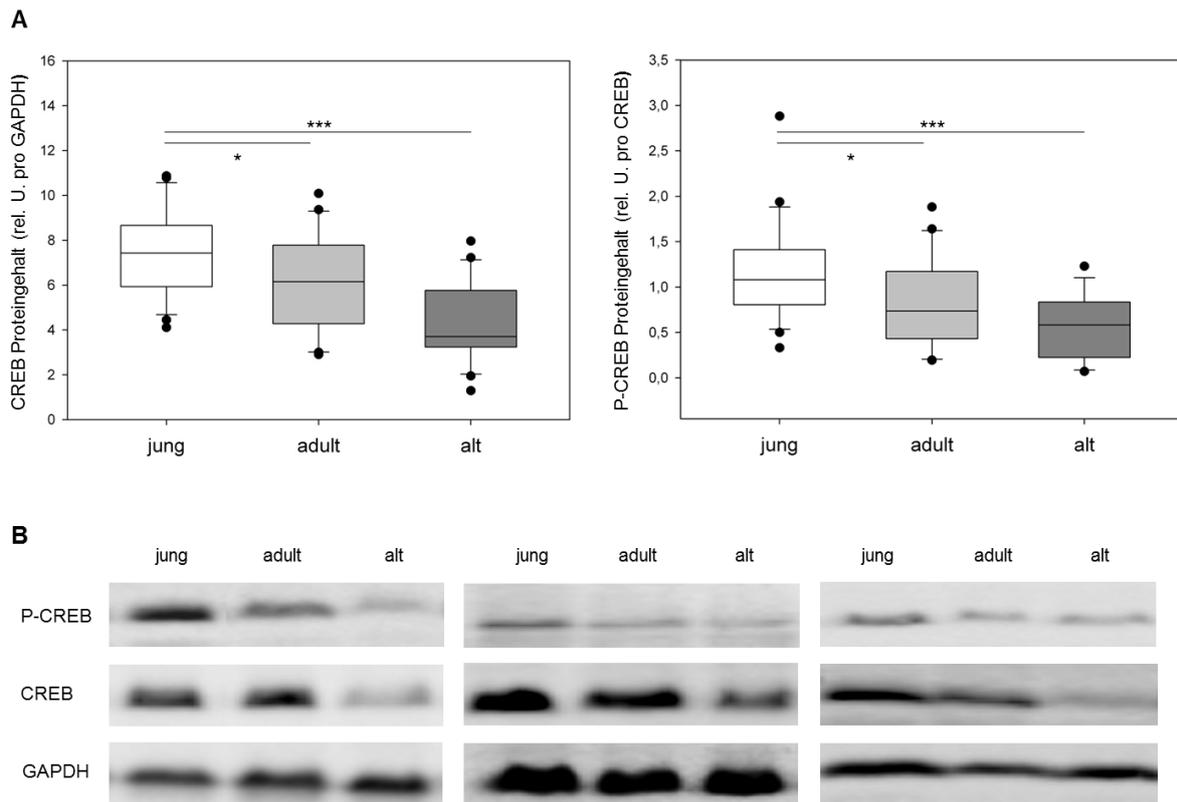


Abbildung 11: Einfluss der Lungenalterung auf den Proteingehalt und die Phosphorylierung von CREB

A) Die Gehalte an totalem CREB und phosphoryliertem CREB (P-CREB) wurden per Western Blot-Technik bestimmt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Box-Plots mit jung n=30, adult n=27 und alt n=30 dargestellt. * $P \leq 0,05$ bzw. *** $P \leq 0,001$ vs. junge Mäuse. **B)** Repräsentative Western-Blot-Bilder.

CREB wird häufig durch die PKA mittels Phosphorylierung aktiviert (Abb. 4). Obwohl die Menge an phosphoryliertem CREB in der Mauslunge altersabhängig abnahm, hatte die Alterung keinen Einfluss auf den Proteingehalt der PKA. So wiesen Lungen von jungen Mäusen einen medianen Gehalt von 0,58 (0,51-0,87), adulte Mäuse von 0,57 (0,48-0,72) und alte Mäuse von 0,68 (0,52-0,73) auf. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten eine Zellkernlokalisierung von CREB besonders auffallend im Zellkern von Epithelzellen der terminalen Bronchiolen von jungen aber nicht alten Mäusen (Abb. 12A C). Im Gegensatz zum Lungentumor in der Maus war der Proteingehalt an CREB in der gesunden jungen Lunge jedoch deutlich schwächer (Abb. 12F). Da nur mit einem Antikörper aus der Maus der immunohistochemische Nachweis von CREB erreicht werden konnte, sind einige unspezifische Färbungen entstanden (Abb. 12C).

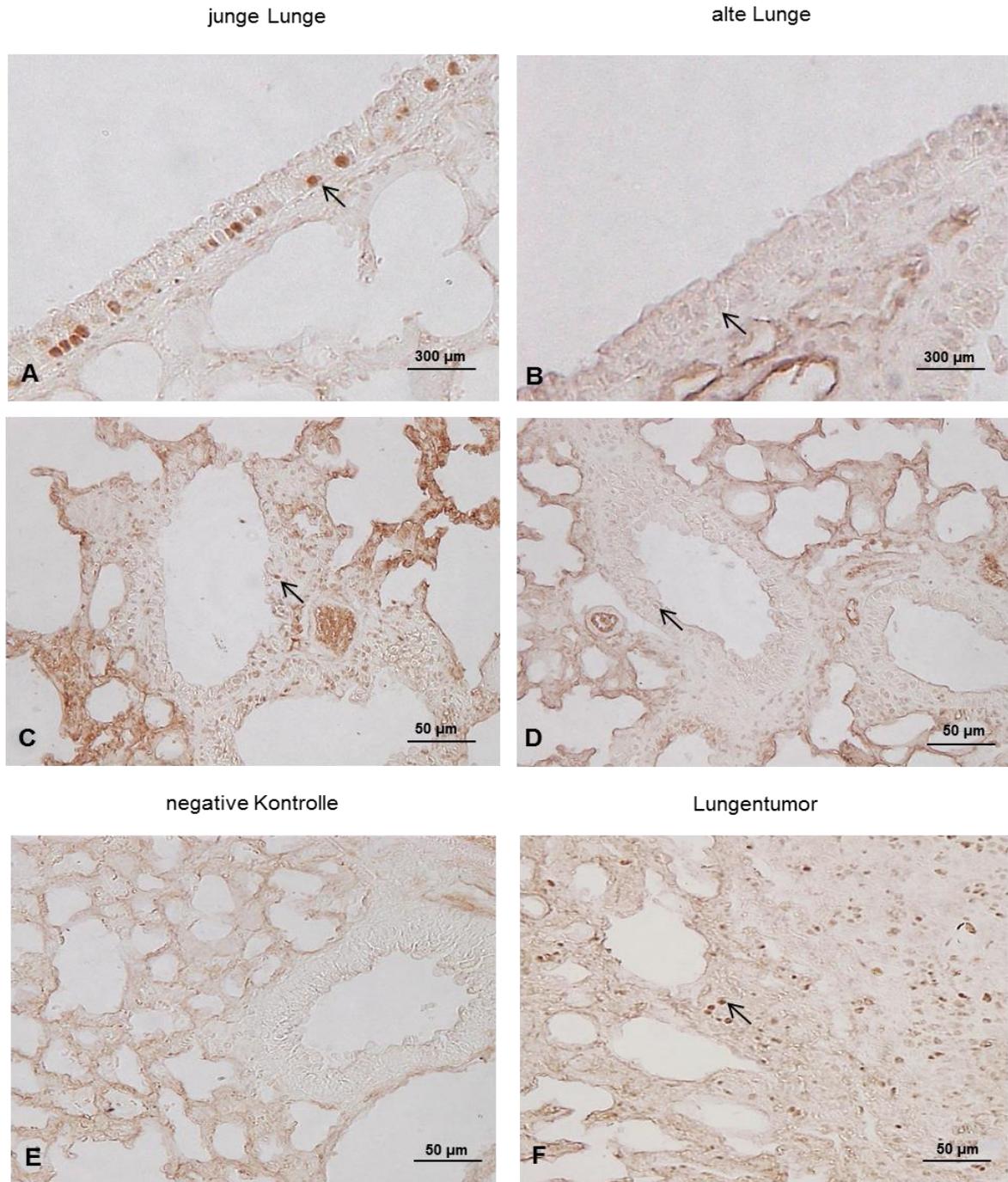


Abbildung 12: Immunohistochemischer Nachweis von CREB in Lungengeweben junger und alter Mäuse
 Repräsentative immunohistochemische Färbungen von CREB in der Lunge einer jungen sowie einer altern Maus. Längsschnitte (**A, B**) und Querschnitte (**C, D**) durch eine terminale Bronchiole; negative Kontrolle ohne primären Antikörper (**E**); positive Kontrolle (**F**, Lungentumor). Die Pfeile weisen auf CREB (braune Färbung) in den Zellkernen hin.

6.2. Einfluss der Alterung auf den Gehalt, die Verdaubarkeit und AGE-Modifizierung von Kollagenen in der Mauslunge

Die extrazelluläre Matrix aus Kollagenen und anderen Proteinen trägt neben der Formgebung und Elastizität von Geweben auch zur Signaltransduktion von Gewebezellen bei. Da der mit dem Alter verminderte Proteingehalt an CREB in der Mauslunge auf Veränderungen der Kollagenmatrix zurückzuführen sein könnte, wurden zunächst Gehalt, enzymatische Verdaubarkeit sowie AGE-Modifizierung von Kollagenen aus der Mauslunge altersabhängig untersucht. Diese Untersuchungen zeigten mit steigendem Alter eine reduzierte mRNA-Menge der fibrillären Kollagene Typ I und besonders Typ III (Tab. 11). Entsprechend nahm der Gesamtproteingehalt der fibrillären Kollagene in alten Mäusen im Vergleich zu den Lungen von jungen und adulten Mäusen ab (Tab. 11). Der mRNA-Gehalt von Kollagen Typ IV, ein essentieller Bestandteil der Basalmembran, war ebenfalls mit steigendem Alter in der Mauslunge reduziert (Tab. 11).

Tabelle 11: Einfluss der Lungenalterung auf den mRNA- und Proteingehalt von Kollagenen in der Maus

mRNA-Gehalt ^a	jung (n = 21)	adult (n = 11)	alt (n = 17)
Kollagene:			
Kollagen I $\alpha 2$ fib.	1,20 (1,10 – 1,55)	1,08 (0,69 – 1,39)	0,70 (0,59 – 0,92) *
Kollagen III $\alpha 1$ fib.	1,69 (0,78 – 3,31)	0,51 (0,27 – 1,40) *	0,61 (0,22 – 1,78) *
Kollagen IV $\alpha 1$	1,31 (0,99 – 2,06)	0,76 (0,52 – 1,04) *	0,39 (0,32 – 0,62) *
Kollagen-regulierende Faktoren:			
MMP-2	1,18 (0,87 – 1,49)	0,67 (0,48 – 0,79) *	0,97 (0,67 – 1,16) *
MMP-9	1,10 (0,83 – 1,52)	0,81 (0,69 – 1,09)	1,36 (0,99 – 1,80) #
TIMP-1	1,03 (0,81 – 1,31)	0,62 (0,57 – 0,75) *	0,75 (0,56 – 1,04) *
TIMP-2	1,12 (1,00 – 1,34)	1,09 (0,95 – 1,46)	1,03 (0,85 – 1,12)
TIMP-3	1,32 (1,04 – 1,50)	1,07 (0,67 – 1,50)	0,88 (0,58 – 1,25)
Protein^b	jung	adult	alt
fibrilläre Kollagene	19,23 \pm 1,5	20,51 \pm 1,09 *	17,45 \pm 1,80 * #

Mittels quantitativer *Real-time* PCR wurde der mRNA-Gehalt von ausgewählten Kollagenen, MMPs und TIMPs im Verhältnis zur ATP5A1 mRNA ermittelt. Die Werte sind als Mediane mit Interquartilabständen angegeben. * $P \leq 0,05$ vs. junge Mäuse bzw. # $P \leq 0,05$ vs. adulte Mäuse. Die Proteinmengen sind als MW \pm SD angegeben.

^a rel. Einheiten (RU) mRNA per ATP5A1 mRNA

^b μ g Protein per mg Feuchtgewicht (Addition aller drei Kollagen-Fraktionen; vgl. Abb. 8)

Die am Kollagenstoffwechsel beteiligten MMPs und ihre spezifischen Inhibitoren, die TIMPs zeigten ebenfalls altersabhängige Veränderungen in ihrem mRNA-Gehalt (Tab. 11). So nahm der

mRNA-Gehalt von MMP-2 und TIMP-1 in der alten Lunge ab (Tab. 11). Während die pulmonalen mRNA-Gehalte von TIMP-2 und -3 unverändert blieben, war der von MMP-9 mit dem Alter erhöht (Tab. 11).

Aufgrund der hohen biologischen Halbwertszeit werden Kollagene posttranslational bevorzugt durch nicht-enzymatische Glykierungsreaktionen AGE-modifiziert, was deren Eigenschaften beeinträchtigen dürfte (Dyer *et al.*, 1991; Turk *et al.*, 1999; Tessier, 2010). Die Isolierung und nachfolgende Quantifizierung von fibrillärem Kollagen aus der Mauslunge zeigte, dass nur wenig fibrilläres Kollagen mit Pepsin verdaut werden kann (Fraktion F1) wohingegen mehr Kollagen durch Kollagenase Typ I und Proteinase K verdaubar war (Fraktion F2; Abb. 13A). Der größte Teil des Kollagens blieb allerdings nicht verdaubar (Fraktion F3; Abb. 13A). Diese Unverdaulichkeit von fibrillärem Kollagen war bei Kollagen aus der alten Mauslunge signifikant erhöht (Abb. 13B).

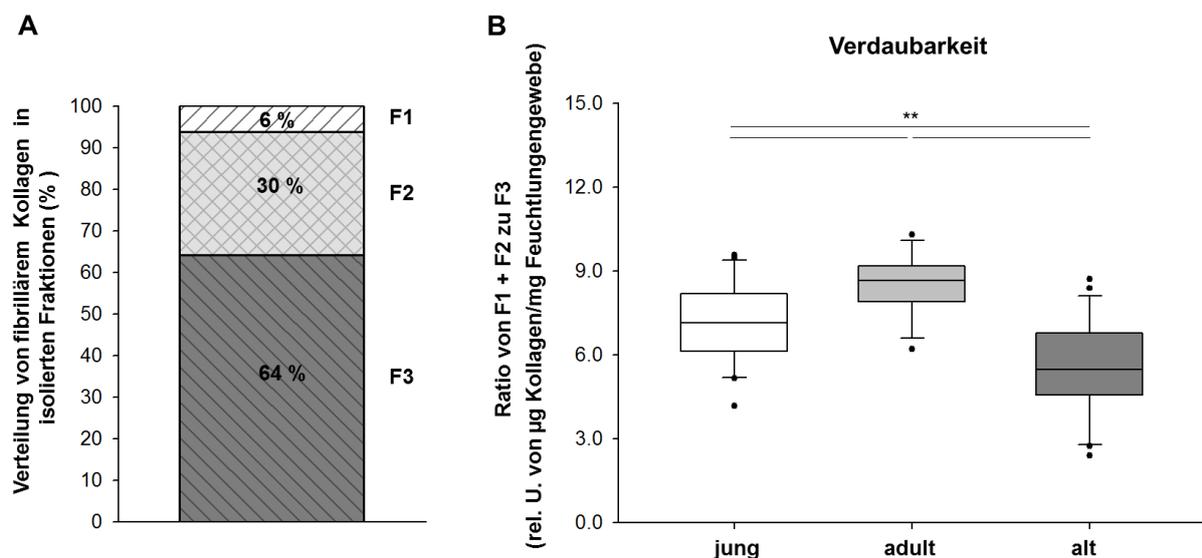


Abbildung 13: Isolation von fibrillärem Kollagen aus der Mauslunge A) Verteilung von fibrillärem Kollagen nach Pepsin-verdaubarer Fraktion (F1), Kollagenase Typ I- und Proteinase K-verdaubarer Fraktion (F2) sowie enzymatisch unverdaubarer Fraktion (F3) Die Werte sind als mittlerer prozentualer Anteil vom gesamten fibrillären Kollagen (n = 49 Mäuse) angegeben.

B) Einfluss der Lungenalterung der Maus auf die Verdaubarkeit von fibrillärem Kollagen Die Ergebnisse sind als Box-Plots mit $**P < 0,01$ vs. junge oder adulte Mäuse (jung n=21; adult n=11; alt n=17) angegeben.

Die enzymatisch nicht verdaubare Fraktion an fibrillärem Kollagen wies mit zunehmendem Alter eine erhöhte AGE-spezifische Fluoreszenz auf, wohingegen sich die Gehalte zweier ausgewählter spezifischer AGE-Modifikationen (ϵ -CML, Argpyrimidin) nicht änderten (Tab. 12).

Tabelle 12: AGE-Modifizierungen im unverdaubaren fibrillärem Kollagen (F3) der Mauslunge in Abhängigkeit vom Alter

AGE-Gehalt	jung (n = 21)	adult (n = 11)	alt (n = 17)
AGE-spezifische Fluoreszenz [µg mit Ribose (20 mM) modifizierten Kollagen]	24,35 ± 6,6	27,13 ± 3,97 *	29,29 ± 4,6 *
ε-CML [ng mit Ribose (20 mM) modifizierten Kollagen]	0,37 ± 0,4	0,28 ± 0,13	0,70 ± 0,9
Argpyrimidin [ng mit Methylglyoxal (10 mM) modifizierten Kollagen]	0,39 ± 0,4	0,58 ± 0,6	0,29 ± 0,4

Daten sind als MW ± SD mit * $P < 0,01$ vs. junge Mäuse angegeben.

Der Gehalt an AGE-spezifischer Fluoreszenz korrelierte zudem invers mit dem Gehalt an nicht verdaubarem fibrillärem Kollagen (Abb. 14).

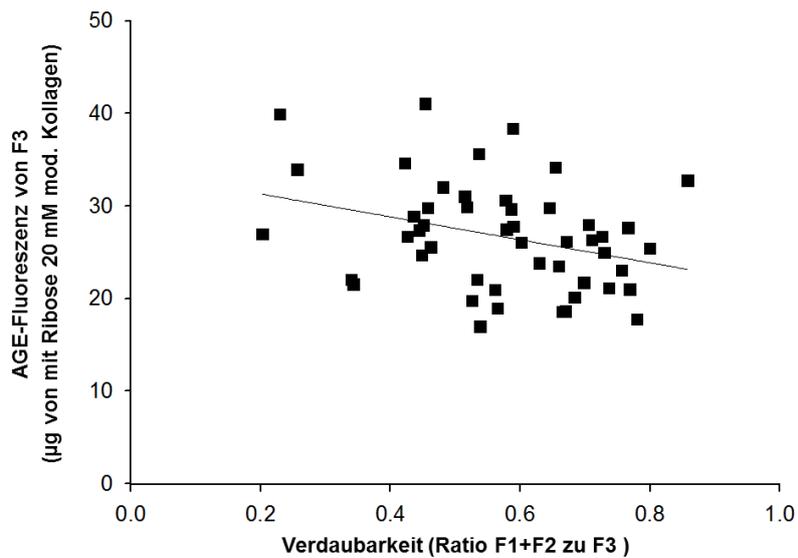


Abbildung 14: Korrelation der Verdaubarkeit von fibrillärem Kollagen aus der Lunge junger, adulter und alter Mäuse mit dem Gehalt an fluoreszierenden AGEs in der nicht verdaubaren Kollagenfraktion (F3) Pearson Korrelationskoeffizient $R=0,323$, $n=49$; $P=0,022$

6.3. Ursachen für den altersabhängigen verminderten Gehalt und die Aktivierung von CREB

Im weiteren Teil der Arbeit wurden die potentiellen Ursachen für den verminderten Gehalt und die Aktivität von CREB in der alten Mauslunge mittels geeigneter Zellmodelle untersucht. Hierfür wurden ausschließlich humane Zellmodelle genutzt. Zur Beurteilung der zellulären Seneszenz dienten humane Lungenfibroblasten, die aus einem Fötus (WI-38) bzw. von Erwachsenen (LuFi) abstammen. Zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress und AGE-modifizierter Matrix dienten Lungenepithelzelllinien bronchio-alveolären (NCI-H358) bzw. alveolären (A549) Ursprungs.

