

Aus der Klinik
für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

Die Rolle des 20S Proteasoms in Bezug
auf den Abbau pulmonaler Proteine und in der Pathogenese
des *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Carina Büren
2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Payam Akhyari

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius	CRD	<i>carbohydrate recognition domains</i>
3D	dreidimensional	Cys	Cystein
Å	Angström	Da	Dalton
ACN	Acetonitril	DCI	3,4-dichloroisocoumarin
Ala	Alanin	DMSO	Dimethylsulfoxid
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin	DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
AMP	Adenosin-Monophosphat	DTT	Dithiothreitol
APS	Ammoniumpersulfat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , akutes Lungenversagen	ESI	Elektrospray Ionisation
Arg	Arginin	g	Erdbeschleunigung
Asn	Asparagin	g	Gramm
Asp	Aspartat	Gln	Glutamin
ATP	Adenosin-Triphosphat	Glu	Glutamat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	Gly	Glycin
BrAAP	<i>branched chain amino acid preferring</i>	h	Stunde
BSA	Bovines Serum Albumin	H ⁺	Wasserstoffion, Proton
BZ-VGR	Benzoyl-VGR	H ₂ O	Wasser
bspw.	beispielsweise	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
bzw.	beziehungsweise	HCl	Chlorwasserstoff
c	Konzentration	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
C ₂ H ₂ Cl	Chlorethylen	His	Histidin
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat	Homo-PIPES	Homopiperazine-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
C ₂ H ₄ O ₂	Essigsäure	HSA	Humanes Serum Albumin
ca.	circa	Hsp	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockproteine
Ca ²⁺	Kalziumionen	IFN-γ	Interferon-γ
CaCl ₂	Calciumchlorid	IGV	In-Gel-Verdau
CaM	Calmodulin	Il	Interleukine
Cl ⁻	Chloridion	Ile	Isoleucin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	IPS	<i>intrinsic proteasome substrates</i>
cps	<i>counts per seconds</i> , Anzahl pro Sekunde	k	Kilo
CuSO ₄	Kupfersulfat	K ⁺	Kaliumion

KCl	Kaliumchlorid	p.a.	<i>pro analysi</i>
kg	Kilogramm	PA28	Proteasom Aktivator 28 kDa = 11S Regulator
l	Liter	PA700	Proteasom Aktivator 700 kDa = 19S Regulator
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PAA	Polyacrylamid
Leu	Leucin	PAF	<i>platelet activating factor</i> , Plättchenaktivierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid	PCWP	<i>pulmonary-capillary-wedge-pressure</i> , pulmonal-kapillärer-Verschlussdruck
Lys	Lysin	PEEP	<i>positive endexpiratory pressure</i> , positiver end-expiratorischer Druck
m	Masse	Phe	Phenylalanin
m	Meter	PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
m	milli, 10 ⁻³	Pro	Prolin
M	Molar	Q	Quadrupol
m/z	Masse/Ladung	RT	Raumtemperatur
Me	Methanol	SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> Natriumdodecylsulfat
Met	Methionin	SEM	<i>standard error of the mean</i> , Fehler der Standardabweichung
Met ^{ox}	oxidiertes Methionin	Ser	Serin
MgAc ₂	Magnesiumacetat	SNAAP	<i>small neutral amino acid preferring</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	SP	Surfactant-Protein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	Suc-LLVY	Carboxy-Propionyl-LLVY
MIF	<i>macrophage inhibitory factor</i> , Makrophagen inhibierender Faktor	Temed	Tetramethylethylendiamin
min	Minuten	Thr	Threonin
mol	mol	TNF- α	Tumornekrosefaktor α
MOV	Multiorganversagen	TOF	<i>Time of Flight</i>
MS	Massenspektrometrie	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie	Trp	Tryptophan
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht	Tyr	Tyrosin
n	Nano, 10 ⁻⁹	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
Na ⁺	Natriumion	ÜS	Überstand
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat	V	Volt
NaN ₃	Natriumacid	v	Geschwindigkeit
NaO ₂	Natriumhyperoxid		
NaOH	Natriumhydroxid		
NH ₄ HCO ₃	Amoniumhydrogenkarbonat		
O ₂	Sauerstoff		
OH	Hydroxylgruppe		
P	Zellpellet		

Val	Valin
vgl.	Vergleich
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel
Z-LLE	3-Carboxy-Propionyl-LLE
μ	mikro

II Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteasomen	1
1.2	Struktur der Proteasomen	2
1.2.1	Struktur des Standard 20S Proteasoms	2
1.2.1.1	α -Untereinheiten	3
1.2.1.2	β -Untereinheiten	4
1.2.2	Struktur anderer 20S Proteasomen	4
1.2.3	Struktur des 26S Proteasoms	5
1.2.3.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	6
1.3	Vorkommen der Proteasomen	8
1.3.1	Das intrazelluläre Proteasom	8
1.3.2	Das extrazelluläre Proteasom	8
1.4	Funktionen des Proteasoms	9
1.4.1	Die zentrale Rolle der Proteasomen im Proteinstoffwechsel	9
1.5	Proteasom-Inhibitoren	11
1.5.1	Überblick	11
1.5.2	Epoxomicin	12
1.6	Lungenphysiologie	14
1.6.1	Histologischer Aufbau einer gesunden Lunge	14
1.6.2	Das Surfactantsystem	15
1.6.2.1	Überblick	15
1.6.2.2	Surfactant-Protein A	16
1.7	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>	17
1.7.1	Definition	17
1.7.2	Ätiologie	18
1.7.3	Pathogenese	18
1.7.4	Reparaturmechanismen / <i>Remodelling</i>	19
1.8	Fragestellung	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Erklärung über die ethische Konformität der durchgeführten Versuche	22
2.2	Chemikalien	22
2.3	Bronchoalveoläre Lavage	22
2.4	Das 20S Proteasom	23
2.5	Fluoreszenz-Enzym-Assay	24
2.6	Surfactant-Protein A	26

2.7 Lowry-Proteinbestimmung	26
2.8 1D-Gelelektrophorese	27
2.9 Tryptischer In-Gel-Verdau	29
2.10 Massenspektrometrie	31
2.10.1 Technische Grundlagen	31
2.10.1.1 Elektrospray-Ionisation	32
2.10.1.2 Quadrupol	33
2.10.1.3 <i>Time of Flight</i>	33
2.10.1.4 Tandem Hybrid Massenspektrometer	34
2.10.2 Probenvorbereitung	34
2.10.3 Proteinidentifizierung	34
2.10.3.1 <i>Peptide mass fingerprint</i>	35
2.10.3.2 <i>Product Ion Scan</i>	35
2.11 <i>In-vitro</i>-Verdau Versuche	36
2.11.1 <i>In-vitro</i> -Verdau von Insulin	36
2.11.2 <i>In-vitro</i> -Verdau von humanem Serum Albumin	38
2.11.2.1 Grundaufbau des <i>in-vitro</i> -Verdaus von humanem Serum Albumin	38
2.11.2.2 Auswirkungen der Variation des Verdau-puffers auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von humanem Serum Albumin	39
2.11.3 <i>In-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	40
2.11.3.1 Grundaufbau des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A	40
2.11.3.2 Auswirkungen verschiedener 20S Proteasom Chargen auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	41
2.11.3.3 Auswirkungen der Variation des Oxidations-puffers auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	42
2.11.3.4 Kinetik des <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	42
2.11.3.5 Hemmung des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A durch Epoxomicin	42
2.11.3.6 Auswirkungen von Hitzeschokproteinen auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	43
2.12 Statistische Auswertungen	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Analyse der Bronchoalveolären Lavage	44
3.1.1 Proteinkonzentrationen in Bronchiallavagen	44
3.1.2 Proteinmuster und Proteinidentifizierung	46
3.1.2.1 Proteinmuster der BAL lungengesunder Probanden	46
3.1.2.2 Proteinmuster der BAL der ARDS-Patienten	48
3.1.2.3 Proteinidentifizierung	50

