

## ÖGP Wissenschaftsförderung - Abschlussbericht

Project: The Role of Fra-2/AP-1 driven endothelial cell senescence in the development of scleroderma associated interstitial lung disease

Wir möchten uns ganz herzlich bei der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie für die Zuerkennung der ÖGP Wissenschaftsförderung 2023 bedanken. Die finanzielle Unterstützung, die wir erhalten haben, war entscheidend für die Weiterentwicklung unseres Projektes über die Rolle der Endothelzellseneszenz in der Entwicklung von interstitiellen Lungenerkrankungen bei Patienten mit systemischer Sklerose. Die Förderung hat es uns ermöglicht, die notwendigen Reagenzien und Materialien zu beschaffen, um für unsere Forschung wichtige Experimente durchzuführen und vorläufige Daten für Publikationen und weitere Förderansuchen zu sammeln.

Mit Hilfe der ÖGP Wissenschaftsförderung konnten wir neue Aspekte der Beteiligung des Transkriptionsfaktors Fra-2/AP-1 zu zellulärer Seneszenz im Rahmen von interstitiellen Lungenerkrankungen erforschen. Der Zuschuss erleichterte auch den Einsatz fortschrittlicher Techniken wie der single-cell RNA-Sequenzierung (scRNAseq), um transkriptionelle Änderungen sowie deren potentiellen Einfluss auf zelluläre Interaktionen zu untersuchen. Wir sind sehr dankbar für das Vertrauen, das in dieses Projekt gesetzt wurde, und sind zuversichtlich, dass unsere Ergebnisse zu einem umfassenderen Verständnis der Pathophysiologie von interstitiellen Lungenerkrankungen führen werden.

### Hintergrund und Zielsetzung

Systemische Sklerose (SSc) ist eine Autoimmunerkrankung die durch eine ausgeprägte Vaskulopathie und Organfibrose gekennzeichnet ist. Eine Beteiligung der Lunge ist dabei prognostisch besonders relevant und kann in Form einer pulmonalen Hypertonie (PH) oder interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) erkennbar sein (1,2). Endothelzellen (EC) sind einer der ersten Zelltypen die von einer SSc betroffen sind und beeinflussen bereits frühe Symptome der Erkrankung, beispielweise das Raynaud-Syndrom.

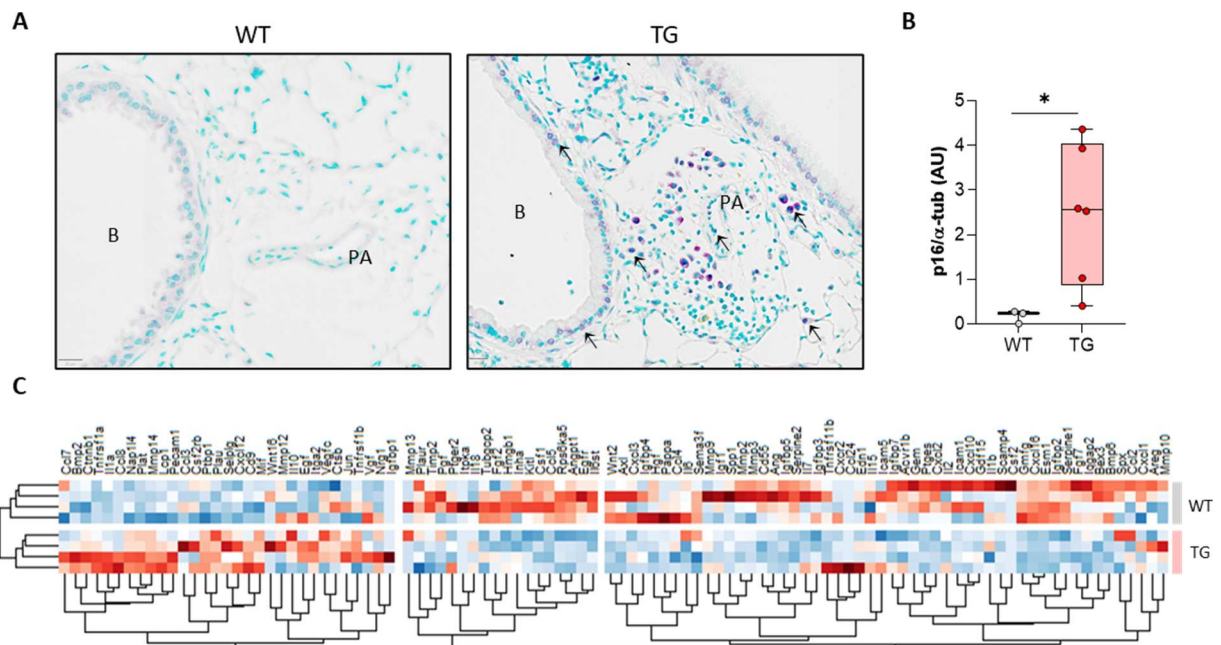
Die Pathomechanismen der SSc sind noch nicht vollständig verstanden, aber es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Fra-2/AP-1 eine Rolle spielt (3,4). Dieser Faktor ist sowohl bei Patienten als auch in Mausmodellen der SSc mit Lungenbeteiligung erhöht und führt zur Entstehung von Fibrose (5,6). Zusätzlich haben Studien gezeigt, dass den epigenetischen und transkriptionellen Änderungen seneszenten Zellen eine starke Fra-2/AP-1 Signatur zugrunde liegt (7). Zelluläre Seneszenz führt zu einem Zellzyklusarrest und der Aktivierung eines sekretorischen Phänotyps, der mit der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen verbunden ist. Diese können die Umbauprozesse in der Lunge weiter vorantreiben.