In allen Zellmodellen konnte der basale mRNA- und Proteingehalt von CREB nachgewiesen werden (Abb. 15). PCR-Analysen mit spezifischen Primern und nachfolgende DNA-Sequenzierungen zeigten dabei die vorherrschende Expression der CREB-Isoformen (CREB α und CREB Δ), wobei die CREB Δ mRNA stärker als die CREB α mRNA exprimiert war (Abb. 15A). Die CREB β mRNA konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

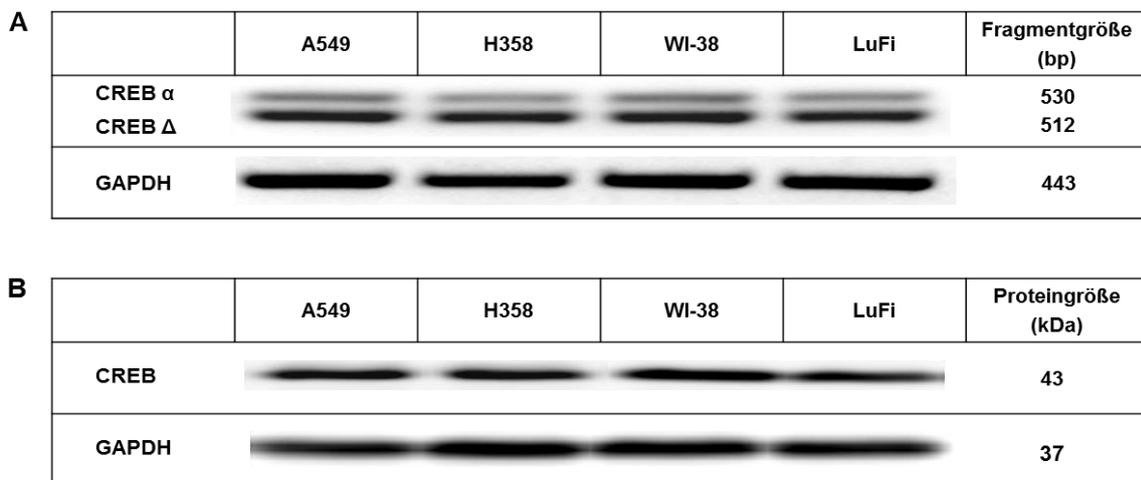


Abbildung 15: Der CREB-Gehalt in ausgewählten humanen Lungenzellmodellen und Fibroblasten der Lunge **A) Der mRNA-Gehalt von CREB-Isoformen** Die Analysen erfolgten in A549 und NCI-H358 Zelllinien und humanen Lungenfibroblasten (WI-38, LuFi) mittels RT-PCR. **B) Der CREB Proteingehalt** Der Nachweis erfolgte mittels Western-Blot. Repräsentative Darstellung für zwei unabhängige Versuche. Die Normalisierung erfolgte mittels GAPDH.

6.3.1. Zelluläre Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz humaner Lungenfibroblasten *in vitro* wurde durch Replikation hervorgerufen. Diese kennzeichnete sich durch Zunahme der Zellgröße, sinkenden Populationsverdopplungen sowie der Expression des Seneszenzmarkers SA- β -Gal aus (Abb. 16A, B). Anschließende CREB-Analysen erfolgten mit Fibroblasten 1,5<PD und 1,5>PD, die im Folgenden immer als präseneszent bzw. seneszent bezeichnet werden.

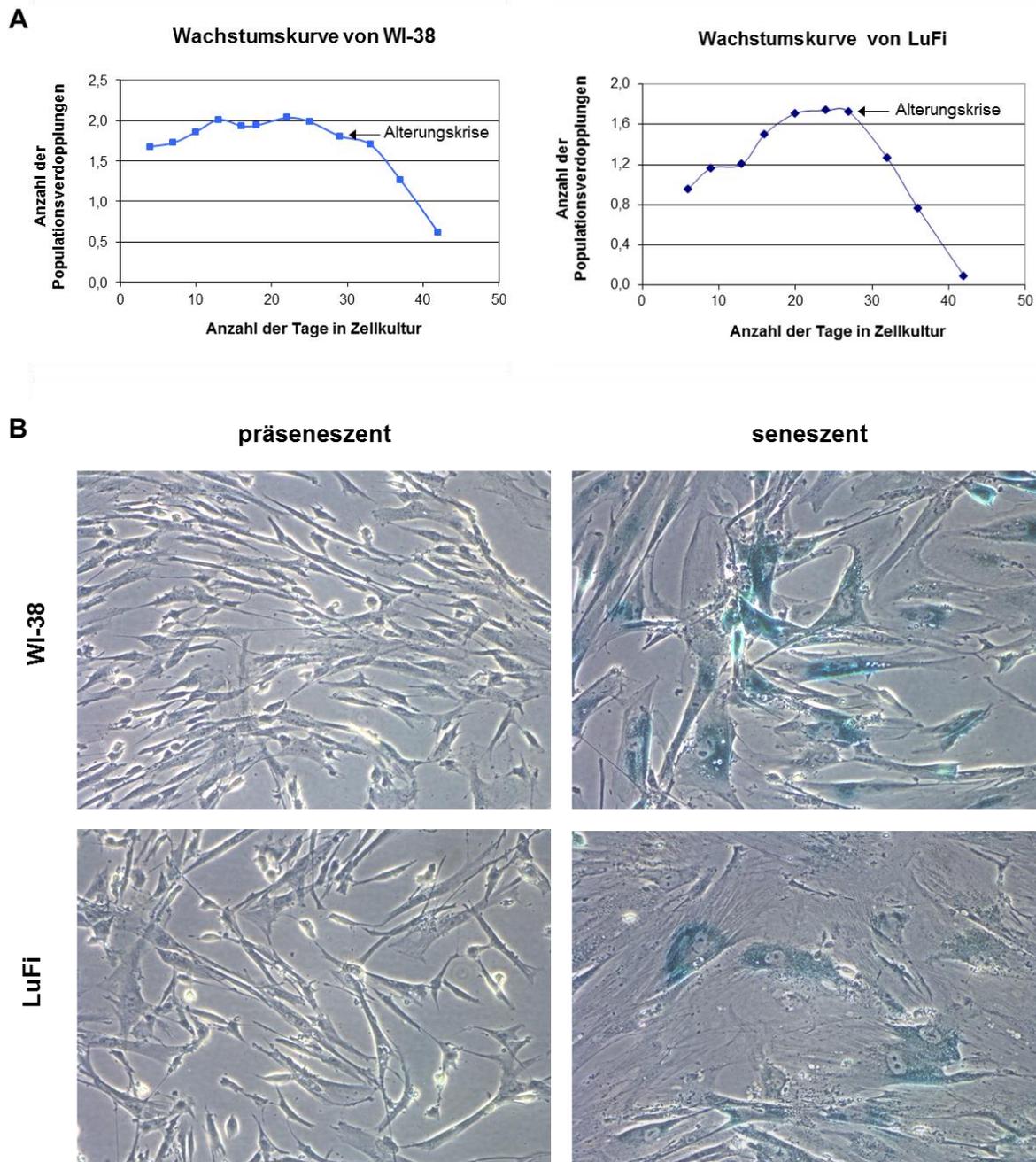
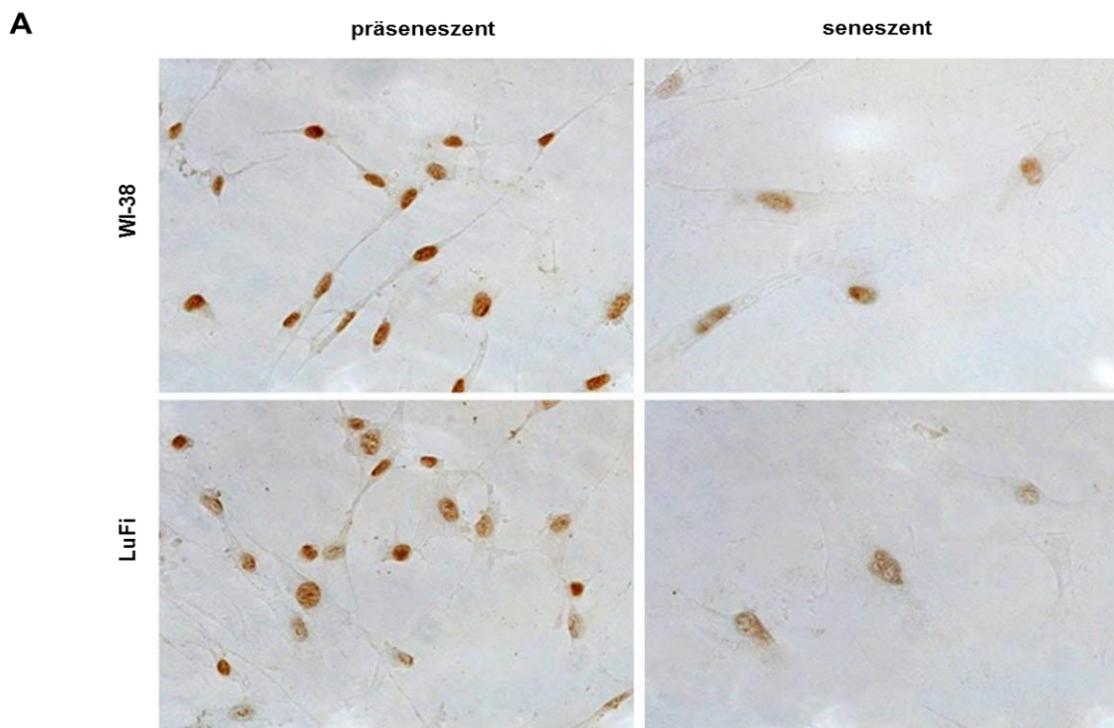


Abbildung 16: Nachweis der zellulären Seneszenz in humanen Fibroblasten (WI-38, LuFi) anhand von A) Wachstumskinetik und B) Expression des Seneszenzmarkers SA- β -Gal. Zellen, die SA- β -Gal exprimieren, erscheinen blau (seneszente Zellen). Es sind repräsentative Experimente und Bilder gezeigt.

In humanen Lungenfibroblasten zeigte die zelluläre Seneszenz keinen auffallenden Einfluss auf den mRNA-Gehalt der vorherrschenden CREB-Isoformen α und Δ (Abb. 17), wohingegen der Proteingehalt von CREB deutlich reduziert war (Abb. 18A, B). Zudem war auch die Forskolin-induzierte Phosphorylierung von CREB in den seneszenten Lungenfibroblasten vermindert (Abb. 18C).

	WI-38		LuFi		Fragmentgröße [bp]
	präseneszent	seneszent	präseneszent	seneszent	
CREB α					530
CREB Δ					512
GAPDH					443

Abbildung 17: Einfluss der zellulären Seneszenz auf die CREB mRNA-Expression von humanen Fibroblasten Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige RT-PCRs. Die Normalisierung erfolgte mittels GAPDH.



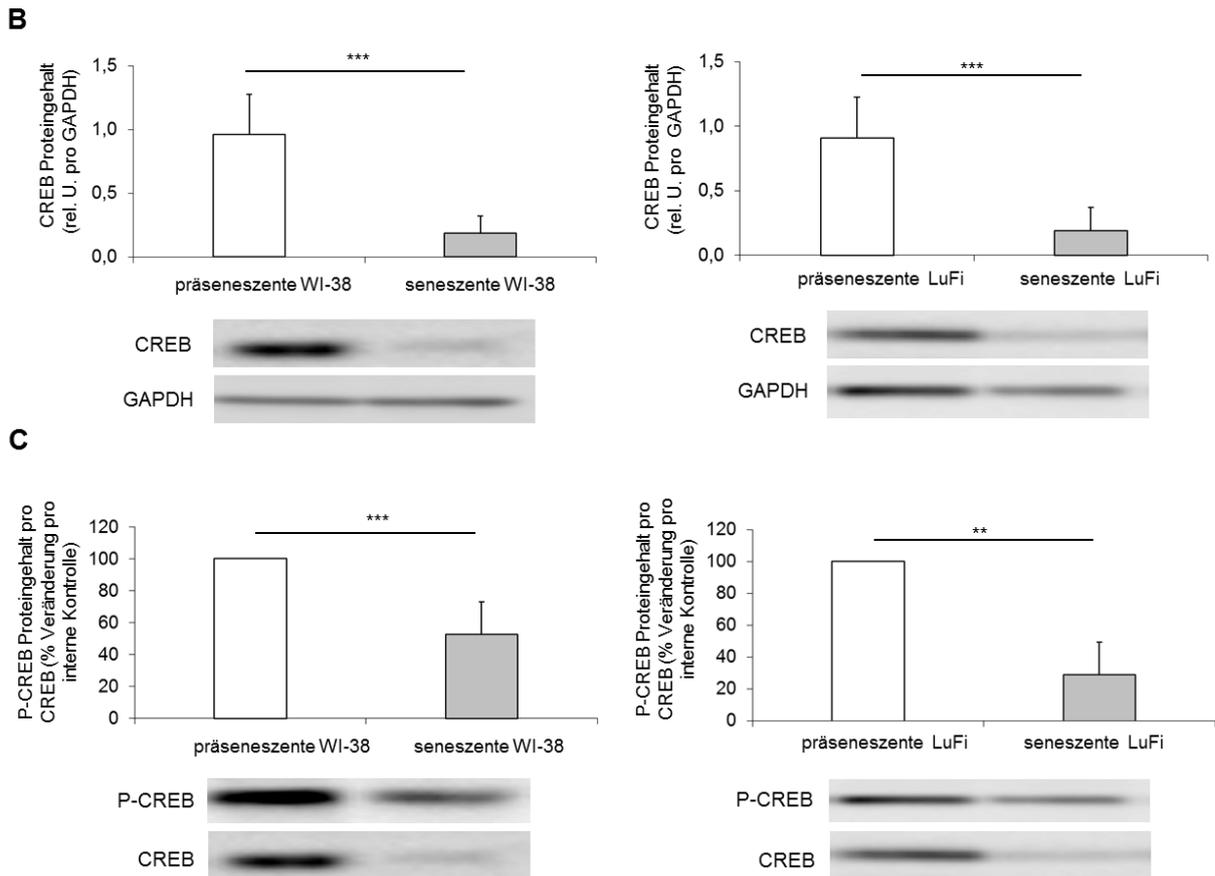


Abbildung 18: Einfluss der zellulären Seneszenz auf den Proteingehalt und die Aktivierung von CREB in humanen Fibroblasten (WI-38, LuFi) A) Immunocytochemischer Nachweis von CREB in präseneszenten und seneszenten Fibroblasten Die braune Färbung zeigt CREB in den Zellkernen. B) Mittlerer Gehalt an CREB und C) P-CREB nach Forskolin-Stimulation in WI-38 und LuFi. CREB und P-CREB wurde per Western Blot-Technik bestimmt und die Signalstärke densitometrisch ausgewertet. Die Forskolin-Stimulation erfolgte mit 10 μ M für 10 min. Die Ergebnisse sind als MW \pm SD (n=3) dargestellt mit ** $P \leq 0,01$ und *** $P \leq 0,001$ vs. präsenescente Lungenfibroblasten.

Senescente Lungenfibroblasten hatten allerdings keinen Einfluss auf den Proteingehalt an CREB in benachbarten Zellen. Dies konnte in indirekten Kokulturen von Alveolarepithelzellen mit humanen Fibroblasten WI-38 oder LuFi gezeigt werden (Abb. 19).

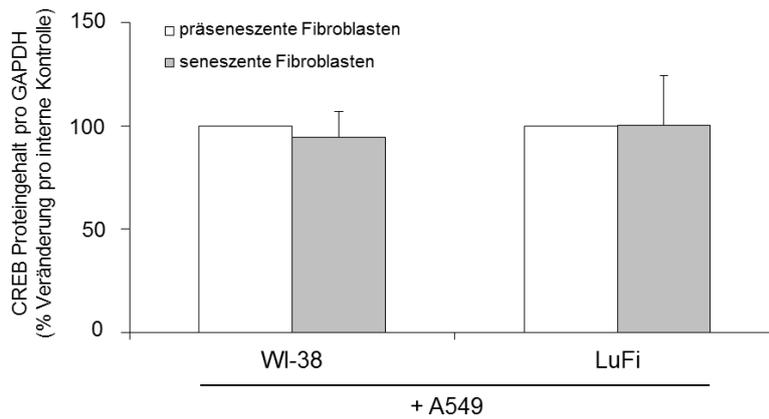


Abbildung 19: Einfluss von seneszenten humanen Lungenfibroblasten auf den Gehalt an CREB in humanen Alveolarepithelzellen A549-Zellen wurden mit präseneszenten bzw. seneszenten Lungenfibroblasten WI-38 oder LuFi für 72 h kokultiviert. Danach wurde CREB in A549 per Western Blot-Technik bestimmt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind als MW \pm SD (n = 3) vs. präsenesente Lungenfibroblasten dargestellt.

6.3.2. AGE-modifizierte Matrix und oxidativer Stress

Das Verhalten adhärenter Zellen hängt stark von der Quantität und Qualität der EZM ab, auf der sich die Zellen befinden. Da mit zunehmendem Alter die EZM der Lunge post-translational durch AGEs modifiziert ist (Tab. 12), könnte auch dies einen Einfluss auf die Expression und Aktivierung von CREB in den Lungenzellen haben. Daher wurde zunächst AGE-modifiziertes Kollagen durch Behandlung von Kollagen Typ I mit entweder Ribose als Zucker oder Glyoxal als reaktives α -Dicarbonyl hergestellt. Dieses ist durch eine deutliche AGE-Ansammlung gekennzeichnet, die anhand der AGE-spezifischen Fluoreszenz, AGE-spezifischen Bräunung (Absorptionsmessung) und Immunodetektion auf ϵ -CML nachgewiesen werden konnte (Abb. 20).

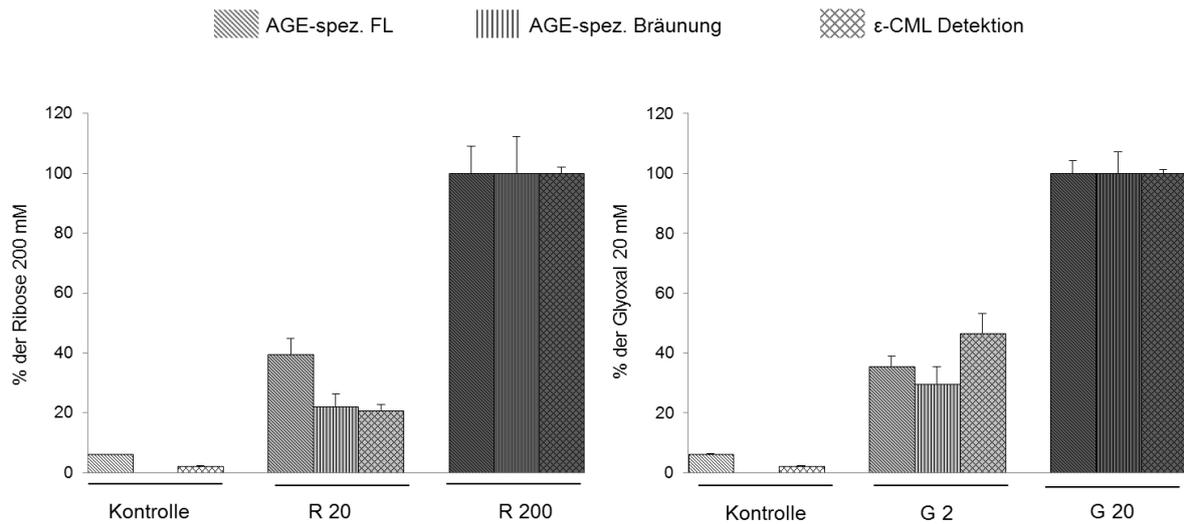


Abbildung 20: AGE-Modifikationen von Kollagen Typ I nach Behandlung mit Ribose oder Glyoxal

Kollagen Typ I wurde *in vitro* mit 20 mM (R 20) oder 200 mM (R 200) Ribose bzw. 2 mM (G 2) oder 20 mM (G 20) Glyoxal für 4 bis 6 Tage bei 37 °C inkubiert. Aufgrund nicht-detektierbarer Modifikationen in den unbehandelten Kollagenansätzen wurden die maximalen Messdaten als 100 % betrachtet und die anderen Messdaten darauf bezogen. Alle Daten sind als MW ± SD (n = 2) dargestellt, und *vs.* interne Kontrolle sind alle Daten signifikant mit $P \leq 0,0001$.

Die Kultivierung humaner Alveolarepithelzellen (A549) auf Kollagen, welches zuvor mit Ribose oder Glyoxal AGE-modifiziert worden ist, scheint zu keinem veränderten mRNA-Gehalt der vorherrschenden CREB-Isoformen α und Δ zu führen (Abb. 21).

	Kontrolle	R20	R200	Kontrolle	G2	G20	Fragmentgröße [bp]
CREB α							530
CREB Δ							512
18s rRNA							345

Abbildung 21: Einfluss der AGE-modifizierten Kollagen-Matrix auf den mRNA-Gehalt von CREB in Alveolarepithelzellen A549 wurden auf Kollagen Typ I, welches mit Ribose: 20 mM (R20), 200 mM (R200); mit Glyoxal: 2 mM (G2), 20 mM (G20) modifiziert worden ist, für 72 h kultiviert. Der mRNA-Gehalt der CREB-Isoformen wurde im Vergleich zur 18s rRNA mittels semiquantitiver RT-PCR ermittelt.

Dahingegen beeinflusst AGE-modifiziertes Kollagen die Proteinmenge von CREB (Abb. 22A) sowie die Forskolin-induzierte Aktivierbarkeit von CREB (Abb. 22B) negativ. Dies konnte sowohl für Ribose- als auch für Glyoxal-modifiziertes Kollagen gezeigt werden (Abb. 22). Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, war dieser Effekt besonders bei den höheren AGE-Modifikationen erkennbar.