3.2	Proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms	54
3.2.1	Chymotrypsin-ähnliche Aktivität	54
3.2.2	Trypsin-ähnliche Aktivität	56
3.2.3	Caspase-ähnliche Aktivität	57
3.3	Der <i>in-vitro</i>-Verdau verschiedener Proteine	59
3.3.1	<i>In-vitro</i> -Verdau von Insulin	59
3.3.2	<i>In-vitro</i> -Verdau von humanem Serum Albumin	67
3.3.2.1	Optimierung der Versuchsbedingungen des <i>in-vitro</i> -Verdaus von humanem Serum Albumin	67
3.3.2.2	Grundlagen des <i>in-vitro</i> -Verdaus von humanem Serum Albumin	70
3.3.2.3	Auswirkungen des Verdau-puffers auf die Verdau-produkte im <i>in-vitro</i> -Verdau von humanem Serum Albumin	72
3.3.3	<i>In-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	75
3.3.3.1	Optimierung der Versuchsbedingungen des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A	75
3.3.3.2	Grundlagen des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A	78
3.3.3.3	Analyse verschiedener Proteasom-Chargen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	82
3.3.3.4	Auswirkungen des Verdau-puffers auf die Verdau-produkte im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	84
3.3.3.5	Kinetik des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A	86
3.3.3.6	Hemmung des <i>in-vitro</i> -Verdaus von Surfactant-Protein A durch Epoxomicin	89
3.3.3.7	Auswirkungen von Hitzeschockproteinen auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A	93
4	Diskussion	95
4.1	Limitationen	96
4.1.1	Technische Limitationen der Bestimmung der Proteinkonzentrationen	96
4.1.2	Technische Limitationen der Bestimmung der Proteinzusammensetzung und -identifizierung	96
4.1.3	Limitationen des Fluoreszenz-Enzym-Assays	97
4.1.4	20S Proteasom aus humanen Erythrozyten	98
4.2	Analyse des Verdauverhalten des 20S Proteasoms	98
4.2.1	Substratspezifika des 20S Proteasom Proteinverdaus	99
4.2.2	Analyse der Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms	103
4.2.3	Einfluss von Adapterproteinen auf den Verdau durch das 20S Proteasom	106
4.3	Die Bedeutung des 20S Proteasom in Bezug auf das ARDS	108
4.3.1	Anstieg der alveolären Proteinkonzentration im ARDS	108

4.3.2	Vergleichende Analyse der Proteinmuster bei lungengesunden Probanden und <i>ARDS</i> -Patienten	109
4.3.3	Identifikation für lungengesunde Probanden und für <i>ARDS</i> -Patienten spezifischer Proteine und deren Verdau durch das 20S Proteasom	110
4.3.3.1	Humanes Surfactant Protein-A	110
4.3.3.2	Humanes Serum Albumin	112
4.3.3.3	Übertragbarkeit des Modells des <i>in-vitro</i> -Verdaus durch das 20S Proteasom	114
4.3.3.4	<i>ARDS</i> – eine Erkrankung des Proteasomssystems?	115
4.3.3.5	Schlussfolgerung und Ausblick	118
5	Zusammenfassung	121
	Abbildungsverzeichnis	123
	Tabellenverzeichnis	125
	Literaturverzeichnis	126
	Danksagung	
	Eidesstattliche Versicherung	

1 Einleitung

1.1 Proteasomen

Proteasomen sind Multienzymkomplexe, welche maßgeblich am Proteinabbau beteiligt sind (1–3).

Der Proteinhaushalt einer Zelle unterliegt einem fließenden Prozess, bei dem viele Proteine einem ständigen Austausch unterliegen. Neue Proteine werden synthetisiert und zeitgleich defekte, fehlgefaltete und somit für die Zelle obsolet gewordene Proteine abgebaut. Um die Funktion und Lebensfähigkeit einer Zelle sicherzustellen, gibt es unterschiedliche Mechanismen, die den Proteinhaushalt beeinflussen (4–8). Hierfür stehen verschiedene proteolytische Systeme zur Verfügung, wie beispielsweise Lysosomen, Calpaine und Proteasomen (9–11).

Einen zentralen Stellenwert im nicht-lysosomalen Proteinabbau und damit in der Regulation des Proteinhaushalts aller Eukaryonten nehmen die Proteasomen ein (12–14). Sie zählen durch ihre Enzymaktivität zu den Peptidasen. Durch den Proteinabbau beeinflussen sie auch zelluläre Prozesse. Hierzu zählen z.B. physiologische Prozesse, wie die Regulation der Immunantwort, die Genexpression und der Zellzyklus, aber auch die Beeinflussung von Krankheitsbildern, wie z.B. Krebserkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen (15–19).

Generell kann das sogenannte Adenosintriphosphat (ATP)-Ubiquitin-abhängige Proteasomsystem (UPS) von dem ATP-Ubiquitin-unabhängigen Proteasomsystem unterschieden werden (7,20). Im UPS nimmt das 26S Proteasom - ein Komplex aus einem 20S Proteasom mit angelagerten Regulatoren - die zentrale Rolle ein, während im ATP-Ubiquitin-unabhängigen System das 20S Proteasom alleine die proteolytische Struktur bildet. Das Ubiquitin-System ist ein wichtiger Regulator des proteasomalen Abbaus, indem es Proteine, welche abgebaut werden sollen, ATP-abhängig markiert. Daneben existieren weitere Regulatoren, welche die Proteolyse beeinflussen und dabei direkt mit dem 20S Proteasom interagieren. Hierzu zählen sogenannte Proteasom Aktivatoren (*proteasome activator* 700 kDa = PA700 = 19S Regulator und *proteasome activator* 28 kDa = PA28 = 11S Regulator) (21,22).

1.2 Struktur der Proteasomen

1.2.1 Struktur des Standard 20S Proteasoms

Das Kernstück der Proteasomen wird durch die 20S Untereinheit (Standard 20S Proteasom, *constitutive* 20S, c20S) als proteolytisches Zentrum (*core*) gebildet. Sie hat eine Größe von ungefähr 700 kDa und ist zylinderförmig aufgebaut (1,4,23). Das Standard 20S Proteasom setzt sich aus vier homologen Ringen zusammen, wobei je zwei α - und zwei β -Ringe sich im Muster α - β - α anordnen, dass sie in ihrer Mitte einen zentralen Tunnel ausbilden (23). Jeder dieser Ringe besteht aus sieben Untereinheiten (α_{1-7} , β_{1-7}), welche je eine Größe von 20-30 kDa haben (Abb. 1).