Das Ziel dieser Studie war herauszufinden ob und wie Fra-2 die zelluläre Seneszenz von mikrovaskulären Lungenendothelzellen und dadurch die Entstehung einer ILD oder PH beeinflusst. Dazu wurde neben *in vitro* Versuchen auch das Fra-2 überexprimierende/transgene (TG) Mausmodell verwendet. Dieses

Mausmodell entwickelt einen Phänotyp ähnlich dem von SSc-ILD-PH Patienten und wird seit einigen Jahre erfolgreich als präklinisches Modell eingesetzt (8–10).

## Resultate

Im Rahmen unserer Studie konnten wir zeigen, dass vaskuläre Umbauprozesse sowohl in Lungen von SSc-ILD Patienten mit, als auch ohne PH stattfinden. Diesen liegen jedoch spezifischen Änderungen der extrazellulären Matrix zugrunde. Dies ist sowohl in kleineren als auch in größeren Lungenarterien zu sehen (Manuskript in Vorbereitung). Zusätzlich nutzten wir das Fra-2 TG Mausmodell der SSc-ILD (5,8,9,11), um die zelluläre Seneszenz im Rahmen dieses Gefäßumbaus detailliert zu untersuchen. Sowohl in immunhistochemischen Färbungen, als auch bei der Quantifizierung der Proteinmenge mittels Western Blot zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Proteins p16, einem spezifischen Marker seneszenter Zellen, im Lungengewebe (Abbildung 1A+B). Durch eine RNA-Sequenzierung isolierter und mit Durchflusszytometrie angereicherter Lungenendothelzellen (CD45-negative, CD31-positiven Zellen des Lungenhomogenates im selben Mausmodell) konnten Änderungen der Genexpressionsmuster analysiert werden. Dabei wurde eine deutliche Auftrennung der zwei Genotypen anhand von Seneszenz-assoziierten Genen (12) sichtbar (Abbildung 1C). Dies spricht für eine eindeutige Anhäufung seneszenter Zellen im Lungengewebe von Mäusen mit SSc-ILD Phänotyp. Allerdings betrifft dieser Prozess nicht nur Lungenendothelzellen, sondern verschiedene Zelltypen des Lungengewebes (Abbildung 1A).



Um die transkriptionellen Unterschiede und Veränderungen der interzellulären Kommunikation im Rahmen der ILD-Entstehung zu ergründen, wurde außerdem eine Single-cell RNA-Sequenzierung der Lungenproben von gesunden Wildtyp (WT) und von TG Mäusen gemacht (Figure 2A+B).