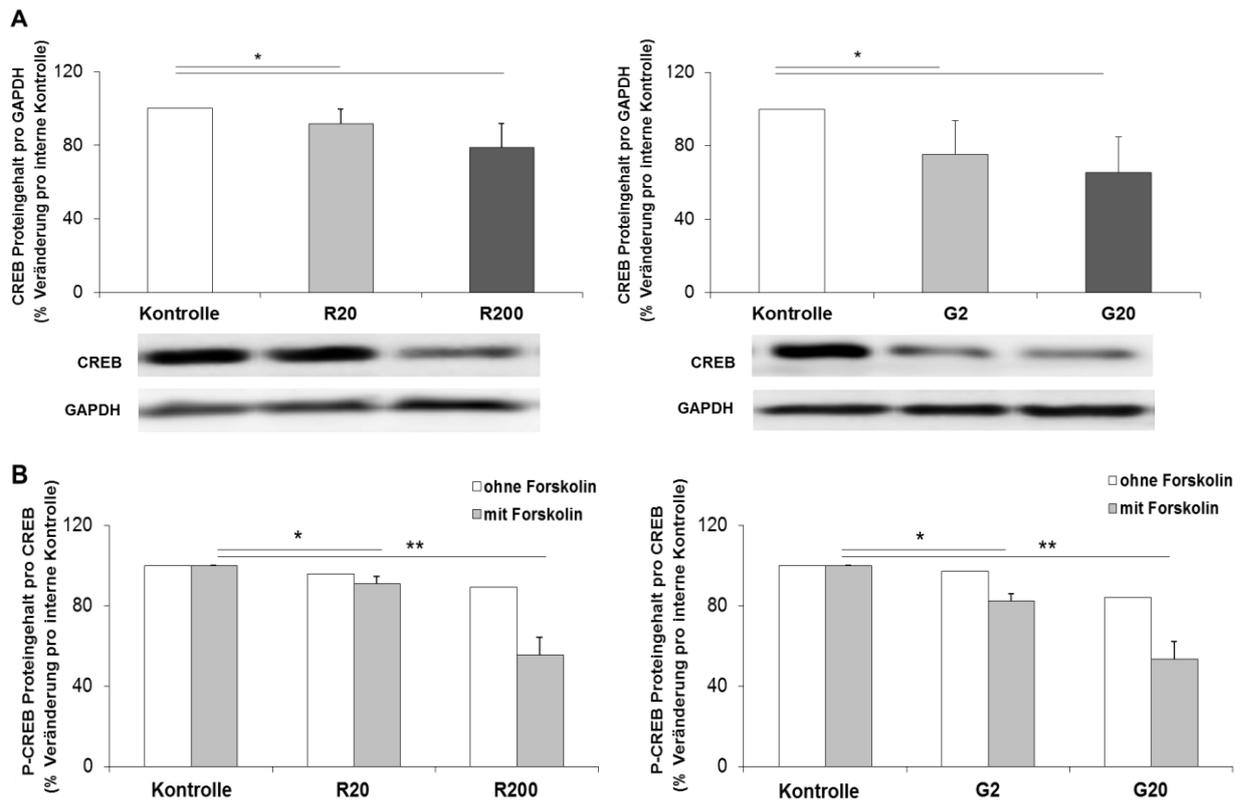


Abbildung 22: Einfluss AGE-modifizierter Kollagen-Matrix auf den Gehalt an CREB und P-CREB in humanen Alveolarepithelzellen A549 wurden auf Kollagen Typ I kultiviert, das zuvor mit entweder Ribose oder Glyoxal modifiziert worden ist und auf den basalen Gehalt an CREB (A) sowie durch Forskolin (10 μ M für 10 min) induzierte Phosphorylierung von CREB (B) untersucht. CREB und P-CREB wurden per Western Blot-Technik bestimmt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 9) mit * $P \leq 0,05$ und ** $P \leq 0,01$ vs. (interner) unbehandelter Kontrolle angegeben. (R20=20 mM Ribose; R200= 200 mM Ribose; G2=2 mM Glyoxal; G20=20 mM Glyoxal)

Im Gegensatz zur AGE-modifizierten Kollagen-Matrix hatte die EZM welche aus seneszenten Fibroblasten (WI-38, LuFi) sezerniert wird, keinen Einfluss auf den Proteingehalt von CREB in A549-Zellen im Vergleich zur EZM aus präseneszenten Fibroblasten (Abb. 23).

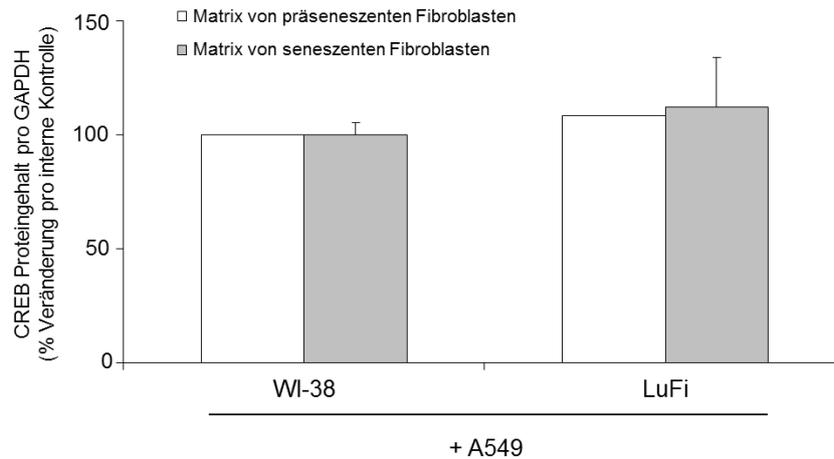


Abbildung 23: Einfluss der EZM von seneszenten humanen Lungenfibroblasten auf den Proteingehalt an CREB in Alveolarepithelzellen A549-Zellen wurden auf EZM, die von präseneszenten und seneszenten Fibroblasten (WI-38, LuFi) isoliert worden ist, für 72 h kultiviert. CREB wurde per Western Blot-Technik bestimmt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 3) angegeben.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von chronischem oxidativen Stress auf den Proteingehalt an CREB in Alveolarepithelzellen (A549) untersucht. Dieser wurde durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) induziert. Die Untersuchungen zeigten, dass der Proteingehalt an CREB nach 48 h Behandlung mit mindestens $50 \mu M H_2O_2$ bzw. mindestens $10 \mu M$ SIN-1 signifikant vermindert ist (Abb. 24). Kürzere Behandlungszeiten führten dagegen noch nicht zur Verminderung des CREB-Proteingehaltes (nicht gezeigt).

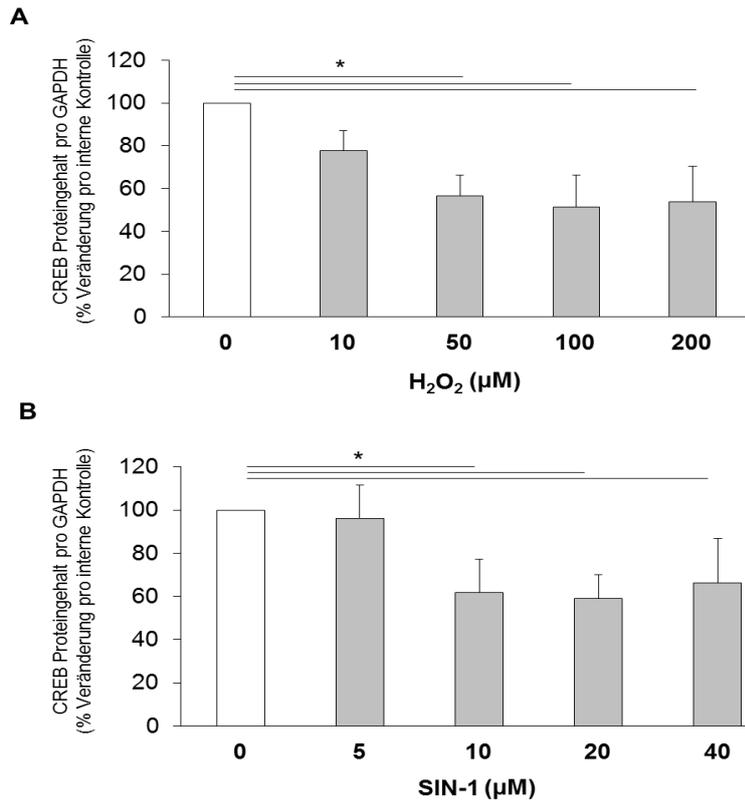


Abbildung 24: Einfluss von chronischem oxidativen Stress auf den Proteingehalt von CREB in (humanen) Alveolarepithelzellen

A549-Zellen wurden konzentrationsabhängig mit H₂O₂ (A) oder mit SIN-1 (B) für 48 h behandelt. CREB wurde per Western Blot-Technik bestimmt und die Signale densitometrisch ausgewertet. Die Daten sind als MW ± SD (n = 5) mit *P<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle angegeben.

6.4. Regulation des altersabhängigen CREB-Proteingehalts

Der differentielle Einfluss des Alterns auf die Protein- aber nicht mRNA-Gehalte in der Mauslunge deuten darauf hin, dass der verminderte CREB-Gehalt in der alten Mauslunge nicht auf transkriptionelle sondern auf post-transkriptionelle/-translationale Prozesse zurückzuführen ist. Einerseits können miRNAs an der CREB Regulation beteiligt sein, andererseits aber auch ein verstärkter UPS-vermittelter Proteinabbau.

Da die miRNA-34b durch Bindung an die 3' UTR der CREB mRNA die Proteintranslation von CREB blockieren kann (Pigazzi *et al.*, 2009), wurde zunächst der Gehalt an miR-34b analysiert. Diese Analysen zeigten, dass mehr miR-34b in seneszenten humanen Lungenfibroblasten (WI-38, LuFi) vorliegt als in den präseneszenten Fibroblasten (Abb. 25). Dahingegen konnten in humanen Alveolarepithelzellen (A549), die auf AGE-modifiziertem Kollagen kultiviert worden sind, sowie im Gesamtlungengewebe alter Mäuse keine Unterschiede gefunden werden (Abb. 25).

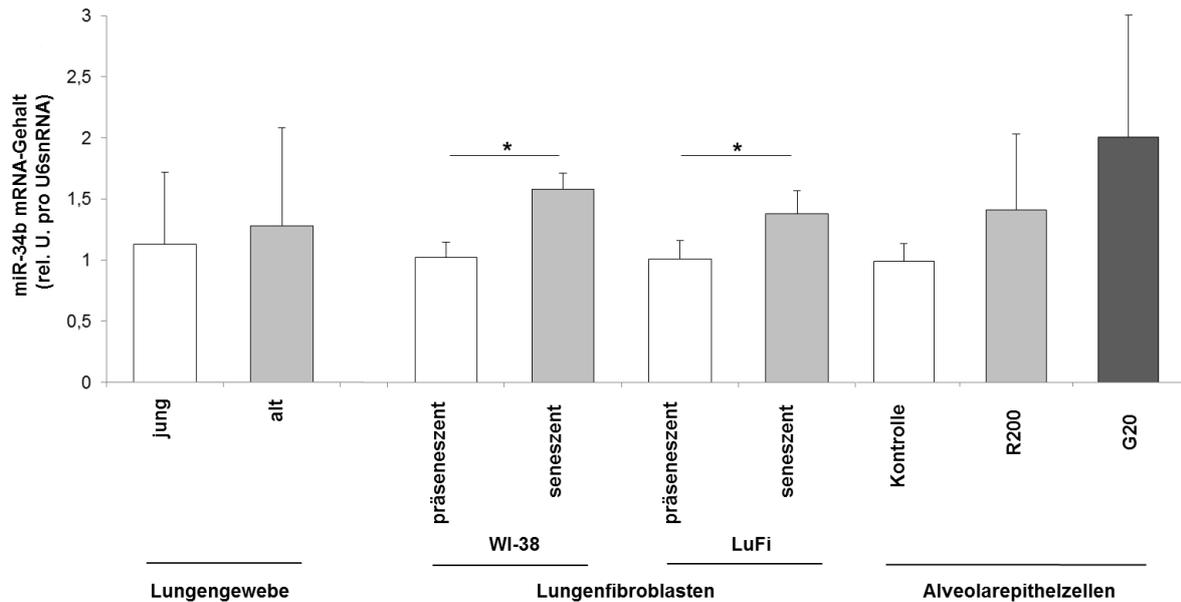


Abbildung 25: Einfluss von Lungenalterung, zellulärer Seneszenz und AGE-modifiziertem Kollagen Typ I auf den Gehalt der miRNA-34b Die Daten sind per quantitativer *Real-time* PCR ermittelt und als MW \pm SD (n = 3) mit * $P < 0,05$ vs. interne Kontrollexperimente angegeben. (R200=200 mM Ribose; G20=20 mM Glyoxal)

Zusätzlich zur miR-34b wurde auch die Ubiquitinierung von CREB analysiert, um die potentielle Bedeutung des UPS zu klären. Diese Analysen zeigten eine deutliche Zunahme von ubiquitiniertem CREB sowohl in Lungengewebe alter Mäuse als auch in den seneszenten humanen Lungenfibroblasten (WI-38, LuFi) (Abb. 26). Humane Lungenepithelzellen (A549), die auf AGE-modifiziertem Kollagen kultiviert worden sind, wiesen keine differentielle Ubiquitinierung von CREB auf (Abb. 26). Nachfolgende Studien mit seneszenten humanen Lungenfibroblasten und Proteasomen-Inhibitoren (MG-132, Lactacystin) mussten aufgrund einer zu hohen Toxizität dieser Substanzen abgebrochen werden. Daher kann keine absolute Aussage über die Bedeutung des UPS bei der CREB-Reduktion während der Zellalterung getroffen werden.

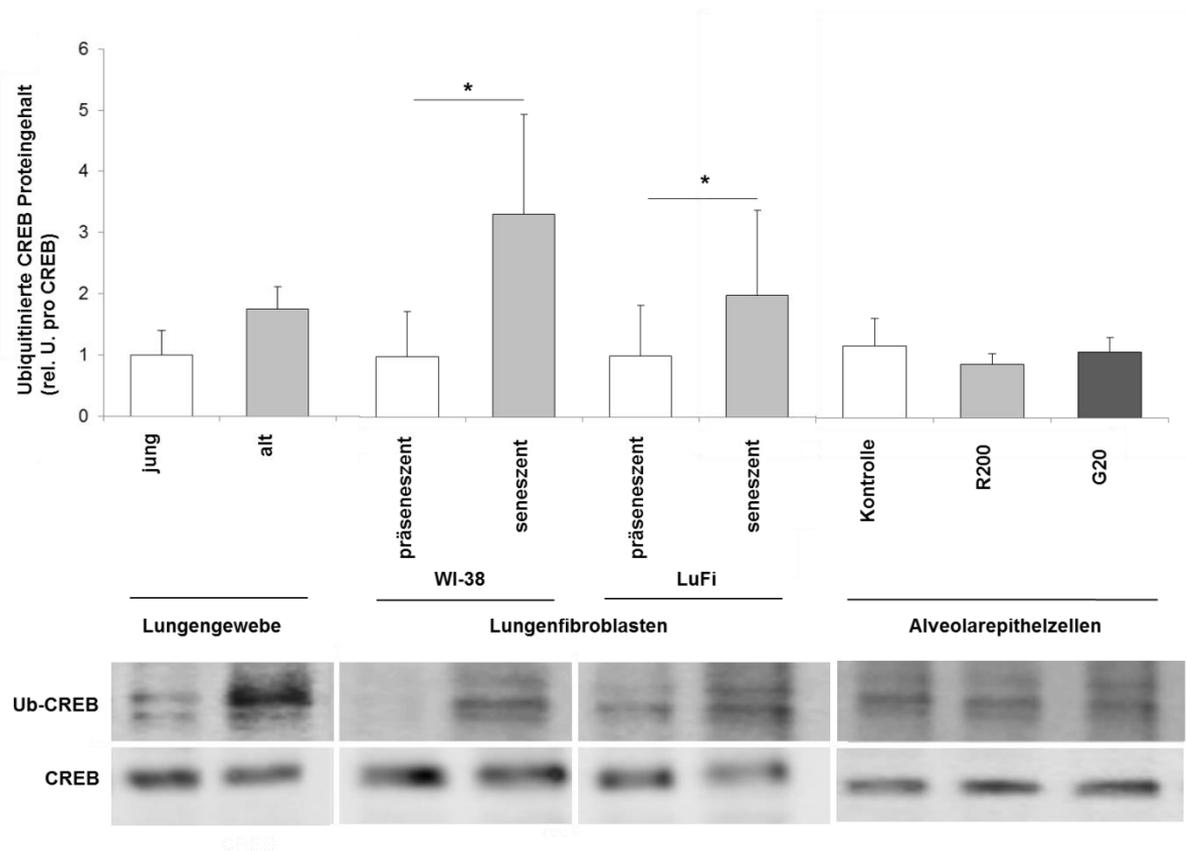


Abbildung 26: Einfluss von Lungenalterung, zellulärer Seneszenz und AGE-modifiziertem Kollagen Typ I auf die Ubiquitinierung von CREB CREB wurde aus dem Gesamtproteinlysat immunopräzipitiert und der Gehalt an CREB per Western Blot-Technik bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Nach Einstellung vergleichbarer CREB-Gehalte wurde in weiteren Western Blots die Menge an ubiquitiniertem CREB und absolutem CREB bestimmt und die Ratio ermittelt. Es sind die MW \pm SD (Lungengewebe n=4; WI-38 n=4; LuFi n=5; Alveolarepithelzellen n=3) angegeben mit $*P \leq 0,05$ vs. interne Kontrollen.

6.5. Zellbiologische Bedeutung der verminderten CREB Proteinmenge

Die bisherigen Untersuchungen zeigten klar, dass das Altern der Lunge sowie das Altern von Zellen aus der Lunge mit einem verminderten Gehalt an CREB einhergeht. Aus diesem Grund sollte nun die zellbiologische Bedeutung von CREB durch *knockdown*-Experimente mit *small interference* RNA (siRNA) analysiert werden.

6.5.1. CREB *knockdown* und Zellverhalten

Dazu wurde der Proteingehalt von CREB mittels siRNA-Transfektion in humanen Alveolarepithelzellen (A549) sowie in humanen Lungenfibroblasten (WI-38) herunterreguliert (Abb. 27). Voranalysen zeigten, dass eine Behandlung der Zellen mit der CREB siRNA für mindestens 72 h notwendig ist, um eine ausreichend hohe CREB-Reduktion zu erreichen (nicht gezeigt).

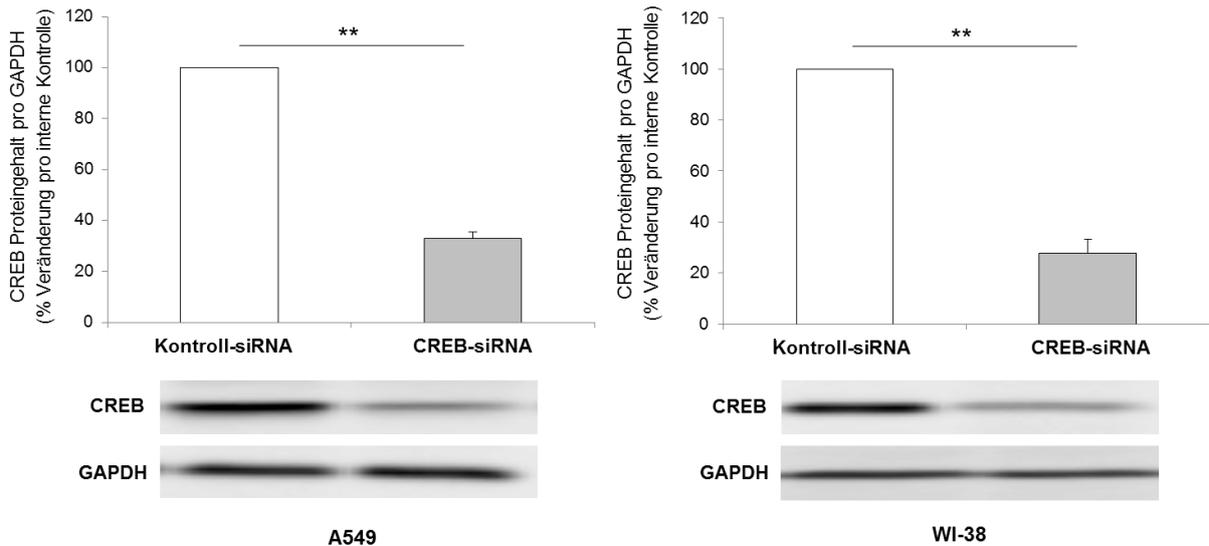
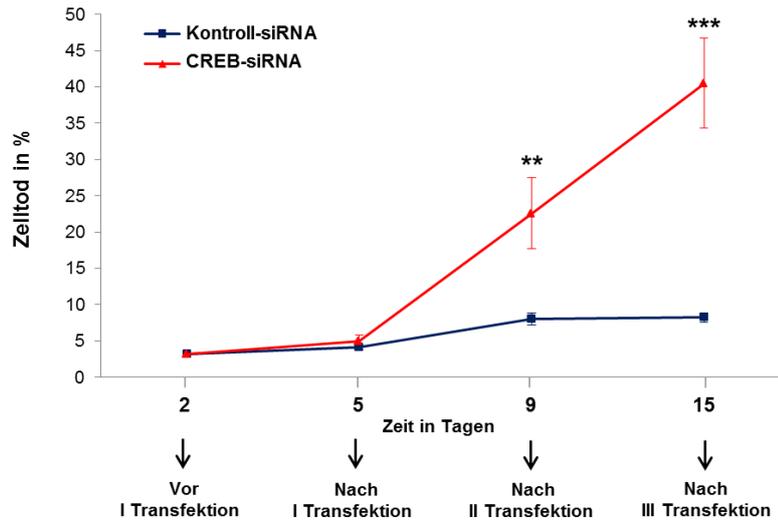


Abbildung 27: CREB siRNA-vermittelte Reduktion von CREB in humanen Alveolarepithelzellen und Lungenfibroblasten A549 bzw. WI-38 wurden für 72 h mit 100 nM CREB-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und der CREB-Proteingehalt per Western Blot-Technik mit nachfolgender densitometrischer Auswertung bestimmt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 4) mit **** $P \leq 0,01$** vs. Kontroll-siRNA-Transfektion angegeben.