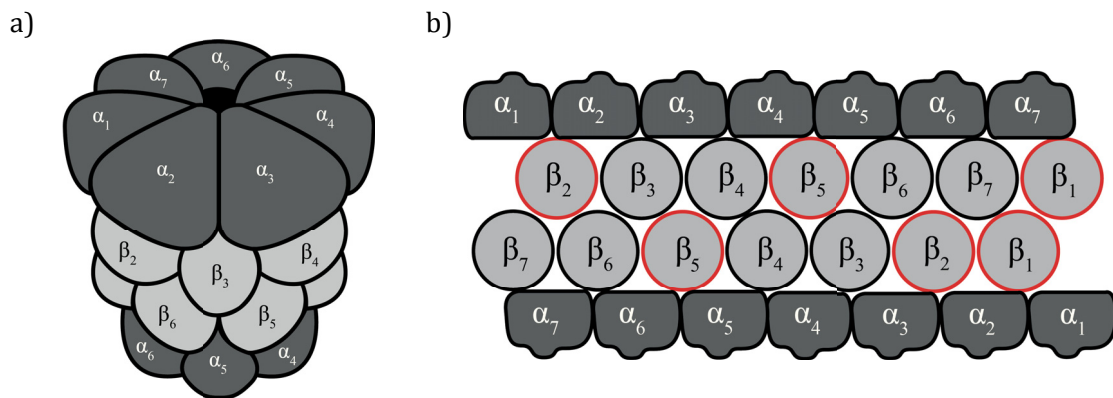


Abb. 1: Struktur des 20S Proteasoms. Die α -Untereinheiten sind dunkelgrau und die β -Untereinheiten sind hellgrau dargestellt. a) Überblick über die Anordnung der Untereinheiten des Proteasom-„Kerns“ zueinander. b) Das 20S Proteasom in entfalteter Form, so dass die Untereinheiten in planarer Form vorliegen, wobei die äußere Seite des Proteasoms in Richtung des Betrachters zeigt. Die proteolytischen β -Untereinheiten sind rot umrandet. Modifiziert nach Jung et al.; 2009 (4).

Die α -Untereinheiten sind dabei jeweils oben und unten an die β -Untereinheiten angelagert. Die äußeren α -Untereinheiten haben eine regulatorische Funktion, wohingegen drei der inneren β -Untereinheiten (β_1 , β_2 , β_5) für die Proteolyse verantwortlich sind (24,25).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die einzelnen Untereinheiten des 20S Proteasoms untersucht, um die Masse und die jeweils zugeordnete proteolytische Aktivität zu bestimmen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Systematik der Untereinheiten im 20S Proteasom.

Systematik	Untereinheit	Masse (kDa)	Aktivität	Quelle
α_1	Iota/PRS2	27,4		Petit <i>et al.</i> (26)
α_2	C3	25,9		Tokunaga <i>et al.</i> (27)
α_3	C9	29,5		Feist <i>et al.</i> (28)
α_4	C6/XAPC7	27,9		Dong <i>et al.</i> (29)
α_5	ZETA	26,4		Mayau <i>et al.</i> (30)
α_6	C2	30,2		Kania <i>et al.</i> (31)
α_7	C8	28,4		Bose <i>et al.</i> (32)
β_1	Y/Delta	25,3	Caspase-ähnlich	Chung <i>et al.</i> (33)
β_1 i	LMP2-i	23,2	Chymotrypsin-ähnlich	Dissemond <i>et al.</i> (34)
β_2	Z	30,0	Trypsin-ähnlich	Schweisguth <i>et al.</i> (35)
β_2 i	MECL-1-i	28,9	Trypsin-ähnlich	Scheffler <i>et al.</i> (36)
β_3	C10-II	22,9		Nishimura <i>et al.</i> (37)
β_4	C7-I	22,8		Nishimura <i>et al.</i> (38)
β_5	X/MB1	22,9	Chymotrypsin-ähnlich	Reidlinger <i>et al.</i> (39)
β_5 i	LMP7-i	30,4	Chymotrypsin-ähnlich	Scheffler <i>et al.</i> (36)
β_6	C5	26,5		Trachtulec <i>et al.</i> (40)
β_7	N3	29,2		Nothwang <i>et al.</i> (41)

Darstellung von Name, Masse und Aktivität der Untereinheiten im menschlichen 20S Proteasom. Die Systematik bezieht sich auf die Position der Untereinheiten in den α - und β -Ring in dem 20S Proteasom. Die molekularen Massen in kDa entsprechen den Untereinheiten im endgültig vorliegenden 20S Proteasom, das bedeutet nach erfolgter posttranskriptionaler Modifikation. Zusammengestellt nach Orłowski (42) und Coux *et al.* (1).

1.2.1.1 α -Untereinheiten

Damit es nicht zu einem unkontrollierten Abbau von Proteinen durch das 20S Proteasom kommt, wird die Erkennung und Weiterleitung von Substraten durch die α -Untereinheiten geregelt (4,24). Ist die Eintrittspforte für die zu verdauenden Proteine mit einer Weite von 9 Å zwischen den α -Untereinheiten verschlossen, spricht man vom inaktiven Zustand des 20S Proteasoms, ist sie mit einer Weite zwischen 13 und 20 Å geöffnet, liegt das Proteasom in der aktiven Form vor. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit hydrophoben Strukturen, sowie fehlgefaltete und defekte Proteine in der Lage sind, das Proteasom zu aktivieren (43). Diese Proteine führen durch Interaktion mit den α -Untereinheiten zu einer Konformationsänderung zwischen den amino-terminalen Enden der α_1 -, α_2 - und α_4 -Untereinheiten (24). Die Eintrittspforte öffnet sich und das Protein wird an die β -Untereinheiten weitergeleitet (42).

1.2.1.2 β -Untereinheiten

Die Funktion der β -Untereinheiten besteht im proteolytischen Abbau von Proteinen. Für drei der sieben Untereinheiten konnten proteolytische Aktivitäten nachgewiesen werden. Die β_1 -Untereinheit besitzt eine Caspase-ähnliche Aktivität, welche hinter den sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat enzymatisch schneidet (4,42,44). Die β_2 -Untereinheit mit einer Trypsin-ähnlichen Aktivität spaltet Proteine hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die β_5 -Untereinheit zeigt eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und schneidet unspezifischer als die zuvor beschriebenen Aktivitäten. Die enzymatischen Schnittstellen liegen hinter Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und Tryptophan (45). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die drei Untereinheiten hinsichtlich ihrer proteolytischen Potenz unterscheiden. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität besitzt die stärkste proteolytische Aktivität des Proteasoms, gefolgt von der Trypsin-ähnlichen und der Caspase-ähnlichen Aktivität (42,46,47).

Die katalytischen Zentren der β -Untereinheiten werden jeweils von einem N-terminalen Threonin (Thr 1) gebildet. Die β_7 -Untereinheit enthält zwar ein endständiges Threonin, jedoch zeigen Untersuchungen an Hefen, dass Mutationen an eben dieser Stelle keinen Effekt auf die proteolytische Aktivität des Proteasoms haben (46). Demzufolge besitzt die β_7 -Untereinheit trotz eines endständigen Threonins keine proteolytische Aktivität.