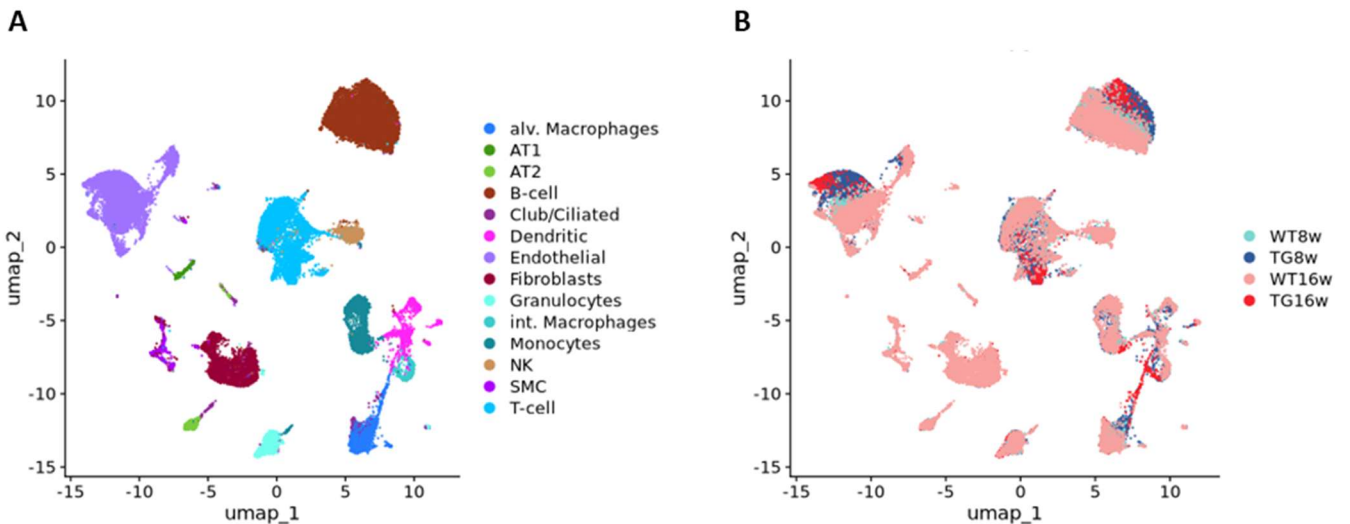


Abbildung 2: Single-cell RNA-Sequenzierungsdaten von *Fra-2* transgenen und Wildtyp Mäusen. A+B) Uniform Manifold Approximation and Projections (UMAPs) mit farblich hervorgehobenen Zelltypen (A) und Probenverteilung (B). (noch nicht publizierte Daten)

Während weitere Analysen noch laufen, bieten die bisher gewonnenen Daten bereits wertvolle Informationen und eine solide Grundlage für zukünftige Untersuchungen. Da diese Ergebnisse noch nicht veröffentlicht wurden, sind sie hier in verkürzter und zusammengefasster Form präsentiert, um die wissenschaftliche Integrität zu wahren und spätere Publikationen zu ermöglichen.

Die Unterstützung durch die ÖGP Wissenschaftsförderung hat entscheidend dazu beigetragen, dieses innovative Forschungsprojekt zur Rolle der zellulären Seneszenz bei der Sklerodermie-assoziierten Lungenbeteiligung voranzutreiben. Die neu gewonnenen Erkenntnisse liefern eine solide Grundlage für vertiefende Analysen und zukünftige Publikationen und eröffnen neue Perspektiven für die Einwerbung kompetitiver Fördermittel auf nationaler wie internationaler Ebene. Damit leisten sie nicht nur einen wichtigen Beitrag zur Stärkung der Lungenforschung in Österreich, sondern tragen auch wesentlich zum besseren Verständnis der Pathophysiologie chronischer Lungenerkrankungen bei – mit dem langfristigen Ziel, den wissenschaftlichen Fortschritt in konkrete Verbesserungen für Patientinnen und Patienten zu übersetzen.

## Referenzen

1. Volkmann ER, Fischer A. Update on morbidity and mortality in systemic sclerosis–related interstitial lung disease. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*. 22. Februar 2021;6(1).
2. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis & Rheumatism*. August 2013;65(8).

3. Maurer B, Busch N, Jüngel A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA, u. a. Transcription Factor Fos-Related Antigen-2 Induces Progressive Peripheral Vasculopathy in Mice Closely Resembling Human Systemic Sclerosis. *Circulation*. 8. Dezember 2009;120(23).
4. Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, u. a. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. Januar 2010;62(1).
5. Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, u. a. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 29. Juli 2008;105(30).
6. Birnhuber A, Biasin V, Schnoegl D, Marsh LM, Kwapiszewska G. Transcription factor Fra-2 and its emerging role in matrix deposition, proliferation and inflammation in chronic lung diseases. *Cellular Signalling*. Dezember 2019;64.
7. Martínez-Zamudio RI, Roux PF, de Freitas JANLF, Robinson L, Doré G, Sun B, u. a. AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells. *Nature Cell Biology*. 1. Juli 2020;22(7):842–55.
8. Birnhuber A, Jandl K, Biasin V, Fließner E, Valzano F, Marsh LM, u. a. Pirfenidone exacerbates Th2-driven vasculopathy in a mouse model of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*. Oktober 2022;60(4):2102347.
9. Birnhuber A, Crnkovic S, Biasin V, Marsh LM, Odler B, Sahu-Osen A, u. a. IL-1 receptor blockade skews inflammation towards Th2 in a mouse model of systemic sclerosis. *European Respiratory Journal*. September 2019;54(3).
10. Huang J, Maier C, Zhang Y, Soare A, Dees C, Beyer C, u. a. Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. November 2017;76(11).
11. Biasin V, Crnkovic S, Sahu-Osen A, Birnhuber A, El Agha E, Sinn K, u. a. PDGFR $\alpha$  and  $\alpha$ SMA mark two distinct mesenchymal cell populations involved in parenchymal and vascular remodeling in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1. April 2020;318(4):L684–97.
12. Saul D, Kosinsky RL, Atkinson EJ, Doolittle ML, Zhang X, LeBrasseur NK, u. a. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nature Communications*. 16. August 2022;13(1):4827.