Am Beispiel der primären humanen Lungenfibroblasten WI-38 wurde zunächst der Einfluss einer chronischen Reduktion von CREB auf die Vitalität und Proliferation der Zellen untersucht. Die chronische CREB-Reduktion wurde mittels des siRNA-Transfektionsschemas erreicht, das in Abb. 6 detailliert dargestellt ist. Da primäre WI-38 im Gegensatz zur Alveolarepithelzelllinie A549 altern, wurden zudem Analysen zur zellulären Seneszenz durchgeführt. Insgesamt zeigten diese Analysen, dass die chronische Reduktion von CREB in WI-38 mit einer Zunahme des Zelltodes verbunden ist, was sowohl mit Trypanblau-Färbung (Abb. 28A) als auch mit PI-Färbung (nicht gezeigt) nachgewiesen werden konnte. Dabei nahm die Proliferation der noch lebenden Zellen gleichzeitig ab (Abb. 28B). Zum Endzeitpunkt der Untersuchungen (nach 15 Tagen) konnte zudem eine signifikant höhere Anzahl an WI-38 mit seneszentem Zellcharakter nachgewiesen werden. So war die Anzahl der WI-38 mit SA- β -Gal-Aktivität nahezu verdreifacht (Abb. 29B), und die Zellen zeigten zudem die für seneszente Fibroblasten charakteristische Zunahme der Zellgröße (Abb. 29A).

A



B

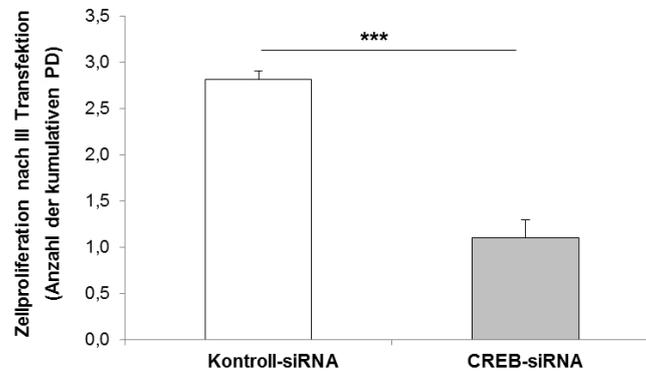


Abbildung 28: Chronischer CREB knockdown in humanen Lungenfibroblasten und sein Einfluss auf Zelltod und Zellproliferation WI-38 wurden mit 100 nM CREB-siRNA bzw. Kontroll-siRNA (siehe Abb.7) transfiziert und auf Zelltod mittels Trypanblau-Färbung (A) sowie Zellproliferation mittels Zellzählung der lebenden Zellen (B) analysiert. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 5) mit $**P \leq 0,01$ und $***P \leq 0,001$ vs. Kontroll-siRNA-Transfektion angegeben.

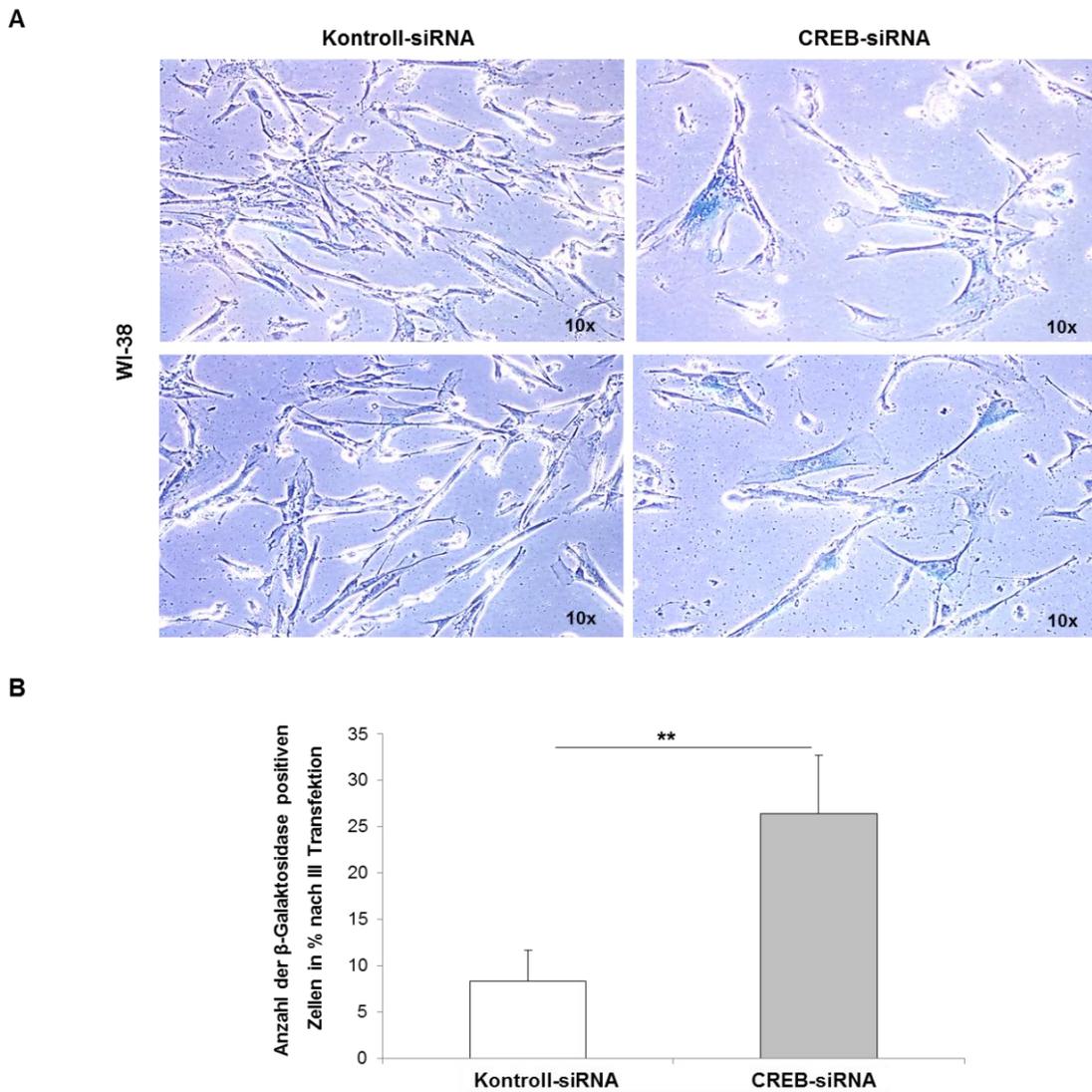


Abbildung 29: Chronischer CREB knockdown in humanen Lungenfibroblasten und sein Einfluss auf zelluläre Seneszenz WI-38 wurden mit 100 nM CREB-siRNA bzw. Kontroll-siRNA (siehe Abb. 6) transfiziert und zytochemisch auf zelluläre Seneszenz mittels SA- β -Gal Färbung (A) und mittels Zellzählung der lebenden Zellen (B), die SA- β -Gal (blaue Zellen) exprimieren, analysiert. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 3) mit ****** $P \leq 0,01$ vs. Kontroll-siRNA-Transfektion angegeben

6.5.2. CREB knockdown und Genexpressionsveränderungen

Die chronische Reduktion von CREB mittels siRNA-Transfektion hatte nicht nur einen Einfluss auf das Zellverhalten sondern ging auch mit einem veränderten Genexpressionsprofil einher. Dieses wurde bereits nach 72 h CREB knockdown bestimmt, d.h. zu einem Zeitpunkt als der CREB knockdown noch keinen nachteiligen Einfluss auf die Zellvitälität hatte (Abb. 28A). So konnten mittels DNA-Mikroarray-Analyse 164 Gene identifiziert werden, welche nach CREB knockdown in den humanen Lungenfibroblasten WI-38 sowie in den Alveolarepithelzellen A549 zugleich vermindert exprimiert waren. Ein anschließender *vice versa*-Vergleich mit DNA-

Mikroarray-Daten von Lungengeweben junger und alter Mäuse zeigte aber, dass von diesen 164 Genen nur 15 Gene auch im gesamten Lungengewebe alter Mäuse vermindert exprimiert waren (Abb. 30).

Von diesen 15 Genen wurden 6 Gene ausgewählt, die nach Literaturstudium eine wichtige pulmonale Funktion haben könnten. Bei diesen Genen handelt es sich um ATXN1, IGFBP3, PVR, RAB27A, SUMO3 und TET2 (Abb. 30). Eine anschließende Verifizierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels *Real-time* PCR bestätigte vor allem die Ergebnisse für IGFBP3, RAB27A und SUMO3 (Tab. 13).

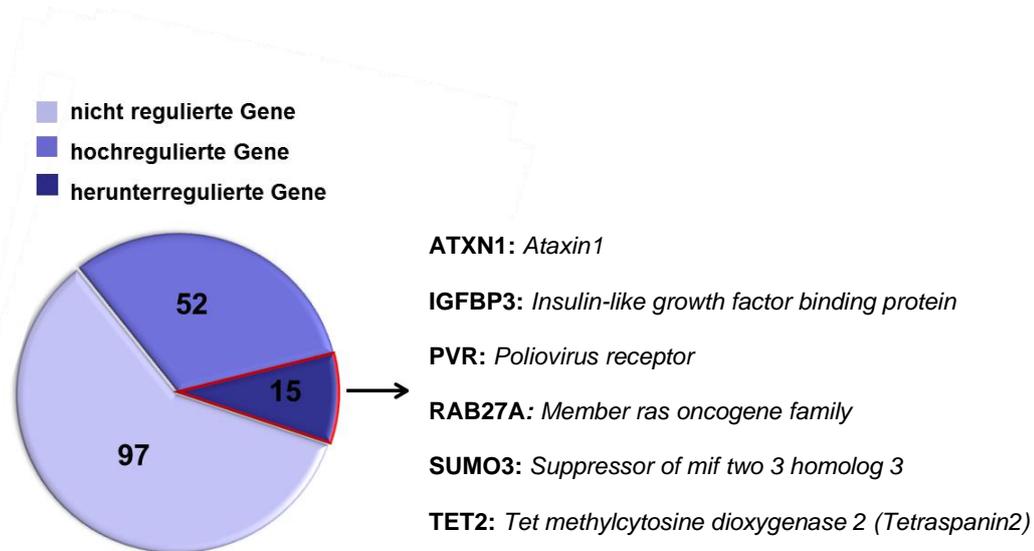


Abbildung 30: 164 Gene, die durch den CREB *knockdown* vermindert exprimiert waren, und deren relative Expression in den Lungen alter Mäuse im Vergleich zu jungen Mäusen

CREB siRNA-Transfektion verringert die Expression von 164 gleichen Genen in den Lungenfibroblasten WI-38 und den Alveolarepithelzellen A549 (DNA-Mikroarray-Analysen). Das Kreisdiagramm zeigt den relativen mRNA-Gehalt dieser 164 Gene in den Lungen alter Mäuse im Vergleich zu denen junger Mäuse.

Tabelle 13: Verifizierung der Microarray-Daten von ausgewählten Genen nach CREB *knockdown* in Lungenfibroblasten (WI-38) und Alveolarepithelzellen (A549) mittels *Real-time* PCR

Zelltyp	Relativer mRNA-Gehalt pro Kontroll-siRNA					
	ATXN1	IGFBP3	PVR	RAB27A	SUMO3	TET2
WI-38	0,99 ± 0,06	0,23 ± 0,03 *	0,57 ± 0,26	0,46 ± 0,04 **	0,69 ± 0,04 *	0,75 ± 0,19
A549	1,14 ± 0,05	0,35 ± 0,28 *	1,04 ± 0,25	0,77 ± 0,15 *	0,68 ± 0,09 *	0,81 ± 0,10

Real-time PCR mit interner Normalisierung des mRNA-Gehaltes per β -Aktin mRNA. Daten sind als MW \pm SD (n = 3) mit * $P \leq 0,05$ bzw. ** $P \leq 0,01$ vs. Kontroll-siRNA-Transfektion angegeben.

6.5.3. Einfluss von Lungenalterung, zellulärer Seneszenz und AGE-modifiziertem Kollagen auf den mRNA-Gehalt potentieller CREB-Targetgene

IGFBP3, RAB27A und SUMO3 konnten anhand der bisherigen Ergebnisse als potentielle Targetgene von CREB identifiziert werden, welche auch bei der Lungenalterung eine entscheidende Rolle spielen könnten (Abb. 30; Tab. 13). Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression dieser Gene sowohl in alten murinen Lungengeweben, seneszenten humanen Lungenfibroblasten als auch in Alveolarepithelzellen, die auf AGE-modifiziertem Kollagen Typ I kultiviert worden sind, untersucht. Die Analysen zeigen, dass besonders der RAB27A mRNA-Gehalt unter allen drei Bedingungen reduziert war (Tab. 14). Dagegen konnten die Ergebnisse für SUMO3 und IGFBP3 nur partiell bestätigt werden. So war die mRNA-Expression von SUMO3 nur in A549-Zellen, die auf AGE-modifiziertem Kollagen Typ I kultiviert wurden, signifikant reduziert (Tab. 14). Die verminderte mRNA-Expression von IGFBP3 konnte lediglich in den Lungengeweben alter Mäuse verifiziert werden (Tab. 14).

Tabelle 14: Einfluss der Lungenalterung der Maus, zellulärer Seneszenz und AGE modifizierter Kollagen-Matrix auf den mRNA-Gehalt der CREB-Targetgene (Real-time PCR)

		Relativer mRNA-Gehalt pro interner Kontrolle ^a		
		IGFBP3	RAB27A	SUMO3
Lungen alter Mäuse	Gewebe (n=10)	0,72 ± 0,17 **	0,68 ± 0,37 *	1,18 ± 0,43
Zelluläre Seneszenz von humanen Lungenfibroblasten	WI-38 (n=4)	2,94 ± 2,47	0,57 ± 0,12 **	1,08 ± 0,32
	LuFi (n=5)	2,41 ± 1,66	0,67 ± 0,23 *	0,97 ± 0,36
Humane Alveolarepithelzellen (A549) auf AGE-modifiziertem Kollagen Typ I	20 mM Ribose (n=4)	0,90 ± 0,05	0,51 ± 0,22 *	0,55 ± 0,10 *
	200 mM Ribose (n=4)	0,89 ± 0,29	0,61 ± 0,29	0,58 ± 0,15 *

Real-time PCR mit interner Normalisierung des mRNA-Gehaltes per ATP5A1 mRNA (Lungengewebe) oder per GAPDH mRNA (humane Lungenfibroblasten bzw. Alveolarepithelzellen). Daten sind als MW ± SD mit * $P \leq 0,05$ bzw. ** $P \leq 0,01$ vs. jeweilige interne Kontrolle dargestellt.

^ainterne Kontrollen sind entweder die Lungengewebe junger Mäuse, präseneszente Lungenfibroblasten oder A549 auf unbehandeltem Kollagen. Die Ergebnisse der Kontrollen sind als 1,00 zu betrachten.

7. Diskussion

Die Alterung der Lunge ist mit Veränderungen der Lungenstruktur und infolge dessen auch mit einer Reihe physiologischer Veränderungen verbunden. Hierbei dürften Transkriptionsfaktoren essentiell beteiligt sein, da diese die Expression einer großen Vielzahl von Genen und somit ein ganzes Spektrum an physiologischen Prozessen beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei der Alterung der Lunge der Transkriptionsfaktor CREB eine entscheidende Rolle spielt. Sowohl der Gehalt an totalem CREB als auch an phosphoryliertem (aktivem) CREB waren in der alten Lunge reduziert. Als mögliche Ursache für die alters-assoziierte CREB-Reduktion konnten zelluläre Seneszenz, oxidativer Stress sowie AGE-Modifizierung der EZM identifiziert werden. Eine permanente Reduktion von CREB in Lungenzellen führte zu verminderter Zellproliferation und Vitalität mit gleichzeitiger Zunahme an seneszenten Zellen. Daher tragen der reduzierte Gehalt und die reduzierte Aktivierung von CREB signifikant zu einigen altersabhängigen Veränderungen in der Lungenstruktur und somit physiologischen Veränderungen der alten Lunge bei. Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 31.

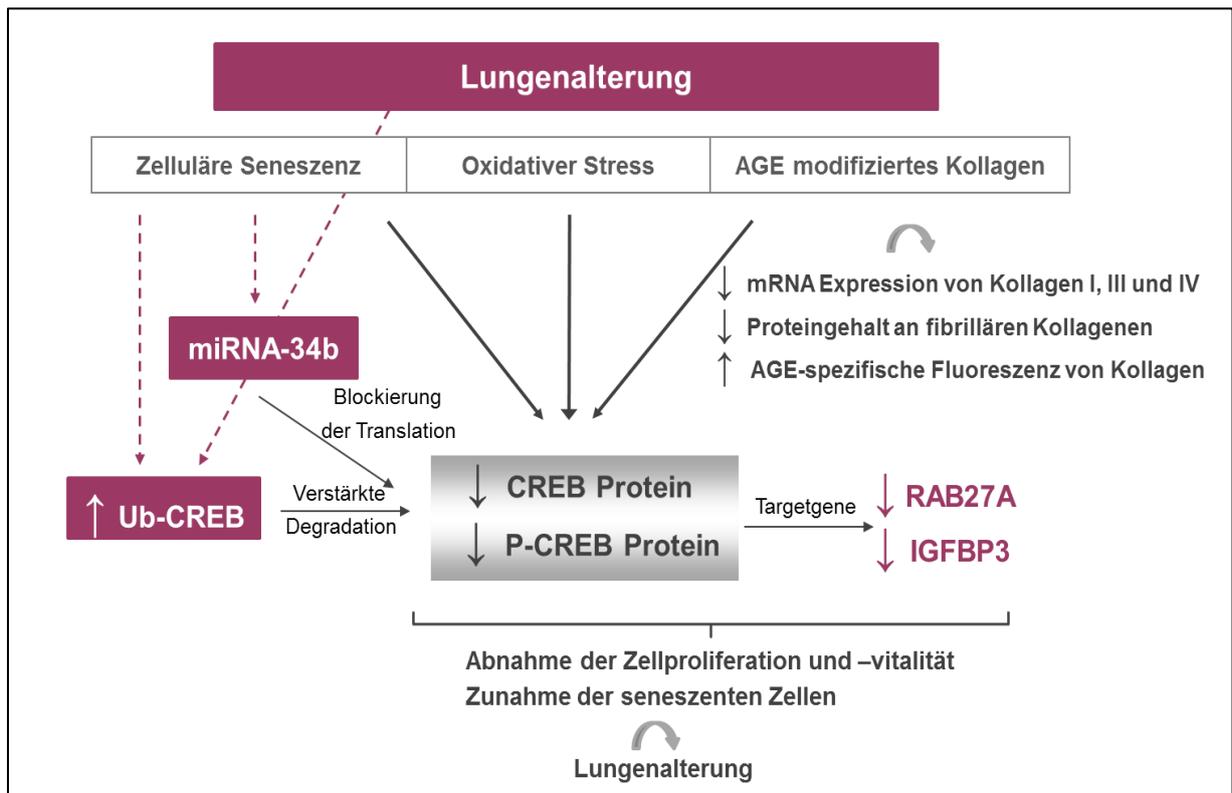


Abbildung 31: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

↔ keine Veränderung; ↑Zunahme; ↓ Abnahme

7.1. Reduktion von totalem und aktiviertem CREB während der Lungenalterung der Maus

Western Blot-Analysen zeigten, dass der Gehalt an totalem CREB mit zunehmendem Alter in murinem Lungengewebe reduziert wurde. Dies konnte zudem durch immunohistochemische Färbungen *in situ* gezeigt werden, was die Ergebnisse weniger anderer Altersstudien an weiteren Organen bestätigt. Dazu zählen insbesondere Studien am Gehirn von Ratten (Matsumoto, 2000; Brightwell *et al.*, 2004) sowie Studien an Herz- bzw. Aortengeweben von Ratten und Mäusen (Di Giulio *et al.*, 2007; Schauer *et al.*, 2010), die ebenfalls einen geringeren CREB-Gehalt in den alten Tieren als in den jungen Tieren gefunden hatten. In diesem Zusammenhang weist insbesondere die Studie an Aortengeweben auf ein Zusammenspiel zwischen altersassoziierter CREB-Reduktion und Zunahme von Arteriosklerose hin (Schauer *et al.*; 2010). Da es mit höherem Alter auch in den Lungengefäßen zu arteriosklerotischen Veränderungen kommen kann (Robert *et al.*, 1992; Kunz, 2000), könnte hierbei die pulmonale CREB-Reduktion eine Rolle spielen. Neben dem totalen Proteingehalt an CREB war auch der Gehalt an aktiviertem CREB altersabhängig reduziert. Klassisch wird CREB durch die PKA phosphoryliert und dadurch aktiviert, die sich jedoch auf Proteinebene in murinen Lungengewebe nicht altersabhängig unterschied. Obwohl dies nicht auf eine Rolle von PKA auf einen reduzierten P-CREB Gehalt hinweist, kann die potentielle Bedeutung der PKA nicht ausgeschlossen werden, da der PKA Proteingehalt kein Hinweis auf PKA Aktivität ist. Eine weitere mögliche Ursache für eine abnehmende CREB-Aktivität könnte eine Abnahme des Substrates ATP sein, das die PKA für die Phosphorylierung von CREB benötigt. Die publizierten Studien zeigten, dass ATP-Gehalt mit zunehmenden Alter reduziert wurde (Alemany *et al.*, 1988; Guerrieri *et al.*, 1996).

Da der Grad der CREB-Phosphorylierung mit der Konzentration an aktivierter C-Untereinheit der PKA im Kern korreliert, bedarf es weiterer Untersuchungen zur PKA Aktivität und Lokalisation, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der PKA-Aktivität und der CREB-Aktivierung herzustellen (Meinkoth *et al.*, 1993).

Es könnten aber auch andere *upstream* Kinasen einen Einfluss auf den reduzierten P-CREB-Gehalt im Alter haben. Dazu zählen neben der PKC, die CaMKs I und IV sowie die RSKs 1 und 2 und andere (Johannessen *et al.*, 2004). Es konnte eine Reduktion von CaMK IV im Gehirn von alten Ratten nachgewiesen werden (Fukushima *et al.*, 2008), was zur Abnahme der CREB Aktivität führen kann (Wei *et al.*, 2002). Es wäre denkbar, dass CaMK IV eine mögliche Kinase ist, die für einen reduzierten P-CREB-Gehalt in der alten Lunge verantwortlich sein könnte.