Wird ein Protein durch das Proteasom verdaut, entstehen Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von acht bis zwölf Aminosäuren (48,49).

1.2.2 Struktur anderer 20S Proteasomen

Neben dem bereits beschriebenen Standard 20S Proteasom existieren noch weitere Formen von 20S Proteasomen, die ebenfalls enzymatisch aktiv sind. Hierzu zählen das 20S Immunoproteasom (*immunoproteasome* 20S, i20S) und Mischformen (Hybridproteasomen) (50).

Das 20S Immunoproteasom unterscheidet sich vom Standard 20S Proteasom in seinen enzymatischen Aktivitäten an den β -Untereinheiten: Statt der β -Untereinheiten des 20S Proteasoms enthält es Untereinheiten, die mit β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} bezeichnet werden. Die Chymotrypsin-ähnliche und die Caspase-ähnliche Aktivität im

20S Immunoproteasom sind herunterreguliert, die Trypsin-ähnliche Aktivität bewirkt eine starke Proteolyse (50). Das 20S Immunoproteasom wird in immunrelevanten Zellen exprimiert, wobei sich dessen Bildung gezielt durch Zytokine, wie beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Lipopolysaccharid (LPS) induzieren lässt (50–55). Die durchschnittliche Länge der Peptide, die durch die Proteolyse des 20S Immunoproteasoms entstehen, beträgt acht bis zehn Aminosäuren (4). Diese Länge spielt hinsichtlich der Funktion des 20S Immunoproteasoms im Rahmen der Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle (56). Denn dies ist die optimale Größe für Peptide, um mit Hilfe des *major histocompatibility complex-I* (MHC-I) auf Zelloberflächen zur Antigenpräsentation angeboten zu werden. Sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* Studien zeigen, dass die Menge an kurzen Oligopeptiden mit dem Vorhandensein von 20S Immunoproteasom korreliert (57–59).

Die Mischformen des 20S Proteasoms enthalten sowohl β -Untereinheiten des Standard 20S Proteasoms als auch β i-Untereinheiten des 20S Immunoproteasoms. Ihre genaue Funktion ist bisher nicht erklärt (4).

1.2.3 Struktur des 26S Proteasoms

Da Proteasomen ein sehr effektives proteolytisches System sind, ist eine strenge Regulation von Bedeutung. Gäbe es keine definierten Regulationsmechanismen, könnte es zum unkontrollierten Proteinabbau kommen und in Folge dessen ein Zellschaden entstehen. Da sich die katalytischen Untereinheiten im Inneren der zylinderförmigen Proteasomen befinden, müssen die zu degradierenden Proteine zunächst in die Proteasomen hineingeschleust werden, um abgebaut werden zu können (60,61). Die oben beschriebenen α -Untereinheiten kontrollieren neben anderen Mechanismen den Proteineintritt und damit auch den Proteinabbau, weil sie nur Proteine einschleusen, welche in ihrer Struktur modifiziert sind.

Es stellt sich allerdings die Frage, welche Strukturen in der Lage sind, nicht modifizierte, nicht fehlgefaltete oder defekte Proteine, bei denen keine hydrophoben Strukturen freiliegen, zu erkennen und dem Proteasom zum Verdau anzubieten. In diesem Zusammenhang ist der 19S Regulator (*proteasome activator* 700 kDa = PA700) von besonderem Interesse. Je ein 19S Regulator setzt sich an die beiden Enden des 20S Proteasoms und fungiert dort als eine Art Kappe (Abb. 2). Der

Komplex aus zwei 19S Regulatoren und dem 20S Proteasom bildet das sogenannte 26S Proteasom mit einer Größe von > 2000 kDa. Soll ein ausgewähltes Protein in das proteolytische Zentrum geschleust werden, interagieren die 19S Regulatoren mit den α -Untereinheiten. Hierdurch öffnet sich die Eintrittspforte. Damit dieser Mechanismus funktioniert, sind neben dem 19S Regulator auch ATP als Energiequelle und Ubiquitin als Erkennungsmerkmal essentiell (7).

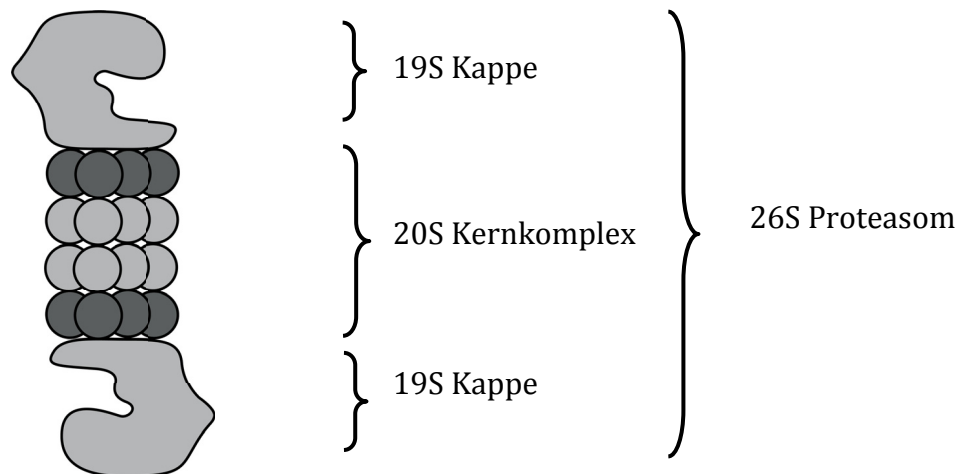


Abb. 2: Struktur des 26S Proteasoms. Das 26S Proteasom setzt sich zusammen aus einem 20S Kern und zwei regulatorischen 19S Kappen. Modifiziert nach Jung *et al.*; 2009 (4).

1.2.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Ubiquitin ist ein Protein bestehend aus 76 Aminosäuren, das ubiquitär in allen Eukaryonten vorkommt. Es markiert intrazelluläre Proteine, die vom Proteasomsystem abgebaut werden sollen. Sobald ein Protein an mindestens vier Ubiquitin-Molekülen gebunden vorliegt, kann es vom 26S Proteasom erkannt und proteolytisch abgebaut werden (62). Diese Markierung durch Polyubiquitinketten (= Polyubiquitylierung) ist abhängig von drei Enzymen:

Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 führt zu einer ATP-abhängigen Aktivierung des Ubiquitin. Die Aktivierung des Ubiquitin erfolgt über eine Thioester-Bindung zwischen dem Cystein-Rest des Enzyms E1 und dem C-terminalen Ende des Ubiquitin, dem Gly 76 (63). Im Folgenden wird das aktivierte Ubiquitin durch das Ubiquitin-konjugierende Enzym von E1 auf E2 übertragen (7). Die Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert anschließend die Reaktion zwischen dem aktivierten Ubiquitin

und dem Zielprotein, welches abgebaut werden soll (64). Daraufhin erkennt der 19S Regulator das markierte Protein, spaltet die Ubiquitin-Moleküle wieder ab, entfaltet das Protein und führt es dem proteolytischen Kern zu. (Abb. 3).

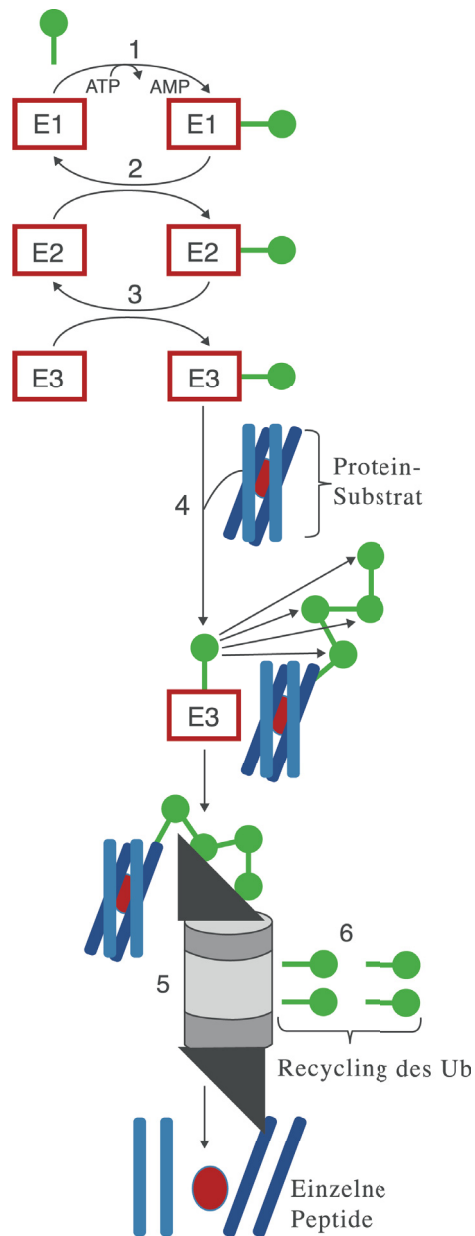


Abb. 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).

- 1) Ubiquitin-Aktivierung
- 2) Ubiquitin-Transfer von E1 auf E2
- 3) Ubiquitin-Transfer auf das substratspezifische E3
- 4) Komplex aus Substrat, E3 und Ubiquitin, Bildung einer Polyubiquitinkette
- 5) Bindung des Substrats an den 19S Regulator des 26S Proteasoms. Abbau des Proteins in Peptide
- 6) Ubiquitin-Recycling

AMP = Adenosin-Monophosphat

ATP = Adenosin-Triphosphat

E1 = Enzym 1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym

E2 = Enzym 2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym

E3 = Enzym 3: Ubiquitin-Ligase

Ub = Ubiquitin

modifiziert nach: Ciechanover; 1998 (7)

1.3 Vorkommen der Proteasomen

1.3.1 Das intrazelluläre Proteasom

Erstbeschreibungen der Proteasomen berichten von einem Protein, das an der Zellmembran von Erythrozyten haftet und die Form eines Hohlzylinders aufweist (65). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Großteil dieses Proteins, welches uns heute als Proteasom bekannt ist, nicht gebunden an der Zellmembran vorliegt, sondern in der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion einer Zelle vorkommt (66). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das Endoplasmatische Retikulum (ER) der Hauptsyntheseort für die Untereinheiten des Proteasoms ist und es dort mit Hilfe von Chaperonen arrangiert wird (67). Ferner liegen das 20S Proteasom, der 19S Regulator, das gesamte 26S Proteasom und einzelne Komponenten sowohl im Zytoplasma, Nukleus als auch an Zellmembranen gebunden vor (68). Das 20S Immunoproteasom konnte ebenfalls intrazellulär nachgewiesen werden (52).

Das Standard 20S Proteasom wird in allen eukaryontischen Zellen exprimiert, das 20S Immunoproteasom hingegen nur in Zellen, die entweder an der Immunantwort beteiligt sind (Lymphknoten, Milz, Thymus) oder solche, die zuvor Zytokinen (IFN- γ , TNF- α) oder LPS ausgesetzt wurden, die eine Entstehung der spezifischen β i-Untereinheiten induzieren (55,57).

1.3.2 Das extrazelluläre Proteasom

Ging man viele Jahre davon aus, dass Proteasomen ausschließlich intrazellulär vorkommen, ist heute belegt, dass Proteasomen auch extrazellulär existieren. Zuerst wurde das sogenannte zirkulierende, extrazelluläre Proteasom im menschlichen Blutplasma beschrieben (18). Aber auch in Sperma und Liquor konnten extrazelluläre Proteasomen nachgewiesen werden (69,70). Biologisch aktives 20S Proteasom ist ebenfalls im menschlichen Alveolarraum vorhanden (12,71–73).

Die genauen Mechanismen des Transportes des 20S Proteasoms nach extrazellulär sind noch nicht verstanden (73). Auch wenn die passive Freisetzung durch Zelllyse nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, geht man vor allem von direkten, regulierten Transportmechanismen über die Zellmembran aus (12,74). Die Untereinheiten des Proteasoms enthalten jedoch keine Signalsequenzen, welche den klassischen sekretorischen Weg von intra- nach extrazellulär unterstützen. Vielmehr

geht man davon aus, dass alternative Sekretionsmechanismen wie bspw. sekretorische Lysosomen und Plasmamembranständige Transporter beteiligt sind (75,76). Zudem konnte gezeigt werden, dass die primär intrazellulär vorkommenden 20S Proteasomen unter anderem durch Lymphozyten und kultivierte C6 Astrozyten nach extrazellulär freigesetzt werden können (77,78).

Eine aktuelle Studie zeigte, dass das extrazelluläre 20S Proteasom nicht nur aus Zellen freigesetzt wird, sondern auch eine funktionelle Rolle spielt. Primäres Ziel dieser Studie war die Identifizierung von membrangebundenen Faktoren, die mit Hilfe eines monoklonalen gegen Membranpräparationen von wachsenden Gefäßen gerichteten Antikörpers identifiziert werden sollten (79). Dabei zeigte die Gruppe *in-vitro* und *in-vivo*, dass dieser Antikörper an sog. *vascular resident endothelial progenitor cells* assoziiertes extrazelluläres 20S Proteasom bindet, dieses aktiviert und somit die Proliferation von *vascular resident endothelial progenitor cells* und die Anzahl und Proliferation von kollateralen arteriellen Gefäßen hemmt. Somit konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre 20S Proteasom auch eine entscheidende Rolle in physiologischen Prozessen spielt (79).

1.4 Funktionen des Proteasoms

1.4.1 Die zentrale Rolle der Proteasomen im Proteinstoffwechsel

Es existieren verschiedenste Mechanismen des Proteinabbaus in eukaryontischen Zellen. Das Proteasomsystem hat hierbei einen zentralen Stellenwert, weil es den Hauptteil des extralysosomalen Proteinabbaus ausmacht (1,6). Intrazelluläre Proteine müssen einer strikten Qualitätskontrolle unterliegen, weil die Akkumulation von defekten Proteinen die normale Zellfunktion beeinträchtigt und die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzt (6).