Neben den oben genannten *upstream* PKs könnten aber auch andere CREB-Regulatoren die verminderte CREB-Phosphorylierung in der alten Mauslunge erklären. Dazu zählen die Glykogen

Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) und Proteinphosphatasen (PP). Die CREB-Phosphorylierung kann durch GSK-3 β im Zellkern negativ beeinträchtigt werden (Grimes & Jope, 2001; Liang & Chuang, 2006; Tullai *et al.*, 2011). Da die GSK-3 β im Alter verstärkt aktiv ist, wie in alten Rattenhirnen gezeigt wurde (Lee *et al.*, 2006b), könnte auch die GSK-3 β -vermittelte Reduktion der CREB-Aktivität in der alten Mauslunge wichtig sein. Außerdem könnten auch die PP für den reduzierten P-CREB-Gehalt ursächlich sein, welches durch PP1 als auch PP2A dephosphoryliert werden kann (Wadzinski *et al.*, 1993).

7.2. CREB-Reduktion als mögliche Folge von oxidativem Stress und zellulärer Seneszenz

Da ROS sowie oxidative Schäden zur Lungenalterung beitragen (Kirkwood & Kowald, 1997; Dumont *et al.*, 2000; Nass *et al.*, 2007), betrachtete ich die Möglichkeit, dass oxidativer Stress die Ursache für den altersabhängigen, reduzierten Proteingehalt an CREB im Lungengewebe ist. Meine Untersuchungen ergaben, dass CREB nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von H₂O₂ oder SIN-1 eine deutliche Gehaltsabnahme in Alveolarepithelzellen aufweist. Diese Befunde zeigen, dass durch beide Stimulanzen generierte unterschiedliche ROS zum gleichen Ergebnis führten. Eine Vielzahl von Studien haben meine Daten bestätigt, in welchem sie auch eine Reduktion des CREB Proteingehalts nach Behandlung mit ROS in unterschiedlichen Zelltypen gezeigt haben (Watson *et al.*, 2001; Pugazhenthii *et al.*, 2003; Ozgen *et al.*, 2009; Klemm *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass ROS an der Signalvermittlung an unterschiedlichen Rezeptoren beteiligt sind und als sekundäre Botenstoffe wirken (Schreck *et al.*, 1991). Außerdem können ROS die Sulfhydrylgruppen von Serin-Threonin Kinasen wie PKA und PKC oxidieren. Das führt zur veränderten Aktivität von diesen Kinasen (Chen *et al.*, 1995; Konishi *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass H₂O₂ zu einer Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels führt, wodurch die PKA-Aktivität sinken konnte, was zum verminderten P-CREB-Gehalt führen kann (Hyslop *et al.*, 1988; Seeger *et al.*, 1995). Weitere Studien zeigten, dass CREB die unterschiedlichen Zellen vor oxidativen Schäden durch Aktivierung der antioxidativen Enzyme wie Mangan-Superoxid-Dismutase, Thioredoxin und Hämoxygenase-1 schützen kann (Kronke *et al.*, 2003; Chiueh *et al.*, 2005; St-Pierre *et al.*, 2006). Dadurch kann der reduzierte CREB-Gehalt durch oxidativen Stress einen negativen Einfluss auf Abwehrmechanismen der Lunge haben. In der vorliegenden Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass ROS die CREB Proteinmenge in Lungenzellen beeinflussen. Es liegt daher nahe, dass die CREB Abnahme im alternden Organismus zumindest teilweise durch die Zunahme von oxidativem Stress bedingt ist.

Es wird angenommen, dass bei der Lungenalterung Faktoren wie oxidativer Stress und die sich u.a. daraus resultierende zelluläre Seneszenz eine entscheidende Rolle spielen (Stadtman, 2002; Jeyapalan & Sedivy, 2008; Wang *et al.*, 2009). Meine Untersuchungen zeigten, dass der CREB Proteingehalt in seneszenten Lungenfibroblasten im Vergleich zu präseneszenten Fibroblasten abnahm (Abb. 31). Im Gegensatz dazu wurden keine Unterschiede in der CREB mRNA-Expression zwischen präseneszenten und seneszenten humanen Fibroblasten nachgewiesen. Die verminderte Aktivierbarkeit von CREB in seneszenten Fibroblasten bestätigt die Befunde in den alten Mauslungen. Die Ursachen dafür wurden aber im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht.

Eine bekannte Möglichkeit, durch die die CREB-Aktivierbarkeit beeinflusst werden könnte, ist die Interaktion mit anderen Mitgliedern der Leucizipper-Proteinfamilie. Diese können je nach Vorhandensein oder Abwesenheit einer KID-Domäne als Aktivatoren oder Repressoren wirken (Walker *et al.*, 1996). Die Repressoren können untereinander oder mit Aktivatoren Dimere bilden. Durch Bindung an die DNA kann es zur Verdrängung von aktivierenden Isoformen kommen. ICER (*inducible cAMP early repressor*) wurde als ein Repressor der CRE-vermittelten Transkription und als eine CREM-Isoform ohne KID-Domäne identifiziert.

Ein weiterer Mechanismus, der die CREB-Aktivierung regulieren und somit zur Abnahme der CREB-Aktivierbarkeit im Alter führen kann, ist die CREB Dimerisierung. CREB bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit ATF1. CREB/ATF1 Heterodimere wirken als schwächere Aktivatoren im Vergleich zu CREB Homodimeren (Hurst *et al.*, 1991). Es ist denkbar, dass sich häufiger CREB/ATF1 Heterodimere als CREB/CREB-Homodimere bilden, wodurch sich das Transaktivierungspotential von CREB verringert. Diese publizierten Befunde zeigen ein komplexes Zusammenspiel von CREB und anderen Mitgliedern seiner Familie (Foulkes *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 1993).

Gealterte Fibroblasten sezernieren verschiedene andere Substanzen als präseneszente Fibroblasten wie MMP's, Wachstumsfaktoren und Zytokine in das Kulturmedium (Krtolica & Campisi, 2002; Rodier & Campisi, 2011). Diese fördern zum einen die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und beeinflussen auch andere Zelltypen, u.a Epithelzellen. Seneszente Fibroblasten scheinen keinen Einfluss auf den CREB-Proteingehalt in benachbarten Zellen zu haben, da die Kokulturrexperimente mit präseneszenten oder seneszenten Fibroblasten und epithelialen Zellen (A549) keine veränderte CREB-Proteinexpression ergaben. Es ist möglich, dass im ausgewählten experimentellen Design die Konzentrationen von freigesetzten Mediatoren zu niedrig waren oder direkter Zell-Zellkontakt notwendig war, um die CREB Expression in A549 zu beeinflussen.

7.3. Post-transkriptionelle/-translationale Regulation von CREB während Lungenalterung

Die experimentellen Daten zeigten, dass die murine Lungenalterung sowie mögliche Ursachen dafür, wie oxidativer Stress und zelluläre Seneszenz, zur Abnahme des totalen Proteingehaltes von CREB führten aber nicht zu Veränderungen auf mRNA Ebene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CREB Proteingehalt während der Lungenalterung post-transkriptionell/-translational reguliert wird.

Auf mRNA-Ebene kann CREB durch kleine, nicht kodierende micro-RNAs (miRs) reguliert werden. Diese führen durch das Binden an die 3' untranslateden Region ihrer Ziel-mRNA entweder zur mRNA-Degradierung oder zur Inhibition der Translation. Ich habe die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass diese Art der CREB-Regulation im Alter beteiligt ist.

Meine Untersuchungen ergaben, dass die miR-34b Expression in seneszenten Zellen im Vergleich zu präseneszenten Fibroblasten (WI-38 und LuFi) zunahm, dadurch wäre denkbar, dass die verstärkte Expression von miR-34b die CREB Translation inhibiert (Abb. 31). Was die Studie von Pigazzi *et al.* bestätigt hat, ist dass die miR-34b an die 3' UTR der CREB mRNA in leukämischen Zelllinien bindet, wodurch es zur Inhibition der CREB Translation kommt (Pigazzi *et al.*, 2009). Außerdem ist bekannt, dass die Mitglieder der miR-34 Familie die zelluläre Seneszenz induzieren (He *et al.*, 2007). Meine Untersuchungen zeigten, dass die miR-34b Expression im Lungengewebe alter Mäuse nicht signifikant höher war als in den jungen Mäusen. Eine andere bekannte Studie korreliert mit meinem Ergebnis, in welcher auch kein Anstieg dieser miR in alten, murinen Lungengewebe beobachtet werden konnte (Williams *et al.*, 2007). In der Literatur wurden andere miRs (miR-1, miR-28A, miR-155 und miR-296-3p) identifiziert, deren Überexpression zur Reduktion des CREB Proteingehaltes führten (Leone *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Es wäre möglich, dass neben der miR-34b auch diese miRs eine Rolle bei der CREB Regulation während der Lungenalterung spielen. Aus diesem Grund werden zukünftig weitere Untersuchungen bezüglich der Expression anderer miRs von großem Interesse sein.

Interessanterweise ist es möglich, dass CREB alleine in der Lage ist, die eigene Transkription zu regulieren (Rosethorne *et al.*, 2008). Demzufolge müsste eine CREB Abnahme eine verminderte CREB mRNA Menge zur Folge haben. In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der Lungenalterung auf die mRNA Expression von CREB festgestellt werden. Entsprechend ist die CREB Selbstregulation in den hier untersuchten Geweben unwahrscheinlich.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einem geringeren CREB-Proteingehalt der Zelle führen kann, ist ein erhöhter Proteinabbau durch das Ubiquitin Proteasom-System (UPS). Dieses System ist nicht nur für den Abbau fehlgefalteter Proteine aber auch für den kontrollierten Abbau

regulatorischer Proteine wie Transkriptionsfaktoren verantwortlich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des CREB Proteingehaltes auf einer Zunahme an ubiquitiniertem CREB im Lungengewebe von alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen sowie in seneszenten gegenüber präseneszenten Fibroblasten (WI-38, LuFi) beruht (Abb. 31). Studien zeigten, dass sowohl hypoxische Bedingungen als auch der Wachstumsfaktor *platelet-derived growth factor* BB zur verminderten CREB-Proteinexpression führen (Taylor *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Klemm *et al.*, 2011). Diese Arbeiten weisen nach, dass PP-1 abgebaut wurde und es dadurch zu einer Hyperphosphorylierung von CREB kam, was zum CREB-Export aus dem Zellkern und zur Ubiquitin vermittelten proteasomalen Degradation führte. Daran waren die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-K), die Protein Kinase D1 (PKD-1) und die Protein Kinase B/Akt beteiligt (Garat *et al.*, 2006; Ozgen *et al.*, 2009). Die Ubiquitinierung eines Proteins kann vielfältige Folgen haben. Die Monoubiquitinierung kontrolliert die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, dagegen führt die Polyubiquitinierung zum Abbau des Proteins durch das 26S Proteasom (Chau *et al.*, 1989; Hicke, 2001). Verschiedene Studien sowohl mit pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen als auch mit pankreatischen β -Zellen zeigten, dass CREB polyubiquitiniert wird, was zum schnellen Abbau durch das 26S Proteasom führte (Garat *et al.*, 2006; Costes *et al.*, 2009).

Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob das CREB Protein durch das Proteasom während der zellulären Seneszenz, als auch bei der Kultivierung der Zellen auf einer AGE-modifizierten Kollagen-Matrix, verstärkt abgebaut wurde, wurde durch die Proteasominhibition das Anhäufen des CREB Proteins analysiert. Untersuchungen mit den Proteasominhibitoren MG-132 und Lactacystin zeigten nach 24 h keine Wirkung auf den CREB Proteingehalt, führten aber bei längeren Inkubationszeiten verstärkt zu Zelltod sowohl der präseneszenten/seneszenten Lungenfibroblasten als auch der Alveolarepithelzellen auf der nicht- und AGE-modifizierten Kollagen-Matrix aufgrund ihrer Zytotoxizität. Ob die Proteasomaktivität dafür ursächlich ist, konnte aus technischen Gründen nicht gezeigt werden.

7.4. Einfluss der Lungenalterung der Maus auf Expression und AGE-Modifizierung von Kollagen als mögliche Ursache der CREB-Reduktion

Da Kollagene nicht nur zur mechanischen Unterstützung der Lungenstruktur dienen, sondern an Zell-Matrix-Interaktionen und unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht, ob die murine Lungenalterung einen Einfluss auf die Expression und die AGE-Modifizierung von Kollagen hat. Anschließend wurde der Einfluss der AGE

modifizierten Kollagene auf die CREB Expression und Aktivierung in Alveolarepithelzellen als weitere mögliche Folge für die altersabhängige Reduktion des CREB Gehaltes untersucht.

Die gesunde, menschliche Lunge besteht überwiegend aus den fibrillären Kollagenen Typ I und Typ III sowie dem Kollagen Typ IV. Meine *Real-time* PCR-Untersuchungen zeigten eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression dieser drei Kollagentypen im Lungengewebe alter Mäuse im Vergleich zu den jungen Mäusen. Frühere Publikationen bestätigen eine Reduktion der mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Typ III in den Lungen der alten Mäuse (Huang *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2007b). Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen haben Calabresi *et al.* eine Zunahme der mRNA-Expression von Kollagen Typ I in 19 Monate alten Ratten in der Lunge gezeigt (Calabresi *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zeigten, dass die Gesamtmenge an fibrillären Kollagenen in alten Mäusen in der Lunge im Vergleich zu jungen Tieren abnahm. Ich konnte nachweisen, dass eine reduzierte mRNA-Expression von diesen Kollagenen der Grund dafür ist. Mein Ergebniss konnte durch andere Studien bestätigt werden, in welchen geringere Mengen an fibrillären Kollagen in der Lunge- oder anderen Geweben während des Alterungsprozesses beobachtet wurden (Bradley *et al.*, 1974; Boyer *et al.*, 1991; Mays *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu, sind in der Literatur widersprüchliche Daten bezüglich der Kollagen-Expression während der Lungenalterung publiziert. Es konnten keine altersabhängigen Unterschiede oder eine Zunahme von Kollagen-Expression in alten Tieren festgestellt werden (Takubo *et al.*, 1999; Calabresi *et al.*, 2007; Paxson *et al.*, 2011). Möglicherweise führen weitere Faktoren wie z.B. andere Modellorganismen, unterschiedliche Methoden zur Isolation des Kollagens oder unterschiedliche Normalisierung der Messdaten zu diesen abweichenden Ergebnissen. In einigen dieser untersuchten Tiere entwickelte sich eine altersassoziierte Lungenfibrose. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an den Versuchstieren CTGF (*connective tissue growth factor*)-Messungen durchgeführt, welche keine Hinweise auf die Ausbildung fibrotischer Veränderungen in den Lungen zeigten.

Kollagene befinden sich ebenso wie andere Proteine durch ständige Auf- und Abbauvorgänge in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Umbauraten sind bei wachsenden Tieren größer und nehmen mit fortschreitendem Alter ab (Mays *et al.*, 1991). Der Umbau der Kollagene wird hauptsächlich von den Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und den sogenannten TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteases*), die die MMP-Aktivität regulieren, katalysiert (Parks & Shapiro, 2001). Meine Untersuchungen zeigten eine altersabhängige Zunahme der MMP-9 mRNA Expression, wohingegen die mRNA Expression von MMP-2 und TIMP-1 abnahm. Eine Reduktion von TIMP-1 kann die Aktivität der MMP's und den Kollagenverdau verstärken, was möglicherweise zu einer Kollagen-Abnahme führt.

Ein anderer Mechanismus zur Regulation des Kollagenstoffwechsels ist die Hydroxylierung, welche eine entscheidende Bedeutung für die Stabilität des Kollagens hat (Bienkowski *et al.*, 1978). Unzureichend hydroxyliertes Kollagen kann schneller degradiert werden. Eine Abnahme der Kollagensynthese um 30 % und Hydroxylierung um 40 % konnte in der Haut von alten Mäusen beobachtet werden (Boyer *et al.*, 1991). Bekannte Daten zeigen, dass die Prolylhydroxylase Aktivität mit zunehmenden Alter abnimmt (Risteli *et al.*, 1976). Meine Ergebnisse zeigten ebenfalls eine Abnahme an 4-Hyp in den alten Mäusen, wobei die Abnahme der Kollagensynthese oder eine unzureichende Hydroxylierung als Ursache nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine zentrale Rolle bei der Abnahme des Kollagengehaltes spielen die Fibroblasten. Diese Hauptproduzenten von Kollagen Typ I und III unterliegen der zellulären Seneszenz (Hance *et al.*, 1976), welche im alternden Gewebe vermehrt auftreten (Dimri *et al.*, 1995; Jeyapalan *et al.*, 2007). Zum einen sind seneszente Fibroblasten weniger gut stimulierbar, zum anderen schütten diese Zellen andere Faktoren (MMPs, Zytokine) als präseneszente Zellen aus, wodurch die Produktion oder der Abbau von Kollagen beeinträchtigt werden kann (Martin *et al.*, 1990; Bartling *et al.*, 2007).

Aufgrund der längeren biologischen Halbwertszeit neigen die Kollagene zu vermehrter Akkumulation von AGEs. Das steht im Zusammenhang mit geringeren Umbauraten von Kollagen während des Alterungsprozesses (Dyer *et al.*, 1991; Turk *et al.*, 1999; Tessier, 2010).

Das Auftreten von AGEs ist eng mit den Altersveränderungen der inneren Organe assoziiert (Monnier *et al.*, 1984; Reiser *et al.*, 1987; Bellmunt *et al.*, 1995b). In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit der Grad der AGE-Modifikationen in der Lunge abhängig vom Alter untersucht. Die Untersuchungen der AGE-spezifischen Fluoreszenz in der Lunge von jungen, adulten und alten Mäusen bestätigen die zunehmende AGE Akkumulation mit steigendem Alter in der unverdaubaren Kollagenfraktion. Auch Bellmunt *et al.*, zeigten dieses Ergebnis mit AGE-Fluoreszenzmessungen der unlöslichen Kollagenfraktion in älteren Rattenlungen (Bellmunt *et al.*, 1995a; Bellmunt *et al.*, 1995b). Ich konnte außerdem eine direkte Korrelation zwischen der enzymatischen Unverdaubarkeit und der AGE-spezifischen Fluoreszenz zeigen. Dies wird durch publizierte Daten bestätigt, wonach AGE-Quervernetzungen zu steigender Unverdaubarkeit von Kollagenen führen. Im Gegensatz dazu konnten meine Experimente mit spezifischen Antikörpern keinen signifikanten Unterschied zwischen Lungen von jungen und alten Mäusen im Gehalt an Argpyrimidin und CML nachweisen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Vielzahl an Studien, die gegenteilige Ergebnisse bezüglich dieser AGE-Modifikationen zeigten (Dunn *et al.*, 1991; Dyer *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 1997; Wilker *et al.*, 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die einzelnen AGE-Modifikationen schlecht vergleichbar sind, besonders wenn

unterschiedliche Methoden zur Messung und unterschiedliche Normalisierungen der Messdaten verwendet werden. Beim Argpyrimidin-Nachweis konnte eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme dieser Modifikation im alten Gewebe festgestellt werden. Bereits bekannte Daten zeigen die antioxidativen Eigenschaften von Argpyrimidin (Sreejayan *et al.*, 2008). Mein Ergebnis spricht dafür, dass der im Alter zunehmende oxidative Stress mit der Abnahme der antioxidativen Abwehr durch Argpyrimidin verbunden sein könnte. Um diese Möglichkeit zu beweisen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Das Ausmaß und die Art der AGE-Modifikationen sind nicht nur vom Alter sondern auch von der Art des Gewebes und der untersuchten Spezies abhängig (Miyahara *et al.*, 1982; Reiser *et al.*, 1987). Im Vergleich zu publizierten Daten anderer Gewebe und Spezies, in denen deutlich mehr AGEs angereichert werden, zeigen meine Untersuchungen nur eine 1,5fache Anreicherung von AGEs im alten, murinen Lungengewebe (Monnier *et al.*, 1984; Miksik & Deyl, 1991; Dyer *et al.*, 1993; Verzijl *et al.*, 2000a). Dabei könnten sowohl höhere Umbauraten des Kollagens im Lungengewebe eine Rolle spielen als auch die Möglichkeit, dass das Kollagen der Lunge resistenter gegenüber AGE-Modifikationen ist als das anderer Gewebe (McAnulty & Laurent, 1987; Verzijl *et al.*, 2000b). Schwächer modifizierte Kollagene reagieren wesentlich sensibler gegenüber dem Abbau durch MMPs als stark modifizierte Kollagene (Hamlin *et al.*, 1978; Sakata *et al.*, 1995), was den verminderten Gehalt an fibrillärem Kollagen in alten, murinen Lunge plausibel macht.

Eine weitere mögliche Erklärung für die schwache AGE-Anreicherung ist, dass die Maus im Vergleich zum Menschen eine relativ kurze Lebensspanne hat, wodurch weniger Zeit für die Anreicherung von AGEs zur Verfügung steht (Miksik & Deyl, 1991; Verzijl *et al.*, 2000a; Corstjens *et al.*, 2008). Außerdem gibt es eine Reihe von zellulären Abwehrmechanismen, die den Organismus vor einer verstärkten Bildung und Akkumulation von AGEs schützen können. Dazu zählen das Glyoxalase-System (Glyoxalase I und II), die Aldehyddehydrogenase und die Fructosamin-3-Kinase (Szwergold *et al.*, 2001; Rahbar & Figarola, 2003; Nass *et al.*, 2007). Diese wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, könnten aber ebenfalls die Ursache für eine veränderte AGE-Anreicherung sein.

Der Gehalt an bestimmten Kollagenen nimmt während der Lungenalterung der Maus ab, was zu einem Elastizitätsverlust der alten Lunge führen könnte. Meine Resultate sprechen dafür, dass die erhöhte AGE-Modifizierung der Kollagene in alten, murinen Lungen die Versteifung und damit die Minderung der Leistungsfähigkeit der Lunge bewirken könnten.