Zu den Substraten der Proteasomen zählen vor allem defekte und fehlgefaltete Proteine. Die ständige Proteinsynthese, äußere Einflüsse und der zelluläre Stoffwechsel führen dazu, dass Proteine beschädigt werden und ihrer eigentlichen Funktion nicht mehr gerecht werden. Zellulärer Stress, insbesondere in Form von Hitzeschock und freien Radikalen, führt sowohl zu Fehlfaltungen als auch zur Oxidation von Proteinen (80). Parallel zum Funktionsverlust der Proteine tritt auch ein Verlust ihrer dreidimensionalen (3D) Struktur auf (80). In Folge werden

hydrophobe Regionen innerhalb der Aminosäuresequenz freigelegt, die wiederum mit Chaperonen in Interaktion treten. Durch Chaperone werden die Proteine entweder repariert oder zum Substrat für die Ubiquitin-Ligase (E3). Die Ubiquitin markierten Proteine werden von den 19S Regulatoren erkannt, entfaltet und durch das 26S Proteasom abgebaut.

Chaperone sind Proteine, welche sowohl als Faltungshilfen für Proteine agieren, als auch in der Lage sind, defekte Proteine zu entfalten und deren Abbau einzuleiten (81). Die Expression von Chaperonen steht in engem Zusammenhang zum intrazellulär auftretenden Stress, wie bspw. oxidativem Stress (82). Zu den Chaperonen zählen als deren wichtige Vertreter die Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, hsp). Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90) ist ein ubiquitär vorkommendes Chaperon, welches unter ATP-Verbrauch defekte Proteine zurück- oder entfalten kann. Nach erfolgter Entfaltung eines defekten Proteins kann Hsp 90 direkt mit den α -Untereinheiten der Proteasomen interagieren und eine Substratbindung zwischen zellulären Proteinen und Proteasomen ermöglichen (83–85). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass Hsp 90 den Abbau von Calmodulin durch das 20S Proteasom verbessert (86). In dieser Arbeit sollte daher auch untersucht werden, ob der Verdau von Surfactant-Protein A (SP-A) durch das 20S Proteasom in Anwesenheit von Hsp 90 positiv beeinflusst wird.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Proteasomen in der Lage sind, Ubiquitin-unabhängig Proteine abzubauen (87,88). Sowohl 26S Proteasomen als auch 20S Proteasomen können oxidierte Proteine direkt als Substrat erkennen, ohne dass diese zuvor durch eine Polyubiquitinkette markiert worden sind (89–96). Die β -Untereinheiten des 20S Proteasoms können hydrophobe Regionen, die im Rahmen von Fehlfaltungen freigelegt werden, erkennen und eine Proteindegradation einleiten. Strukturlose Regionen in der Aminosäurekette können ebenfalls direkt von 20S Proteasomen identifiziert werden. Diese Art des Proteinabbaus wird auch als *degradation by default* bezeichnet (20). Abb. 4 gibt einen Überblick über die beiden Möglichkeiten des Proteinabbaus. Oxidation von Proteinen führt zu deren vermehrtem Abbau durch das 20S Proteasom. Oxidation ist dabei ein entscheidender Faktor für die Proteolyse durch das 20S Proteasom (88). Interessanterweise hat die Oxidation aber kaum Auswirkungen auf den Abbau durch das 26S Proteasom, selbst wenn ATP und Ubiquitin in ausreichendem Maße vorhanden sind (87,89,91).

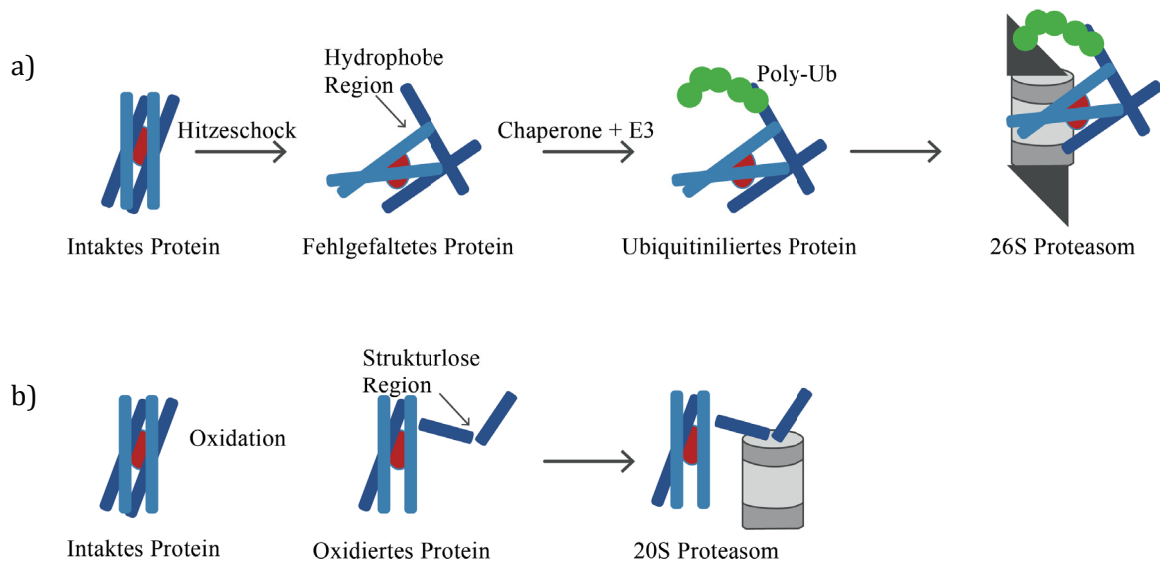


Abb. 4: Abbau defekter Proteine durch das Proteasomsystem. a) Das ATP-Ubiquitin-abhängige Proteasomsystem (UPS): Zellulärer Stress, wie z. B. Hitzeschock, erzeugt fehlgefaltete Proteine. Hydrophobe Regionen werden dadurch freigelegt und von Chaperonen und den substratspezifischen E3-Enzymen erkannt. Die darauf folgende Polyubiquitylierung (Poly-Ub) veranlasst das 26S Proteasom zum Abbau des Proteins. b) Das ATP-Ubiquitin-unabhängige System: Oxidation führt zum Verlust von Sekundärstrukturen und somit zu strukturlosen Regionen im Protein. Diese werden direkt von den regulatorischen α -Untereinheiten des 20S Proteasoms erkannt und das Protein wird abgebaut. Modifiziert nach: Kurepa, Smalle; 2008 (80).

1.5 Proteasom-Inhibitoren

1.5.1 Überblick

Das 20S Proteasom umfasst mehrere proteolytische Aktivitäten. Allen gemeinsam ist, dass sie in ihrem aktiven Zentrum ein N-terminales Threonin (Thr) aufweisen und zur Klasse der Threonin-Proteasen gehören. Protease-Inhibitoren sind aus zwei Komponenten aufgebaut, einem kurzen Peptid und dem sogenannten Pharmakophor, welches für eine reversible oder irreversible Hemmung des katalytischen Zentrums verantwortlich ist. Die Inhibitoren lassen sich in natürliche und synthetische Inhibitoren einteilen (Tabelle 2).