Die Alterungsprozesse der Lunge haben Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und sind mit einer Zunahme der AGE-Modifikationen an Kollagenen verbunden. Dies kann einen Einfluss auf unterschiedliche Signalwege in Zellen durch Matrix-Interaktion haben.

Als weitere mögliche Folge für die altersabhängige, verminderte Expression und Aktivierung von CREB im Lungengewebe wurde der Einfluss der AGE-modifizierten Kollagene in Alveolarepithelzellen untersucht. In Vorversuchen konnte mit Ribose oder Glyoxal AGE-modifiziertes Kollagen hergestellt werden, welches nach Literaturrecherchen entweder physiologischen (1,5-mal mehr) oder pathophysiologischen (7-10-mal mehr) Modifizierungen entspricht. Mehrere Studien beschreiben, dass die Quervernetzungen der Kollagene physiologisch während des Reifungsprozesses des Kollagens, mit zunehmendem Alter und bei pathophysiologischen Vorgängen (*Diabetes mellitus*, Niereninsuffizienz, Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems) entstehen (Monnier *et al.*, 1984; Paul & Bailey, 1996; Bierhaus *et al.*, 1998; Bohlender *et al.*, 2005; Simm *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von Alveolarepithelzellen auf der AGE-Kollagen-Matrix zu keiner veränderten mRNA Expression der CREB Isoformen führte. Im Gegensatz dazu wurde deutlich, dass diese Kulturbedingungen zu einer moderaten, aber dennoch signifikanten Abnahme des totalen CREB Proteingehaltes und der P-CREB Aktivierbarkeit führten. Eine solche Abnahme konnte ebenfalls *in vivo* bei alten Tieren im Vergleich zu jungen Tieren gemessen werden, bei denen auch die AGE-spezifische Fluoreszenz und damit die Kollagenmodifikation nachweislich stärker ist. Die Effekte sind möglicherweise nur abgeschwächt *in vitro* zu erzielen, da ein Langzeitkontakt mit einer Basalmembran hier nicht stattfinden kann.

Dahingegen ist die EZM von seneszenten Fibroblasten nicht ursächlich für eine Abnahme des CREB Proteingehaltes in Alveolarepithelzellen, da dieser von seneszenten Fibroblasten nicht beeinflusst werden konnte. Dieses Ergebnis könnte sowohl durch das Fehlen bestimmter Faktoren als auch die Blockierung bestimmter Rezeptoren (Integrine) durch die seneszente Matrix in unserem *in vitro* System, die für den CREB-Signaltransduktionsweg notwendig sind, bedingt sein. Zum anderen ist es denkbar, dass durch stärkere AGE-Quervernetzungen in der EZM alter Fibroblasten die Verankerung und damit die Signaltransduktion der Zellen abgeschwächt sein könnte.

Bei der Kultivierung der Alveolarepithelzellen auf AGE-modifizierter Kollagen-Matrix wurde auch untersucht, welche molekulare Ursachen zu einem reduzierten CREB Gehalt führen konnten. Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kultivierung von Alveolarepithelzellen auf AGE-Kollagen-Matrix zu keinen signifikanten Veränderungen der miR-34b Expression führte. Dennoch war eine Tendenz zur erhöhten Expression dieser miR auf AGE-modifizierter Matrix zu erkennen. Es wäre denkbar, dass neben miR-34b auch andere miRs eine Rolle bei der CREB Regulation während der Lungenalterung spielen. Auch die Kultivierung der Alveolarepithelzellen auf AGE-modifizierter Kollagen-Matrix bewirkte keine signifikanten Veränderungen in der Menge an ubiquitiniertem CREB. Der molekulare Hintergrund, der zu einem verminderten CREB

Proteingehalt durch Kultivierung der Zellen auf AGE-Kollagen-Matrix führte, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise sind hier andere Regulationsmechanismen von Bedeutung. Es lässt sich auch vermuten, dass der Kollagen-Integrin Signalweg bei der CREB Regulation auf AGE-Kollagen eine Rolle spielen kann, durch AGE-Modifikationen aber unterdrückt wird. AGE-Modifikationen könnten zu veränderten Zelladhäsionseigenschaften führen, wodurch die Signalleitung über Integrine an unterschiedliche Kinasen beeinträchtigt wird.

7.5. CREB-Targetgene während der Lungenalterung

Für das Verständnis der altersabhängigen Reduktion und Aktivierbarkeit von CREB sind nicht nur die Regulation dieses Transkriptionsfaktors wichtig sondern auch die Kenntnis seiner Zielgene. Mit Hilfe von Microarray Analysen konnten die Gene IGFBP3, RAB27A und PVR identifiziert werden. Aufgrund des Vorhandenseins des CREs sind diese drei Gene direkte CREB Zielgene. Bei drei anderen ausgewählten Genen handelt es sich um indirekte Zielgene von CREB, da sie entweder wie ATXN1 kein aktives CRE oder wie TET-2 und SUMO3 kein CRE besitzen (Zhang *et al.*, 2005).

Die reduzierte mRNA Expression von RAB27A konnte mit Hilfe der quantitativen *Real-time* PCR im Lungengewebe von alten im Vergleich zu jungen Mäusen bestätigt werden. Eine Reduktion von RAB27A war außerdem nachweisbar in seneszenten Lungenfibroblasten sowie in Zellen, die auf AGE-modifizierter Kollagen-Matrix gewachsen sind. Die Rab (*ras-related in brain*) Proteine sind kleine Guanin-Nukleotid-bindende Proteine, die zur Ras Superfamilie gehören (Stenmark & Olkkonen, 2001). Unterschiedliche Studien zeigten, dass Rab3D, Rab14 und Rab38 Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Surfactant-Sekretion in der Lunge spielen (van Weeren *et al.*, 2004; Gou *et al.*, 2008). Rab27A wird in der Lunge der Maus im Epithel von Bronchiolen und Alveolen exprimiert, vor allem in sekretorischen Zellen wie Clarazellen und ATII-Zellen (Bolasco *et al.*, 2011). Durch diese Lokalisierung wird deutlich, dass Rab27A eine wichtige Rolle bei der Exozytose spielt. Bei meinen immunohistologischen Untersuchungen wurde die CREB Expression in den Epithelzellen der Bronchiolen nachgewiesen. Hier könnte die altersabhängige Reduktion von CREB die RAB27A-Expression direkt beeinflussen. Außerdem wurde in der Literatur gezeigt, dass das Fehlen von Rab27A und Rab27B in alten *knockout*-Mäusen zur verstärkten Atrophie der Bronchien und Alveolen mit Reduktion der Anzahl von Clarazellen und ATII-Zellen im Vergleich zu jungen *knockout*-Tieren führt. Die alten *knockout*-Mäuse zeigten auch die Ausdünnung des Bronchialepithels und der Alveolarwände mit Vergrößerung der Alveolenoberfläche (Bolasco *et al.*, 2011). Diese Befunde deuten auf eine Lungenalterung von Rab27-defizienten Mäusen hin. Somit spielt CREB durch vermittelte Reduktion der RAB27A Expression eine entscheidende Rolle bei der Lungenalterung. Außerdem kann die

Beeinträchtigung der Exozytose durch eine reduzierte Expression von RAB27A zu Sekretstau führen, wodurch es zu einem verstärkten Auftreten von altersassoziierten Erkrankungen der Lunge wie z.B. zur chronischen Bronchitis mit Bronchiektase kommen kann.

Ein weiteres Gen, das mittels *Real-time* PCR validiert wurde und dessen verminderte mRNA-Expression während der Lungenalterung der Maus gezeigt werden konnte, stellt IGFBP3 (*insulin-like growth factor binding protein*) dar. IGFBP3 bindet mehr als 90 % der zirkulierenden IGFs (*insulin-like growth factors*), wodurch die Halbwertszeit zunimmt und ein Reservoir an IGFs aufrechterhalten wird (Clemmons, 1997; Sandhu *et al.*, 2002). IGFBP3 besitzt IGF unabhängig inhibitorische Effekte wie z.B. die Hemmung des Zellwachstums und die Vermittlung der Apoptose (Valentinis *et al.*, 1995). Bei der Induktion der Apoptose durch IGFBP3 sind unterschiedliche weitere Zytokine wie der TGF- β und TNF- α involviert (Rajah *et al.*, 1997; Rajah *et al.*, 2002). Außerdem kann der Insulin-IGF Signaltransduktionsweg die Lebensspanne von unterschiedlichen Spezies wie Hefe, Fadenwurm, Fruchtfliege und Nagetiere beeinflussen. Bei den aufgezählten Spezies sind unterschiedliche Mutationen von Genen bekannt, die in den IGF-I Signalweg involviert sind und die Lebensdauer verlängern können (Clancy *et al.*, 2001; Bartke *et al.*, 2003; Tatar *et al.*, 2003; Zarse *et al.*, 2012). Diese Befunde zeigen, dass IGF-I sowie sein Hauptbindungspartner IGFBP3 eine entscheidende Rolle sowohl bei der Langlebigkeit als auch beim Alterungsprozess spielen. Diese Daten und die in meiner Arbeit beobachtete verminderte mRNA-Expression von IGFBP3 legen eine Beteiligung von IGFBP3 an Signalwegen der Alterungsprozesse der Lunge nahe. In den untersuchten Lungenfibroblasten Wi-38 und LuFi wurde eine Zunahme der mRNA Expression von IGFBP-3 während der Seneszenz festgestellt. Es ist möglich, dass die transkriptionelle Regulation von IGFBP3 beim Seneszenzprozess wesentlich komplexer ist. Möglicherweise sind neben CREB auch andere Transkriptionsfaktoren wie SP1 (*specificity protein 1*) und SP3 (*specificity protein 3*) beteiligt, die die IGFBP3 Expression beeinflussen könnten (Choi *et al.*, 2002; Ongerli *et al.*, 2005). Dies konnte durch die Studie von Debacq-Chainiaux *et al.* bestätigt werden, welche beschreibt, dass zelluläre Seneszenz und durch tert-Butylhydroperoxid oder Ethanol induzierte Seneszenz in WI-38 zu einer verstärkten Expression von IGFBP3 führen (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008).

Diese Auswahl von CREB-Zielgenen ist nicht vollständig, trotzdem wurden neue Erkenntnisse über die CREB-abhängige Regulation von unterschiedlichen Genen gewonnen, welche zum Umbau des Lungengewebes und damit zur Alterung, zur Induktion von Apoptose sowie zur Regulation der Lebensspanne beitragen können. Es ist denkbar, dass auch CREB Targetgene, die hochreguliert werden eine viel entscheidendere Rolle als die bereits diskutierten CREB Targetgene bei der Lungenalterung spielen könnten.

7.6. Biologische Auswirkungen der CREB-Reduktion

Da CREB die Proliferation, Differenzierung sowie das Überleben von unterschiedlichen Zellen steuern kann, wurde untersucht, welche funktionelle Bedeutung eine siRNA-vermittelte Downregulation von CREB in Lungenzellen hat. In dieser Arbeit konnte eine Abnahme der Vitalität sowie der Proliferation der Fibroblasten bei CREB *knockdown* gezeigt werden. Die CREB *Downregulation* zur Hemmung der Proliferation sowie Induktion der Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen wurde in mehreren Studien bestätigt (Struthers *et al.*, 1991; Rabelo *et al.*, 2003; Tokunou *et al.*, 2003; Schauer *et al.*, 2010). Dies könnte durch die Hemmung der Transkription von Zyklin D1 und Zyklin A verursacht sein, da hier die Beteiligung von CREB gezeigt wurde (Desdouets *et al.*, 1995; D'Amico *et al.*, 2000). In der Literatur konnten *c-fos* und *egr-1* als CREB Zielgene identifiziert werden, welche eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen (Sakamoto *et al.*, 1994; Thiel & Cibelli, 2002; Schiller *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2013). Die Überexpression von dominant-negativem CREB (nicht phosphorylierbare Form des CREB-Proteins) induziert Apoptose (Tokunou *et al.*, 2003). Die zunehmende Apoptose korreliert mit einer abnehmenden Expression von Bcl-2 (ein anti-apoptotisches Protein), welches ebenfalls ein Zielgen von CREB ist (Bonni *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 1999; Tokunou *et al.*, 2003). Dies deutet also darauf hin, dass die Abnahme der Vitalität der Fibroblasten durch CREB *knockdown* mit einer Reduktion der Expression von Bcl-2 verbunden sein könnte. Außerdem ist CREB neben seiner Regulationen der Proliferation und dem Überleben der Zellen im Organismus auch unbedingt notwendig für die Lungenentwicklung, was mit Hilfe der CREB *null* Mäuse gezeigt wurde (Rudolph *et al.*, 1998).

Zusätzlich zeigten die Zellen nach CREB *knockdown* Merkmale der zellulären Seneszenz. Dies konnte durch morphologische Veränderungen (z.B. Zellvolumenvergrößerung) sowie einer vermehrten Expression des Seneszenzmarkers SA- β -Gal nachgewiesen werden. Die Rolle von CREB während der zellulären Seneszenz humaner Fibroblasten konnte in mehreren Studien bestätigt werden (Chin *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 2006). Die Arbeit von Moon *et al.* zeigte die Aktivierung von CREB durch die Behandlung der Fibroblasten mit dem Inhibitor von G-Proteinen, wodurch es zur Induktion der zellulären Seneszenz kam (Moon *et al.*, 2010).

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse, dass die abnehmende Expression von CREB im Lungengewebe mit einer Reduktion der Vitalität der Zellen sowie der Induktion der zellulären Seneszenz einhergeht. Diese Ereignisse sprechen dafür, dass eine CREB Abnahme zur Lungenalterung durch zelluläre Seneszenz beiträgt. Zum einen ist bekannt, dass seneszente Zellen einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) zeigen. Diese Zellen sezernieren eine Vielzahl löslicher Faktoren wie Matrix-Metalloproteasen, pro-inflammatorische Zytokine

(Interleukin -6, -8 und 1 β) und das pro-apoptische Protein IGFBP7 (*insuline growth factor binding protein*) (Bartling *et al.*, 2007; Rodier *et al.*, 2009; Amsellem *et al.*, 2011; Campisi, 2011; Minagawa *et al.*, 2011). Durch Interleukine kann das umgebende Gewebe verändert und lokale Entzündungen hervorgerufen werden, die zu einer Alterung und altersbedingten Pathologie der Lunge beitragen (Ito & Barnes, 2009). Zum einen ist bekannt, dass IGFBP7 bei benachbarten Zellen Seneszenz und Apoptose induzieren kann (Wajapeyee *et al.*, 2008). Zum anderen kann die Zunahme von seneszenten Zellen eine Ursache für altersassoziierte Lungenerkrankungen wie COPD und Lungenfibrose, sowie für Lungenkrebs sein (Alder *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009; Faner *et al.*, 2012) .

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass die totalen und phosphorylierten CREB-Protein Mengen während der murinen Lungenalterung reduziert werden. Die Untersuchungen zum potentiellen Mechanismus ergaben eine post-transkriptionelle/-translationale Regulation von CREB im Alter. Die verminderte Zellproliferation und Vitalität der Lungenfibroblasten als Folge des *knockdowns* von CREB bedingen eine höhere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Stressfaktoren. Dadurch ist eine Minderung der Leistungsfähigkeit der Lunge möglich sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen und daraus folgender Lungenalterung.

8. Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R.**, Tavor, E., Jacob-Hirsch, J., Zeira, E., Amariglio, N., Pappo, O., Rechavi, G., Galun, E., Honigman, A. 2004. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res* 64, 1338-1346.
- Adamson, I. Y.**, Bowden, D. H. 1974. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30, 35-42.
- Adler, K. B.**, Low, R. B., Leslie, K. O., Mitchell, J., Evans, J. N. 1989. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab Invest* 60, 473-485.
- Ahmed, M. U.**, Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. 1997. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 324 (Pt 2), 565-570.
- Al-Wadei, H. A.**, Takahasi, T., Schuller, H. M. 2005. PKA-dependent growth stimulation of cells derived from human pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelium by dexamethasone. *Eur J Cancer* 41, 2745-2753.
- Alder, J. K.**, Chen, J. J., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S. C., Cogan, J. D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tuder, R. M., Phillips, J. A., 3rd, Lansdorf, P. M., Loyd, J. E., Armanios, M. Y. 2008. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13051-13056.
- Aleman, J.**, de la Cruz, M. J., Roncero, I., Miquel, J. 1988. Effects of aging on respiration, ATP levels and calcium transport in rat liver mitochondria. Response to theophylline. *Exp Gerontol* 23, 25-34.
- Ambros, V.** 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Amenta, P. S.**, Gil, J., Martinez-Hernandez, A. 1988. Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *J Histochem Cytochem* 36, 1167-1173.
- Amsellem, V.**, Gary-Bobo, G., Marcos, E., Maitre, B., Chaar, V., Validire, P., Stern, J. B., Noureddine, H., Sapin, E., Rideau, D., Hue, S., Le Corvoisier, P., Le Gouvello, S., Dubois-Randé, J. L., Boczkowski, J., Adnot, S. 2011. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1358-1366.
- Avery, N. C.**, Bailey, A. J. 2005. Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise. *Scand J Med Sci Sports* 15, 231-240.
- Avery, N. C.**, Bailey, A. J. 2006. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol (Paris)* 54, 387-395.
- Bakerman, S.** 1962. Quantitative extraction of acid-soluble human skin collagen with age. *Nature* 196, 375-376.
- Barondes, S. H.**, Cooper, D. N., Gitt, M. A., Leffler, H. 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807-20810.
- Bartke, A.**, Chandrashekar, V., Dominici, F., Turyn, D., Kinney, B., Steger, R., Kopchick, J. J. 2003. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: controversies and new insights. *Biogerontology* 4, 1-8.
- Bartling, B.**, Desole, M., Silber, R. E., Simm, A. 2007. Dicarbonyl-mediated protein modifications affect matrix metalloproteinase (MMP) activity. *Z Gerontol Geriatr* 40, 357-361.
- Bartling, B.**, Rehbein, G., Silber, R. E., Simm, A. 2006. Senescent fibroblasts induce moderate stress in lung epithelial cells in vitro. *Exp Gerontol* 41, 532-539.
- Bartsch, D.**, Casadio, A., Karl, K. A., Serodio, P., Kandel, E. R. 1998. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95, 211-223.
- Beck, K.**, Brodsky, B. 1998. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol* 122, 17-29.
- Beckman, K. B.**, Ames, B. N. 1998. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 854, 118-127.
- Begin, R.**, Renzetti, A. D., Jr., Bigler, A. H., Watanabe, S. 1975. Flow and age dependence of airway closure and dynamic compliance. *J Appl Physiol* 38, 199-207.
- Bellmunt, M. J.**, Portero, M., Pamplona, R., Cosso, L., Odetti, P., Prat, J. 1995a. Evidence for the Maillard reaction in rat lung collagen and its relationship with solubility and age. *Biochim Biophys Acta* 1272, 53-60.
- Bellmunt, M. J.**, Portero, M., Pamplona, R., Muntaner, M., Prat, J. 1995b. Age-related fluorescence in rat lung collagen. *Lung* 173, 177-185.
-

-
- Berkowitz, L. A., Gilman, M. Z.** 1990. Two distinct forms of active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5258-5262.
- Bienkowski, R. S., Cowan, M. J., McDonald, J. A., Crystal, R. G.** 1978. Degradation of newly synthesized collagen. *J Biol Chem* 253, 4356-4363.
- Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., Nawroth, P. P.** 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37, 586-600.
- Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., Nawroth, P. P.** 2005. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* 83, 876-886.
- Bierhaus, A., Humpert, P. M., Nawroth, P. P.** 2006. Linking stress to inflammation. *Anesthesiology clinics* 24, 325-340.
- Blank, F., von Garnier, C., Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gehr, P., Nicod, L.** 2008. Role of dendritic cells in the lung: in vitro models, animal models and human studies. *Expert Rev Respir Med* 2, 215-233.
- Blendy, J. A., Kaestner, K. H., Schmid, W., Gass, P., Schutz, G.** 1996. Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform. *Embo J* 15, 1098-1106.
- Bohlender, J. M., Franke, S., Stein, G., Wolf, G.** 2005. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F645-659.
- Bolasco, G., Tracey-White, D. C., Tolmachova, T., Thorley, A. J., Tetley, T. D., Seabra, M. C., Hume, A. N.** 2011. Loss of Rab27 function results in abnormal lung epithelium structure in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C466-476.
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Doliana, R., Colombatti, A.** 1990. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 29, 1245-1254.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., Greenberg, M. E.** 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Bonni, A., Ginty, D. D., Dudek, H., Greenberg, M. E.** 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 168-183.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A. J.** 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79, 59-68.
- Boyer, B., Kern, P., Fourtanier, A., Labat-Robert, J.** 1991. Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin. *Exp Gerontol* 26, 375-383.
- Bradley, K. H., McConnell, S. D., Crystal, R. G.** 1974. Lung collagen composition and synthesis. Characterization and changes with age. *J Biol Chem* 249, 2674-2683.
- Brett, J., Schmidt, A. M., Yan, S. D., Zou, Y. S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysocki, C., Shaw, A., et al.** 1993. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143, 1699-1712.
- Brightwell, J. J., Gallagher, M., Colombo, P. J.** 2004. Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 81, 19-26.
- Brindle, P., Linke, S., Montminy, M.** 1993. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* 364, 821-824.
- Brunk, U. T., Terman, A.** 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33, 611-619.
- Buckley, S. T., Ehrhardt, C.** 2010. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol* 2010, 917108.
- Burri, P. H.** 2006. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 89, 313-322.
- Butler, C., 2nd, Kleinerman, J.** 1970. Capillary density: alveolar diameter, a morphometric approach to ventilation and perfusion. *Am Rev Respir Dis* 102, 886-894.
- Calabresi, C., Arosio, B., Galimberti, L., Scanziani, E., Bergottini, R., Annoni, G., Vergani, C.** 2007. Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp Gerontol* 42, 1003-1011.
-