Da das Proteasom unterschiedliche Aktivitäten besitzt, können die Inhibitoren diese in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S Proteasoms ist im Vergleich zur Trypsin- und Caspase-ähnlichen Aktivität am stärksten proteolytisch wirksam, so dass eine Hemmung dieser Aktivität die stärkste Reduktion des Proteinabbaus bewirkt (9,46). Dabei müssen nicht alle Aktivitäten gehemmt werden, um bereits einen merklichen Effekt auf den Proteinabbau zu erzielen. Die meisten Proteasom-Inhibitoren blockieren das Proteasom unspezifisch

und beeinflussen auch andere Proteasen. Es ist eine große Herausforderung, rein spezifische Proteasom-Inhibitoren zu identifizieren, da die proteolytischen Einheiten in Calpainen und lysosomalen Cathepsinen den proteolytischen Untereinheiten im Proteasom ähnlich sind. Dementsprechend funktionieren sie auch auf ähnliche Weise und werden durch verschiedene Proteasom-Inhibitoren in ihrer Funktion gehemmt.

Tabelle 2: Proteasom-Inhibitoren.

Synthetische Inhibitoren		Natürliche Inhibitoren	
Gruppe	Beispiele	Gruppe	Beispiele
Peptid-Aldehyde	ALLN MG132 MG115 PSI Leupeptin Peptid glyoxal CEP1612 Fellutamide B	Epoxyketone	Epoxomicin Eponemicin Dihydroeponemycin TMC-86A,86B,89A,96 YU101
Peptid-Boronate	PS- 341 PS- 273 DFLB	Lactacystin	Clasto-b-lactone PS-519
Peptid-Vinyl-Sulfone	NLVS (125I)YL3VS NIP-Leu-Leu-Asn-VS Ada-(125I)Tyr-Ahx3-Leu3-VS Ada-Lsy(Bio)-Ahx3-Leu3-VS	Weitere	DCI TMC-95A Gliotoxin Syringolin A Glidobactin A
α-Ketoaldehyde			
α-Ketoamide			

Es existieren zwei Klassen von Proteasom-Inhibitoren: Synthetische und natürliche Inhibitoren. Allen ist gemeinsam, dass sie aus einem Peptid und einem Pharmakophor zusammengesetzt sind. Modifiziert nach Jung *et al.* (4).

1.5.2 Epoxomicin

Epoxomicin ist ein natürlich vorkommender, sehr potenter, selektiver Inhibitor des 20S Proteasoms (97). Es ist ein Epoxyketon, welcher aus einem Actinomyceten-Bakterienstamm isoliert wurde (98). Epoxomicin reagiert sowohl mit der Hydroxyl- als auch der Aminogruppe des N-terminalen Threonins in den katalytischen Untereinheiten und bildet so zusammen mit dem katalytischen Zentrum des Proteasoms einen sechs-gliedrigen Morpholin-Ring (Abb 5).

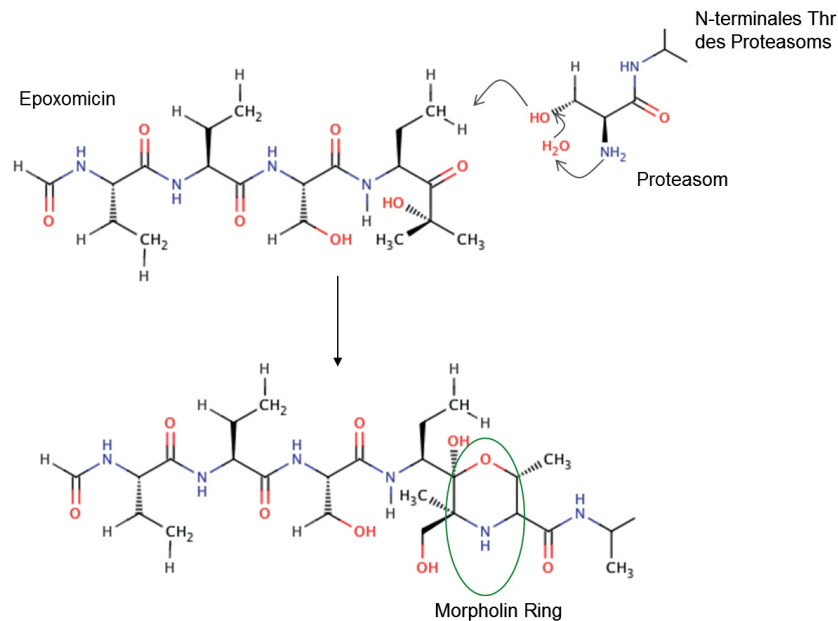


Abb. 5: Morpholin Ringbildung zwischen dem 20S Proteasom und Epoxomicin. Das N-terminale Threonin (Thr) des katalytischen Zentrums in der β -Untereinheit reagiert sowohl mit seiner Hydroxyl- als auch seiner Aminogruppe mit Epoxomicin. Modifiziert nach: Jung et al.; 2009 (4).

Epoxomicin bindet kovalent an die katalytischen Untereinheiten β_2 , β_{2i} , β_5 und β_{5i} und hemmt deren Aktivität (97). Die einzelnen proteolytischen Aktivitäten werden durch den Epoxomicin in unterschiedlichem Maße herunterreguliert (97). Dabei wird die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität am stärksten blockiert. Epoxomicin ist ein irreversibler Proteasom-Inhibitor, der sowohl das 20S Proteasom als auch das Immunoproteasom inhibiert. Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren, wie bspw. den Peptid-Aldehyden, ist Epoxomicin ein sehr spezifischer Inhibitor, weil er praktisch keinen Einfluss auf nicht-proteasomale Proteasen, wie bspw. Cystein- oder Serin-Proteasen und Calpaine hat (97). Diese Eigenschaften von Epoxomicin ermöglichen die Durchführung gezielter und näherer Untersuchung der Proteasomsysteme.

In einer Reihe von Arbeiten konnten Sixt und Mitarbeiter extrazelluläres Proteasom in den Lungenalevolen detektieren (12,71). Weitere Arbeiten zeigten, dass extrazelluläres Proteasom möglicherweise eine wichtige pathophysiologische Komponente bei Lungenerkrankungen, wie z.B. dem *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*, ist (72,99). Da in der vorliegenden Arbeit ein solcher etwaiger pathophysiologischer Zusammenhang zwischen dem extrazellulären 20S Proteasom und dem ARDS näher untersucht wurde, werden im Folgenden kurz die Lungenphysiologie und die aktuellen Kenntnisse des ARDS umrissen.

1.6 Lungenphysiologie

1.6.1 Histologischer Aufbau einer gesunden Lunge

Das respiratorische System lässt sich funktionell in einen luftleitenden und einen gasaustauschenden Abschnitt unterteilen (100): Der luftleitende Abschnitt umfasst Nasenhöhle, Kehlkopf, Trachea, Bronchien, Bronchiolen und *Bronchioli terminales*. Die *Bronchioli respiratorii* und die Alveolen bilden den gasaustauschenden Abschnitt.