-
- Campagnone, R.**, Regan, J., Rich, C. B., Miller, M., Keene, D. R., Sakai, L., Foster, J. A. 1987. Pulmonary fibroblasts: a model system for studying elastin synthesis. *Lab Invest* 56, 224-230.
- Campisi, J.** 2011. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* 21, 107-112.
- Carlin, B.**, Jaffe, R., Bender, B., Chung, A. E. 1981. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 256, 5209-5214.
- Castor, C. W.**, Fremuth, T. D., Furlong, A. M., Jourdian, G. W. 1983. Hyaluronic acid and proteoglycan synthesis by lung fibroblasts in basal and activated states. *In Vitro* 19, 462-470.
- Chau, V.**, Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., Varshavsky, A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chen, J. J.**, Huang, W. C., Chen, C. C. 2005. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 16, 5579-5591.
- Chen, Q.**, Olashaw, N., Wu, J. 1995. Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J Biol Chem* 270, 28499-28502.
- Chin, J. H.**, Okazaki, M., Frazier, J. S., Hu, Z. W., Hoffman, B. B. 1996. Impaired cAMP-mediated gene expression and decreased cAMP response element binding protein in senescent cells. *Am J Physiol* 271, C362-371.
- Chiueh, C. C.**, Andoh, T., Chock, P. B. 2005. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1042, 403-418.
- Choi, H. S.**, Lee, J. H., Park, J. G., Lee, Y. I. 2002. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1005-1012.
- Chung, H. Y.**, Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., Leeuwenburgh, C. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8, 18-30.
- Ciechanover, A.** 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17, 7151-7160.
- Clancy, D. J.**, Gems, D., Harshman, L. G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S. J., Partridge, L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* 292, 104-106.
- Clemmons, D. R.** 1997. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 45-62.
- Conkright, M. D.**, Canettieri, G., Sreaton, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J. B., Montminy, M. 2003. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12, 413-423.
- Corstjens, H.**, Dicanio, D., Muizzuddin, N., Neven, A., Sparacio, R., Declercq, L., Maes, D. 2008. Glycation associated skin autofluorescence and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects. *Exp Gerontol* 43, 663-667.
- Costes, S.**, Vandewalle, B., Tourrel-Cuzin, C., Broca, C., Linck, N., Bertrand, G., Kerr-Conte, J., Portha, B., Pattou, F., Bockaert, J., Dalle, S. 2009. Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in beta-cells and human pancreatic islets. *Diabetes* 58, 1105-1115.
- Craig, J. C.**, Schumacher, M. A., Mansoor, S. E., Farrens, D. L., Brennan, R. G., Goodman, R. H. 2001. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *J Biol Chem* 276, 11719-11728.
- Crapo, J. D.**, Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E. R. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 125, 740-745.
- Crescenzi, E.**, Pacifico, F., Lavorgna, A., De Palma, R., D'Aiuto, E., Palumbo, G., Formisano, S., Leonardi, A. 2011. NF-kappaB-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene* 30, 2707-2717.
- Creuwels, L. A.**, van Golde, L. M., Haagsman, H. P. 1997. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175, 1-39.
-

-
- Cristofalo**, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., Tresini, M. 2004. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 125, 827-848.
- Crouch**, E. C., Moxley, M. A., Longmore, W. 1987. Synthesis of collagenous proteins by pulmonary type II epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 135, 1118-1123.
- D'Amico**, M., Hult, J., Amanatullah, D. F., Zafonte, B. T., Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, L. H., Donehower, L. A., Takemaru, K., Moon, R. T., Davis, R., Lisanti, M. P., Shtutman, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A., Troussard, A. A., Dedhar, S., Pestell, R. G. 2000. The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J Biol Chem* 275, 32649-32657.
- de Groot**, R. P., den Hertog, J., Vandenheede, J. R., Goris, J., Sassone-Corsi, P. 1993. Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *Embo J* 12, 3903-3911.
- Debacq-Chainiaux**, F., Pascal, T., Boilan, E., Bastin, C., Bauwens, E., Toussaint, O. 2008. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 44, 1817-1832.
- Delegeane**, A. M., Ferland, L. H., Mellon, P. L. 1987. Tissue-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene: dependence on cyclic AMP-inducible elements. *Mol Cell Biol* 7, 3994-4002.
- Delmas**, V., Laoide, B. M., Masquillier, D., de Groot, R. P., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P. 1992. Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4226-4230.
- Desdouets**, C., Matesic, G., Molina, C. A., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., Sobczak-Thepot, J. 1995. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 15, 3301-3309.
- Di Giulio**, C., Rapino, M., Zingariello, M., Antonucci, A., Cataldi, A. 2007. PKC alpha-mediated CREB activation is oxygen and age-dependent in rat myocardial tissue. *Histochem Cell Biol* 127, 327-333.
- Dimri**, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dumont**, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Rémacle, J., Toussaint, O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 28, 361-373.
- Dunn**, J. A., McCance, D. R., Thorpe, S. R., Lyons, T. J., Baynes, J. W. 1991. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 30, 1205-1210.
- Dunsmore**, S. E., Rannels, D. E. 1996. Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol* 270, L3-27.
- Dwarki**, V. J., Montminy, M., Verma, I. M. 1990. Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J* 9, 225-232.
- Dyer**, D. G., Blackledge, J. A., Katz, B. M., Hull, C. J., Adkisson, H. D., Thorpe, S. R., Lyons, T. J., Baynes, J. W. 1991. The Maillard reaction in vivo. *Z Ernährungswiss* 30, 29-45.
- Dyer**, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., Baynes, J. W. 1993. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91, 2463-2469.
- Ekblom**, P., Ekblom, M., Fecker, L., Klein, G., Zhang, H. Y., Kadoya, Y., Chu, M. L., Mayer, U., Timpl, R. 1994. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120, 2003-2014.
- Faner**, R., Rojas, M., Macnee, W., Agusti, A. 2012. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 186, 306-313.
- Fehrenbach**, H., Kasper, M., Tschernig, T., Pan, T., Schuh, D., Shannon, J. M., Muller, M., Mason, R. J. 1999. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J* 14, 534-544.
- Fietzek**, P. P., Kuhn, K. 1976. The primary structure of collagen. *Int Rev Connect Tissue Res* 7, 1-60.
- Fink**, J. S., Verhave, M., Kasper, S., Tsukada, T., Mandel, G., Goodman, R. H. 1988. The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6662-6666.
-

-
- Foulkes**, N. S., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64, 739-749.
- Fukuchi**, Y. 2009. The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: similarity and difference. *Proc Am Thorac Soc* 6, 570-572.
- Fukushima**, H., Maeda, R., Suzuki, R., Suzuki, A., Nomoto, M., Toyoda, H., Wu, L. J., Xu, H., Zhao, M. G., Ueda, K., Kitamoto, A., Mamiya, N., Yoshida, T., Homma, S., Masushige, S., Zhuo, M., Kida, S. 2008. Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 9910-9919.
- Garat**, C. V., Fankell, D., Erickson, P. F., Reusch, J. E., Bauer, N. N., McMurtry, I. F., Klemm, D. J. 2006. Platelet-derived growth factor BB induces nuclear export and proteasomal degradation of CREB via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 26, 4934-4948.
- Gelse**, K., Poschl, E., Aigner, T. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.
- Gilbert**, K. A., Rannels, D. E. 1999. From Limbs to Lungs: A New Perspective on Compensatory Lung Growth. *News Physiol Sci* 14, 260-267.
- Gillooly**, M., Lamb, D. 1993. Airspace size in lungs of lifelong non-smokers: effect of age and sex. *Thorax* 48, 39-43.
- Glomb**, M. A., Monnier, V. M. 1995. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 270, 10017-10026.
- Goh**, S. Y., Cooper, M. E. 2008. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, 1143-1152.
- Gonzalez**, G. A., Montminy, M. R. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.
- Gonzalez**, G. A., Yamamoto, K. K., Fischer, W. H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W., 3rd, Vale, W. W., Montminy, M. R. 1989. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337, 749-752.
- Gou**, D., Mishra, A., Weng, T., Su, L., Chintagari, N. R., Wang, Z., Zhang, H., Gao, L., Wang, P., Stricker, H. M., Liu, L. 2008. Annexin A2 interactions with Rab14 in alveolar type II cells. *J Biol Chem* 283, 13156-13164.
- Grimes**, C. A., Jope, R. S. 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78, 1219-1232.
- Guerrieri**, F., Vendemiale, G., Turturro, N., Fratello, A., Furio, A., Muolo, L., Grattagliano, I., Papa, S. 1996. Alteration of mitochondrial F0F1 ATP synthase during aging. Possible involvement of oxygen free radicals. *Ann N Y Acad Sci* 786, 62-71.
- Gum**, R. J., Gaede, L. L., Heindel, M. A., Waring, J. F., Trevillyan, J. M., Zinker, B. A., Stark, M. E., Wilcox, D., Jirousek, M. R., Rondinone, C. M., Ulrich, R. G. 2003. Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice. *Mol Endocrinol* 17, 1131-1143.
- Hagiwara**, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., Montminy, M. 1992. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70, 105-113.
- Halliwell**, B., Gutteridge, J. M. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8.
- Hamlin**, C. R., Kohn, R. R. 1971. Evidence for progressive, age-related structural changes in post-mature human collagen. *Biochim Biophys Acta* 236, 458-467.
- Hamlin**, C. R., Luschin, J. H., Kohn, R. R. 1978. Partial characterization of the age-related stabilizing factor of post-mature human collagen--I. By the use of bacterial collagenase. *Exp Gerontol* 13, 403-414.
- Hance**, A. J., Bradley, K., Crystal, R. G. 1976. Lung collagen heterogeneity. Synthesis of type I and type III collagen by rabbit and human lung cells in culture. *J Clin Invest* 57, 102-111.
- Hance**, A. J., Crystal, R. G. 1975. The connective tissue of lung. *Am Rev Respir Dis* 112, 657-711.
- Hardiman**, G. 2004. Microarray platforms--comparisons and contrasts. *Pharmacogenomics* 5, 487-502.
- Harley**, C. B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation research* 256, 271-282.
-

-
- Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W.** 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Hayflick, L.** 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S.** 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A., Hannon, G. J.** 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
- Heffner, J. E., Repine, J. E.** 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140, 531-554.
- Heremans, A., Cassiman, J. J., Van den Berghe, H., David, G.** 1988. Heparan sulfate proteoglycan from the extracellular matrix of human lung fibroblasts. Isolation, purification, and core protein characterization. *J Biol Chem* 263, 4731-4739.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M.** 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.
- Hicke, L.** 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L., Habener, J. F.** 1988. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242, 1430-1433.
- Holt, P. G., Kees, U. R., Shon-Hegrad, M. A., Rose, A., Ford, J., Bilyk, N., Bowman, R., Robinson, B. W.** 1988. Limiting-dilution analysis of T cells extracted from solid human lung tissue: comparison of precursor frequencies for proliferative responses and lymphokine production between lung and blood T cells from individual donors. *Immunology* 64, 649-654.
- Huang, J. S., Guh, J. Y., Chen, H. C., Hung, W. C., Lai, Y. H., Chuang, L. Y.** 2001. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 81, 102-113.
- Huang, K., Mitzner, W., Rabold, R., Schofield, B., Lee, H., Biswal, S., Tankersley, C. G.** 2007a. Variation in senescent-dependent lung changes in inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 102, 1632-1639.
- Huang, K., Rabold, R., Schofield, B., Mitzner, W., Tankersley, C. G.** 2007b. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 102, 200-206.
- Hurst, H. C., Masson, N., Jones, N. C., Lee, K. A.** 1990. The cellular transcription factor CREB corresponds to activating transcription factor 47 (ATF-47) and forms complexes with a group of polypeptides related to ATF-43. *Mol Cell Biol* 10, 6192-6203.
- Hurst, H. C., Totty, N. F., Jones, N. C.** 1991. Identification and functional characterisation of the cellular activating transcription factor 43 (ATF-43) protein. *Nucleic Acids Res* 19, 4601-4609.
- Huttunen, H. J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A. J., Rauvala, H.** 2002. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* 62, 4805-4811.
- Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Halsey, W. A., Jr., Schraufstatter, I. U., Sauerheber, R. D., Spragg, R. G., Jackson, J. H., Cochrane, C. G.** 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 263, 1665-1675.
- Ionescu, A. M., Schwarz, E. M., Vinson, C., Puzas, J. E., Rosier, R., Reynolds, P. R., O'Keefe, R. J.** 2001. PTHrP modulates chondrocyte differentiation through AP-1 and CREB signaling. *J Biol Chem* 276, 11639-11647.
- Iozzo, R. V.** 1994. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol* 14, 203-208.
- Irvin, C. G., Bates, J. H.** 2003. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4, 4.
- Ito, K., Barnes, P. J.** 2009. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 135, 173-180.
- Jackola, D. R., Ruger, J. K., Miller, R. A.** 1994. Age-associated changes in human T cell phenotype and function. *Aging (Milano)* 6, 25-34.
- Jang, I. S., Rhim, J. H., Park, S. C., Yeo, E. J.** 2006. Downstream molecular events in the altered profiles of lysophosphatidic acid-induced cAMP in senescent human diploid fibroblasts. *Exp Mol Med* 38, 134-143.
- Janssens, J. P., Pache, J. C., Nicod, L. P.** 1999. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 13, 197-205.
-

- Jeffery**, P. K., Reid, L. 1975. New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120, 295-320.
- Jenden**, D. J., Scremin, O. U., Roch, M., Li, G. 1996. The influence of aging on whole body choline release and clearance. *Life Sci* 58, 2003-2009.
- Jeyapalan**, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M., Herbig, U. 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128, 36-44.
- Jeyapalan**, J. C., Sedivy, J. M. 2008. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev* 129, 467-474.
- Johannessen**, M., Delghandi, M. P., Moens, U. 2004. What turns CREB on? *Cell Signal* 16, 1211-1227.
- Johansson**, J., Curstedt, T. 1997. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 244, 675-693.
- Kee**, B. L., Arias, J., Montminy, M. R. 1996. Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271, 2373-2375.
- Kirk**, J. M., Heard, B. E., Kerr, I., Turner-Warwick, M., Laurent, G. J. 1984. Quantitation of types I and III collagen in biopsy lung samples from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Coll Relat Res* 4, 169-182.
- Kirkwood**, T. B., Kowald, A. 1997. Network theory of aging. *Exp Gerontol* 32, 395-399.
- Kleinman**, H. K., Cannon, F. B., Laurie, G. W., Hassell, J. R., Aumailley, M., Terranova, V. P., Martin, G. R., DuBois-Dalcq, M. 1985. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* 27, 317-325.
- Klemm**, D. J., Majka, S. M., Crossno, J. T., Jr., Psilas, J. C., Reusch, J. E., Garat, C. V. 2011. Reduction of reactive oxygen species prevents hypoxia-induced CREB depletion in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 58, 181-191.
- Konishi**, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11233-11237.
- Kronke**, G., Bochkov, V. N., Huber, J., Gruber, F., Bluml, S., Furnkranz, A., Kadl, A., Binder, B. R., Leitinger, N. 2003. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 278, 51006-51014.
- Krtolica**, A., Campisi, J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1401-1414.
- Kunz**, J. 2000. Initial lesions of vascular aging disease (arteriosclerosis). *Gerontology* 46, 295-299.
- Kwok**, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., Goodman, R. H. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- Laemmli**, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanza**, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., West, M. D. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665-669.
- Laurent**, G. J. 1986. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* 41, 418-428.
- Lee**, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., Hwang, E. S. 2006a. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187-195.
- Lee**, H. C., Lim, M. L., Lu, C. Y., Liu, V. W., Fahn, H. J., Zhang, C., Nagley, P., Wei, Y. H. 1999. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 362, 309-316.
- Lee**, H. C., Lu, C. Y., Fahn, H. J., Wei, Y. H. 1998. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett* 441, 292-296.
- Lee**, S. J., Chung, Y. H., Joo, K. M., Lim, H. C., Jeon, G. S., Kim, D., Lee, W. B., Kim, Y. S., Cha, C. I. 2006b. Age-related changes in glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) immunoreactivity in the central nervous system of rats. *Neurosci Lett* 409, 134-139.
- Leone**, V., D'Angelo, D., Ferraro, A., Pallante, P., Rubio, I., Santoro, M., Croce, C. M., Fusco, A. 2011. A TSH-CREB1-microRNA loop is required for thyroid cell growth. *Mol Endocrinol* 25, 1819-1830.

-
- Li, Y. M., Mitsuhashi, T., Wojciechowicz, D., Shimizu, N., Li, J., Stitt, A., He, C., Banerjee, D., Vlassara, H.** 1996. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11047-11052.
- Liang, M. H., Chuang, D. M.** 2006. Differential roles of glycogen synthase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation. *J Biol Chem* 281, 30479-30484.
- Lin, Y. K., Kuan, C. Y.** 2010. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food Chem* 119, 1271-1277.
- Linnerth, N. M., Baldwin, M., Campbell, C., Brown, M., McGowan, H., Moorehead, R. A.** 2005. IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer cells. *Oncogene* 24, 7310-7319.
- Lipford, J. R., Deshaies, R. J.** 2003. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol* 5, 845-850.
- Liu, J. S., Park, E. A., Gurney, A. L., Roesler, W. J., Hanson, R. W.** 1991. Cyclic AMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription is mediated by multiple promoter elements. *J Biol Chem* 266, 19095-19102.
- Liu, S., Yang, Y., Wu, J.** 2011. TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 414, 618-624.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E. L.** 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675-1680.
- Lohmann-Matthes, M. L., Steinmuller, C., Franke-Ullmann, G.** 1994. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7, 1678-1689.
- Lohse, M., Nunes-Nesi, A., Kruger, P., Nagel, A., Hannemann, J., Giorgi, F. M., Childs, L., Osorio, S., Walther, D., Selbig, J., Sreenivasulu, N., Stitt, M., Fernie, A. R., Usadel, B.** 2010. Robin: an intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis. *Plant Physiol* 153, 642-651.
- Long, F., Schipani, E., Asahara, H., Kronenberg, H., Montminy, M.** 2001. The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* 128, 541-550.
- Lonze, B. E., Ginty, D. D.** 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lu, C., He, J. C., Cai, W., Liu, H., Zhu, L., Vlassara, H.** 2004. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11767-11772.
- Lyons, T. J., Silvestri, G., Dunn, J. A., Dyer, D. G., Baynes, J. W.** 1991. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* 40, 1010-1015.
- Maillard, L. C., and Gaultier, M.,** 1912. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C R Seances Acad Sci III* 154: 66-68.
- Mair, W., Morante, I., Rodrigues, A. P., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R. J., Dillin, A.** 2011. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTCL-1 and CREB. *Nature* 470, 404-408.
- Martin, G. M., Sprague, C. A., Epstein, C. J.** 1970. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 23, 86-92.
- Martin, M., el Nabout, R., Lafuma, C., Crechet, F., Remy, J.** 1990. Fibronectin and collagen gene expression during in vitro ageing of pig skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 191, 8-13.
- Matsumoto, A.** 2000. Age-dependent changes in phosphorylated cAMP response element-binding protein immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. *Neurosci Lett* 279, 117-120.
- Maurel, E., Azema, C., Deloly, J., Bouissou, H.** 1990. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta* 193, 27-37.
- Mayr, B., Montminy, M.** 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
- Mays, P. K., McAnulty, R. J., Campa, J. S., Laurent, G. J.** 1991. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J* 276 (Pt 2), 307-313.
-

-
- McAnulty**, R. J., Laurent, G. J. 1987. Collagen synthesis and degradation in vivo. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of the adult rat. *Coll Relat Res* 7, 93-104.
- Medvedev**, Z. A. 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65, 375-398.
- Meinkoth**, J. L., Alberts, A. S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S. S., Hagiwara, M., Montminy, M., Feramisco, J. R. 1993. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 127-128, 179-186.
- Meister**, G., Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mercer**, R. R., Russell, M. L., Roggli, V. L., Crapo, J. D. 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10, 613-624.
- Meyer**, K. C. 2005. Aging. *Proc Am Thorac Soc* 2, 433-439.
- Michaelson**, J. E., Ritzenthaler, J. D., Roman, J. 2002. Regulation of serum-induced fibronectin expression by protein kinases, cytoskeletal integrity, and CREB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L291-301.
- Miksik**, I., Deyl, Z. 1991. Change in the amount of epsilon-hexosyllysine, UV absorbance, and fluorescence of collagen with age in different animal species. *J Gerontol* 46, B111-116.
- Minagawa**, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., Kawaishi, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S. L., Nakayama, K., Kuwano, K. 2011. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF-beta-induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L391-401.
- Miyahara**, T., Murai, A., Tanaka, T., Shiozawa, S., Kameyama, M. 1982. Age-related differences in human skin collagen: solubility in solvent, susceptibility to pepsin digestion, and the spectrum of the solubilized polymeric collagen molecules. *J Gerontol* 37, 651-655.
- Mizuuchi**, T., Kida, K., Fujino, Y. 1994. Morphological studies of growth and aging in the lungs of Fischer 344 male rats. *Exp Gerontol* 29, 553-567.
- Molina**, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E., Sassone-Corsi, P. 1993. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75, 875-886.
- Monnier**, V. M., Kohn, R. R., Cerami, A. 1984. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 583-587.
- Monnier**, V. M., Vishwanath, V., Frank, K. E., Elmets, C. A., Dauchot, P., Kohn, R. R. 1986. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* 314, 403-408.
- Montminy**, M. R., Bilezikjian, L. M. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328, 175-178.
- Montminy**, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., Goodman, R. H. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6682-6686.
- Moon**, E. Y., Kim, H. S., Im, Y. S. 2010. Gi-protein inhibitor, guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), induces senescence-associated beta-galactosidase positive cell formation through CREB phosphorylation. *Life Sci* 86, 683-690.
- Mulder**, D. J., Water, T. V., Lutgers, H. L., Graaff, R., Gans, R. O., Zijlstra, F., Smit, A. J. 2006. Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol Ther* 8, 523-535.
- Nakajima**, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Parvin, J. D., Montminy, M. 1997. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev* 11, 738-747.
- Nass**, N., Bartling, B., Navarrete Santos, A., Scheubel, R. J., Borgermann, J., Silber, R. E., Simm, A. 2007. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 40, 349-356.
- Nawroth**, P. P., Bierhaus, A., Vogel, G. E., Hofmann, M. A., Zumbach, M., Wahl, P., Ziegler, R. 1999. [Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus]. *Med Klin (Munich)* 94, 29-38.
- Neuman**, R. E., Logan, M. A. 1950. The determination of collagen and elastin in tissues. *J Biol Chem* 186, 549-556.
-

-
- Obrenovich**, M. E., Monnier, V. M. 2005. Apoptotic killing of fibroblasts by matrix-bound advanced glycation endproducts. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005, pe3.
- Ohgami**, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Miyazaki, A., Hakamata, H., Horiuchi, S., Nakayama, H. 2002. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* 16, 56-59.
- Ongeri**, E. M., Verderame, M. F., Hammond, J. M. 2005. Follicle-stimulating hormone induction of ovarian insulin-like growth factor-binding protein-3 transcription requires a TATA box-binding protein and the protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Mol Endocrinol* 19, 1837-1848.
- Osanai**, K., Higuchi, J., Oikawa, R., Kobayashi, M., Tsuchihara, K., Iguchi, M., Huang, J., Voelker, D. R., Toga, H. 2010. Altered lung surfactant system in a Rab38-deficient rat model of Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L243-251.
- Ott**, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., Simm, A. 2014. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology* 2, 411-429.
- Ozgen**, N., Guo, J., Gertsberg, Z., Danilo, P., Jr., Rosen, M. R., Steinberg, S. F. 2009. Reactive oxygen species decrease cAMP response element binding protein expression in cardiomyocytes via a protein kinase D1-dependent mechanism that does not require Ser133 phosphorylation. *Mol Pharmacol* 76, 896-902.
- Parker**, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V. J., Evans, R., Koerber, S. C., Hoeger, C., Montminy, M. R. 1996. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16, 694-703.
- Parks**, W. C., Shapiro, S. D. 2001. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2, 10-19.
- Paul**, R. G., Bailey, A. J. 1996. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 1297-1310.
- Paxson**, J. A., Gruntman, A., Parkin, C. D., Mazan, M. R., Davis, A., Ingenito, E. P., Hoffman, A. M. 2011. Age-dependent decline in mouse lung regeneration with loss of lung fibroblast clonogenicity and increased myofibroblastic differentiation. *PLoS One* 6, e23232.
- Pelosi**, P., Rocco, P. R., Negrini, D., Passi, A. 2007. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc* 79, 285-297.
- Pigazzi**, M., Manara, E., Baron, E., Basso, G. 2009. miR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 69, 2471-2478.
- Pignolo**, R. J., Masoro, E. J., Nichols, W. W., Bradt, C. I., Cristofalo, V. J. 1992. Skin fibroblasts from aged Fischer 344 rats undergo similar changes in replicative life span but not immortalization with caloric restriction of donors. *Exp Cell Res* 201, 16-22.
- Polkey**, M. I., Green, M., Moxham, J. 1995. Measurement of respiratory muscle strength. *Thorax* 50, 1131-1135.
- Pugazhenth**, S., Nesterova, A., Jambal, P., Audesirk, G., Kern, M., Cabell, L., Eves, E., Rosner, M. R., Boxer, L. M., Reusch, J. E. 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem* 84, 982-996.
- Queisser**, M. A., Kouri, F. M., Konigshoff, M., Wygrecka, M., Schubert, U., Eickelberg, O., Preissner, K. T. 2008. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 337-345.
- Quinn**, P. G. 2002. Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72, 269-305.
- Quinn**, P. G., Granner, D. K. 1990. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. *Mol Cell Biol* 10, 3357-3364.
- Rabelo**, F. L., Ropert, C., Ramos, M. G., Bonjardim, C. A., Gazzinelli, R. T., Alvarez-Leite, J. I. 2003. Inhibition of ERK1/2 and CREB phosphorylation by caspase-dependent mechanism enhances apoptosis in a fibrosarcoma cell line treated with butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 968-972.
- Radi**, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288, 481-487.
- Rahbar**, S., Figarola, J. L. 2003. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419, 63-79.
-

-
- Rajah**, R., Lee, K. W., Cohen, P. 2002. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth Differ* 13, 163-171.
- Rajah**, R., Valentinis, B., Cohen, P. 1997. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 12181-12188.
- Rannels**, S. R., Fisher, C. S., Heuser, L. J., Rannels, D. E. 1987. Culture of type II pneumocytes on a type II cell-derived fibronectin-rich matrix. *Am J Physiol* 253, C759-765.
- Reddy**, G. K. 2004. Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp Diabetes Res* 5, 143-153.
- Reiser**, K. M., Hennessy, S. M., Last, J. A. 1987. Analysis of age-associated changes in collagen crosslinking in the skin and lung in monkeys and rats. *Biochim Biophys Acta* 926, 339-348.
- Riccio**, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A., Ginty, D. D. 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286, 2358-2361.
- Richter**, C. 1995. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 647-653.
- Risteli**, J., Tuderman, L., Kivirikko, K. I. 1976. Intracellular enzymes of collagen biosynthesis in rat liver as a function of age and in hepatic injury induced by dimethylnitrosamine. Purification of rat prolyl hydroxylase and comparison of changes in prolyl hydroxylase activity with changes in immunoreactive prolyl hydroxylase. *Biochem J* 158, 369-376.
- Robert**, L., Jacob, M. P., Labat-Robert, J. 1992. Cell-matrix interactions in the genesis of arteriosclerosis and atheroma. Effect of aging. *Ann N Y Acad Sci* 673, 331-341.
- Roberts**, C. J., Birkenmeier, T. M., McQuillan, J. J., Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Chen, W. T., Yamada, K. M., McDonald, J. A. 1988. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 263, 4586-4592.
- Rodier**, F., Campisi, J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192, 547-556.
- Rodier**, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., Campisi, J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11, 973-979.
- Rolewska**, P., Al-Robaiy, S., Navarrete Santos, A., Simm, A., Silber, R. E., Bartling, B. 2013. Age-related expression, enzymatic solubility and modification with advanced glycation end-products of fibrillar collagens in mouse lung. *Exp Gerontol* 48, 29-37.
- Roman**, J., Ritzenthaler, J. D., Bechara, R., Brown, L. A., Guidot, D. 2005. Ethanol stimulates the expression of fibronectin in lung fibroblasts via kinase-dependent signals that activate CREB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L975-987.
- Roman**, J., Rivera, H. N., Roser-Page, S., Sitaraman, S. V., Ritzenthaler, J. D. 2006. Adenosine induces fibronectin expression in lung epithelial cells: implications for airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L317-325.
- Rosethorne**, E. M., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. 2008. Regulation of cyclic AMP response-element binding-protein (CREB) by Gq/11-protein-coupled receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 75, 942-955.
- Rudolph**, D., Tafuri, A., Gass, P., Hammerling, G. J., Arnold, B., Schutz, G. 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4481-4486.
- Ruppert**, S., Cole, T. J., Boshart, M., Schmid, E., Schutz, G. 1992. Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes. *Embo J* 11, 1503-1512.
- Rustow**, B., Haupt, R., Stevens, P. A., Kunze, D. 1993. Type II pneumocytes secrete vitamin E together with surfactant lipids. *Am J Physiol* 265, L133-139.
- Rustow**, B., Nakagawa, Y., Rabe, H., Waku, K., Kunze, D. 1988. Species pattern of phosphatidylinositol from lung surfactant and a comparison of the species pattern of phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol synthesized de novo in lung microsomal fractions. *Biochem J* 254, 67-71.
- Sage**, H., Farin, F. M., Striker, G. E., Fisher, A. B. 1983. Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry* 22, 2148-2155.
-

- Sakamoto**, K. M., Fraser, J. K., Lee, H. J., Lehman, E., Gasson, J. C. 1994. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human *egr-1* promoter. *Mol Cell Biol* 14, 5975-5985.
- Sakata**, N., Meng, J., Jimi, S., Takebayashi, S. 1995. Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 116, 63-75.
- Saluja**, D., Vassallo, M. F., Tanese, N. 1998. Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators. *Mol Cell Biol* 18, 5734-5743.
- Sandhu**, M. S., Dunger, D. B., Giovannucci, E. L. 2002. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 972-980.
- Sato**, T., Shimogaito, N., Wu, X., Kikuchi, S., Yamagishi, S., Takeuchi, M. 2006. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 21, 197-208.
- Schauer**, I. E., Knaub, L. A., Lloyd, M., Watson, P. A., Gliwa, C., Lewis, K. E., Chait, A., Klemm, D. J., Gunter, J. M., Bouchard, R., McDonald, T. O., O'Brien, K. D., Reusch, J. E. 2010. CREB downregulation in vascular disease: a common response to cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 733-741.
- Schiller**, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J. M., Mauviel, A. 2006. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, *c-fos* gene expression in keratinocytes. *Oncogene* 25, 4449-4457.
- Schreck**, R., Rieber, P., Baeuerle, P. A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 10, 2247-2258.
- Schubert**, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Binnik, J. R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Schumacher**, M. A., Goodman, R. H., Brennan, R. G. 2000. The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem* 275, 35242-35247.
- Seeger**, W., Hansen, T., Rossig, R., Schmehl, T., Schutte, H., Kramer, H. J., Walmrath, D., Weissmann, N., Grimminger, F., Suttrop, N. 1995. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability--effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res* 50, 1-17.
- Sell**, D. R., Kleinman, N. R., Monnier, V. M. 2000. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *Faseb J* 14, 145-156.
- Serrano**, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., Lowe, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shiels**, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A., Schnieke, A. E. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399, 316-317.
- Sies**, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- Simm**, A., Wagner, J., Gursinsky, T., Nass, N., Friedrich, I., Schinzel, R., Czeslik, E., Silber, R. E., Scheubel, R. J. 2007. Advanced glycation endproducts: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? *Exp Gerontol* 42, 668-675.
- Singh**, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.
- Smith**, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Soukup**, J. M., Becker, S. 2001. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 171, 20-26.
- Sreejayan**, N., Yang, X., Palanichamy, K., Dolence, K., Ren, J. 2008. Antioxidant properties of argpyrimidine. *Eur J Pharmacol* 593, 30-35.
- St-Pierre**, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., Spiegelman, B. M. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.
- Stadtman**, E. R. 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 33, 597-604.

-
- Stenmark, H., Olkkonen, V. M.** 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2, REVIEWS3007.
- Strehler, B. L., Mark, D. D., Mildvan, A. S.** 1959. GEE MV: Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J Gerontol* 14, 430-439.
- Stremler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M.** 1989. An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J Biol Chem* 264, 5331-5334.
- Struthers, R. S., Vale, W. W., Arias, C., Sawchenko, P. E., Montminy, M. R.** 1991. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature* 350, 622-624.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., Maurer, R. A.** 1994. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8, 2527-2539.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A.** 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22, 269-285.
- Szwergold, B. S., Howell, S., Beisswenger, P. J.** 2001. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes* 50, 2139-2147.
- Taguchi, A., Blood, D. C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D. C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M. A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M.** 2000. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405, 354-360.
- Takubo, Y., Hirai, T., Muro, S., Kogishi, K., Hosokawa, M., Mishima, M.** 1999. Age-associated changes in elastin and collagen content and the proportion of types I and III collagen in the lungs of mice. *Exp Gerontol* 34, 353-364.
- Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A.** 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.
- Taylor, C. T., Furuta, G. T., Synnestvedt, K., Colgan, S. P.** 2000. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12091-12096.
- Tessier, F. J.** 2010. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)* 58, 214-219.
- Thiel, G., Cibelli, G.** 2002. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 193, 287-292.
- Thornalley, P. J., Langborg, A., Minhas, H. S.** 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1, 109-116.
- Tokunou, T., Shibata, R., Kai, H., Ichiki, T., Morisaki, T., Fukuyama, K., Ono, H., Iino, N., Masuda, S., Shimokawa, H., Egashira, K., Imaizumi, T., Takeshita, A.** 2003. Apoptosis induced by inhibition of cyclic AMP response element-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108, 1246-1252.
- Tolle, A., Kolleck, I., Schlame, M., Wauer, R., Stevens, P. A., Rustow, B.** 1997. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1346, 198-204.
- Torres, L. C., Kulikowski, L. D., Ramos, P. L., Sugayama, S. M., Moreira-Filho, C. A., Carneiro-Sampaio, M.** 2013. Disruption of the CREBBP gene and decreased expression of CREB, NFkappaB p65, c-JUN, c-FOS, BCL2 and c-MYC suggest immune dysregulation. *Hum Immunol* 74, 911-915.
- Triggiani, M., De Marino, V., Sofia, M., Faraone, S., Ambrosio, G., Carratu, L., Marone, G.** 1997. Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 94-100.
- Tullai, J. W., Graham, J. R., Cooper, G. M.** 2011. A GSK-3-mediated transcriptional network maintains repression of immediate early genes in quiescent cells. *Cell Cycle* 10, 3072-3077.
- Turk, Z., Misur, I., Turk, N., Benko, B.** 1999. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. *Clin Chem Lab Med* 37, 813-820.
- Turner, J. M., Mead, J., Wohl, M. E.** 1968. Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol* 25, 664-671.
- Ulrich, P., Cerami, A.** 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56, 1-21.
- Uphoff, C. C., Drexler, H. G.** 1999. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell* 12, 229-236.
-

-
- Valentinis, B., Bhala, A., DeAngelis, T., Baserga, R., Cohen, P.** 1995. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol* 9, 361-367.
- van Weeren, L., de Graaff, A. M., Jamieson, J. D., Batenburg, J. J., Valentijn, J. A.** 2004. Rab3D and actin reveal distinct lamellar body subpopulations in alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 288-295.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Verbeken, E. K., Cauberghs, M., Mertens, I., Clement, J., Lauweryns, J. M., Van de Woestijne, K. P.** 1992. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest* 101, 793-799.
- Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R. A., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Bayliss, M. T., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., Tekoppele, J. M.** 2000a. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 350 Pt 2, 381-387.
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S. R., Bank, R. A., Shaw, J. N., Lyons, T. J., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., Baynes, J. W., Tekoppele, J. M.** 2000b. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 275, 39027-39031.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., Jackson, S. P.** 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 126, 111-117.
- Voynow, J. A., Rubin, B. K.** 2009. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135, 505-512.
- Wadzinski, B. E., Wheat, W. H., Jaspers, S., Peruski, L. F., Jr., Lickteig, R. L., Johnson, G. L., Klemm, D. J.** 1993. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13, 2822-2834.
- Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., Green, M. R.** 2008. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132, 363-374.
- Walker, W. H., Girardet, C., Habener, J. F.** 1996. Alternative exon splicing controls a translational switch from activator to repressor isoforms of transcription factor CREB during spermatogenesis. *J Biol Chem* 271, 21045-21050.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T.** 2009. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311-323.
- Ward, H. E., Nicholas, T. E.** 1984. Alveolar type I and type II cells. *Aust N Z J Med* 14, 731-734.
- Watson, P. A., Nesterova, A., Burant, C. F., Klemm, D. J., Reusch, J. E.** 2001. Diabetes-related changes in cAMP response element-binding protein content enhance smooth muscle cell proliferation and migration. *J Biol Chem* 276, 46142-46150.
- Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., Wautier, J. L.** 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E685-694.
- Wei, F., Qiu, C. S., Liauw, J., Robinson, D. A., Ho, N., Chatila, T., Zhuo, M.** 2002. Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nature neuroscience* 5, 573-579.
- Wilker, S. C., Chellan, P., Arnold, B. M., Nagaraj, R. H.** 2001. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. *Anal Biochem* 290, 353-358.
- Williams, A. E., Perry, M. M., Moschos, S. A., Lindsay, M. A.** 2007. microRNA expression in the aging mouse lung. *BMC Genomics* 8, 172.
- Yakes, F. M., Van Houten, B.** 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 514-519.
- Yamauchi, M., London, R. E., Guenat, C., Hashimoto, F., Mechanic, G. L.** 1987. Structure and formation of a stable histidine-based trifunctional cross-link in skin collagen. *J Biol Chem* 262, 11428-11434.
- Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Watanabe, T., Yamamoto, H.** 2005. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *Journal of pharmacological sciences* 97, 305-311.
- Zarse, K., Schmeisser, S., Groth, M., Priebe, S., Beuster, G., Kuhlow, D., Guthke, R., Platzer, M., Kahn, C. R., Ristow, M.** 2012. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell Metab* 15, 451-465.
-

Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J. R., Emerson, B., Hogenesch, J. B., Unterman, T., Young, R. A., Montminy, M. 2005. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4459-4464.

Weiterhin genutzte Literaturquellen:

Affymetrix (2003) *Data Sheet – GeneChip® Human Genome Array*. Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

Fritsch H & Kühnel W: Taschenatlas der Anatomie, Band 2 Innere Organe 8. Auflage, Thieme, 2003.

Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 3 Auflage. Thieme

Moll KJ and Moll M: Anatomie. Elsevier Verlag 17; Auflage 2002

Waldeyer A: Anatomie des Menschen. Walter de Gruyter, Berlin (2003)

9. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau **Privatdozentin Dr. Babett Bartling**, unter deren Anleitung ich die Doktorarbeit durchgeführt habe, möchte ich für die Überlassung dieses interessanten und ausfüllenden Themas und die fachliche Betreuung danken.

Herrn **Professor Dr. Andreas Simm** danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn **Professor Dr. Klaus Humbeck** bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn **Professor Dr. Lars-Oliver Klotz** für die Übernahme des externen Gutachtens.

Auch **der Wilhelm-Roux-Initiative** der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für die Unterstützung meiner Dissertation durch ein Forschungsstipendium danken.

Ein besonderer Dank gilt **Kathleen Jacobs** und **Ilka Oerlecke**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Kathleen als geduldige Computer-Helferin danke ich für das kritische Korrekturlesen dieser Doktorarbeit sowie die guten Anregungen. Bei Ilka möchte ich mich ebenso für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik bedanken.

Für die Hilfestellungen bei den immunohistologischen Untersuchungen danke ich **Maria Schindler**, sowie für den aufmunternden Beistand.

Ein herzlicher Dank gilt **allen Mitarbeitern** des Forschungslabors für Herz- und Thoraxchirurgie, besonders **Sandy, Samiya, Kalinka, Caro, Daniela und Alex**, für die vielen Anregungen und die „jahrelange“ Unterstützung fachlicher und moralischer Art sowie das hervorragende Arbeitsklima.

Ich danke meinen **Freunden**, die mich immer wieder ermutigt und unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön gilt **Grześ, Hanni** und ganz besonders meiner **Mutti** für ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung, weswegen ich ihnen diese Arbeit widmen möchte.

Vielen Dank!

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Paulina Rolewska
Geburtsdatum: 22.06.1981
Geburtsort: Lubań (Polen)
Familienstand: ledig
Kinder: Hanna Hinc, geb. 22.02.2013
Nationalität: polnisch

BERUFLICHER WERDEGANG

05.2009 - 10.2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion)**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Projektleitern: PD Dr. Bartling und Prof. Simm

Titel der Dissertation: „Rolle des Transkriptionsfaktors *cyclic AMP response element binding protein* (CREB) in der Lungenalterung“

11.2010 - 06.2011 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Projektleiterin: PD Dr. Grünauer-Kloevokorn

AUSBILDUNG/SCHULBILDUNG

10.2002 - 08.2008 **Studium Diplom-Biologie** (Note 1,4)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Schwerpunkte Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie, Immunologie, Biochemie

Titel der Diplomarbeit: „Identifizierung der Interaktionspartner von HIPP3, HIPP5 und HIPP25“, Institut für Pflanzenphysiologie, Halle/Saale

- 02.2002** **Deutsche Sprachprüfung (DSH)**
Studienkolleg für ausländische Studienbewerber
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
- 07.2001- 02.2002** **Intensiver Sprachkurs**
Internationales Hochschulkolleg, Hochschule Zittau/Görlitz
- 06.2001** **Allgemeine Hochschulreife**
Janusz Korczak - II Oberschule, Bolesławiec (Polen)
- 06.1996** **Grundschule**
Maria Krasicki - Grundschule, Węgliniec (Polen)

Halle (Saale), 10.Januar 2015

Paulina Anna Rolewska

Veröffentlichungen

„Reduced expression level of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein contributes to lung aging”

Rolewska, P., Simm, A., Silber, R. E., Bartling, B.

Am J Respir Cell Mol Biol., 2014, 50, 201-211.

„Age-related expression, enzymatic solubility and modification with advanced glycation end-products of fibrillar collagens in mouse lung”

Rolewska, P., Al-Robaiy, S., Navarrete Santos, A., Simm, A., Silber, R. E., Bartling, B.

Exp Gerontol., 2013, 48, 29-37

„The receptor for advanced glycation end-products supports lung tissue biomechanics”

Al-Robaiy, S., Weber, B., Simm, A., Diez, C., **Rolewska, P.**, Silber, R. E., Bartling, B.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2013, 305, L491-500.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „**Rolle des Transkriptionsfaktors *cAMP response element-binding protein (CREB)* bei der Lungenalterung**“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 10.Januar 2015

Paulina Anna Rolewska