300-400 Millionen Alveolen sind für den Austausch von Sauerstoff (O_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) verantwortlich. Die Alveolen liegen dicht aneinander und werden durch Interalveolarepten getrennt. Diese setzen sich aus dem Lungeninterstitium und dem beidseitig anliegenden Alveolarepithel zusammen. Das Lungeninterstitium besteht aus Fibroblasten, Kollagenfasern, elastischen Fasern und Blutkapillaren. Das Alveolarepithel bildet sich aus den Pneumozyten Typ I und Typ II. Die Pneumozyten Typ I stellen ungefähr 90% der Alveolaroberfläche dar. Es sind nicht-teilungsfähige Zellen, welche - angepasst an ihre Funktion, den Gasaustausch - eine sehr abgeflachte Form haben. Die Pneumozyten Typ II sind kubische Zellen mit zahlreichen, gut ausgebildeten Zellorganellen. Sie produzieren Surfactant, welches dicht gepackt in Lamellenkörpern innerhalb der Zelle gespeichert wird. Es kann jederzeit aus den Lamellenkörpern in den Alveolarraum freigegeben werden und führt dann an der Oberfläche des Alveolarepithels zur Spannungsreduktion. Kommt es zur Beeinträchtigung des Alveolarepithels proliferieren die Pneumozyten Typ II, um sich zu Pneumozyten Typ I zu differenzieren. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die Alveolaroberfläche intakt bleibt. Die Alveolen sind in ihrem Inneren nahezu komplett mit Luft gefüllt. Ein dünner Flüssigkeitsfilm, das sogenannte *epithelial lining fluid* überzieht diese von innen. Dieser Flüssigkeitsfilm setzt sich zusammen aus Wasser, Ionen (insbesondere Natrium- und Chloridionen), Proteinen (inklusive der Immunglobuline und Surfactant Proteine (SP)) und Antioxidantien (101). Auf der interstitiellen Seite stehen die Alveolen in Kontakt zu den Blutkapillaren, um den Gasaustausch zu gewährleisten. Die sogenannte Blut-Luft-Schranke bildet die Grenze zwischen den beiden Kompartimenten. Diese kann durch Entzündungen, z.B. im Rahmen eines ARDS, deutlich beeinträchtigt werden (Abb. 6).

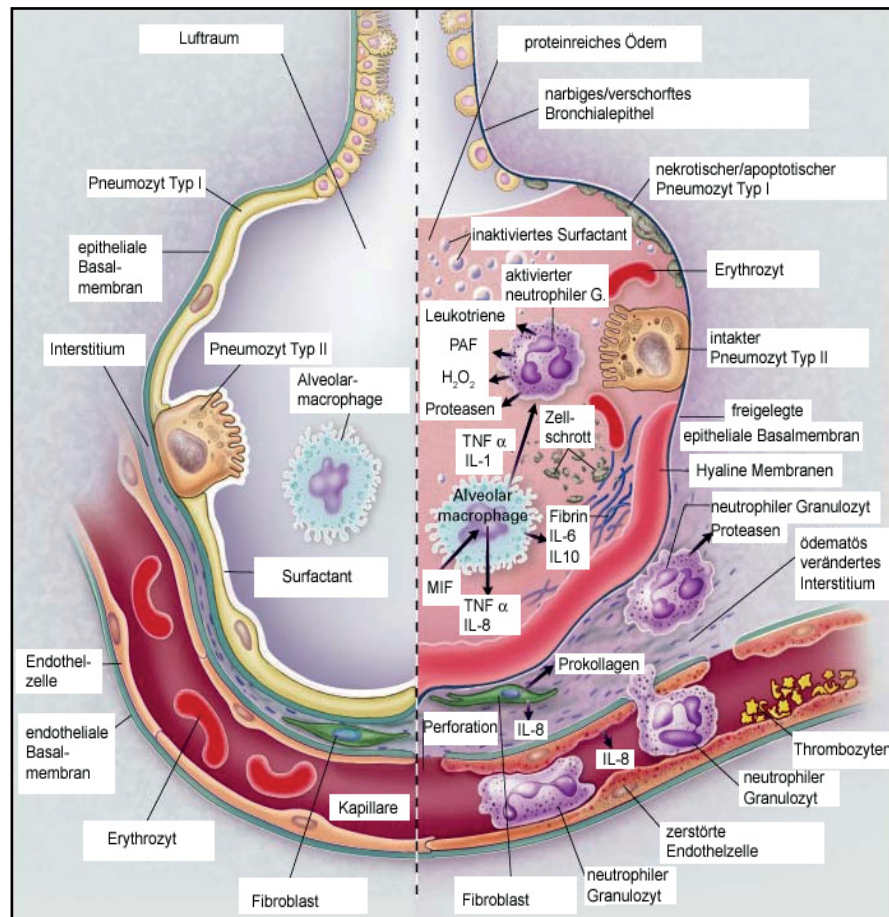


Abb. 6: Intakte (links) und beeinträchtigte (rechts) Lungen-Alveole in der akuten Phase einer Entzündungsreaktion. Im Rahmen des *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)* ist das Innere der Alveole angereichert mit proteinreichem Ödem, Entzündungsmediatoren (Interleukine (IL), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) u.a.) und Zell-Lyse-Produkten. Hyaline Membranen kleiden die Alveolen von innen aus. Die Integrität des gasaustauschenden Lungenabschnitts geht verloren. Die Entzündungsreaktion hat zur Folge, dass Surfactant inaktiviert wird und die Oberflächenspannung der Alveolarmembran zunimmt. (PAF=platelet activating-factor; MIF=macrophage inhibitory factor). Modifiziert nach Ware; 2000 (102).

1.6.2 Das Surfactantsystem

1.6.2.1 Überblick

Surfactant (*surface active agent*, Antiatelektasefaktor) ist ein essentieller Bestandteil des *epithelial lining fluid* reifer Lungen. Als oberflächenaktive Substanz reduziert es die Oberflächenspannung der Lungen, damit die Alveolen entfaltet bleiben, und hat somit eine essentielle physiologische Funktion (103).

Mit ungefähr 90% sind amphiphile Phospholipide, vor allem das Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC), der Hauptbestandteil des Surfactant und verantwortlich für die Reduktion der Oberflächenspannung (104). Die SP machen ungefähr 5-10% des Surfactant aus und setzen sich aus SP-A, SP-B, SP-C und SP-D zusammen

(Tabelle 3). Ihnen kommen unterschiedliche Funktionen zu: SP-B und C sind wichtig für die Reduktion der Oberflächenspannung. Sowohl SP-A als auch SP-D haben ihre Funktion in der lokalen Abwehrreaktion der Lunge. SP-A ist außerdem ein wichtiger Faktor zur Regulation des Surfactant Stoffwechsels.

Tabelle 3: Surfactant-Proteine (SP) (104).

	Größe	Struktur	Polarität	Funktion
SP-A	630 kDa	Hexamer	hydrophil	Immunität Surfactant-Homöostase
SP-B	14 kDa	Monomer	hydrophob	Reduktion der Oberflächenspannung
SP-C	6 kDa	Monomer	hydrophob	Reduktion der Oberflächenspannung
SP-D	520 kDa	Tetramer	hydrophil	Immunität

1.6.2.2 Surfactant-Protein A

SP-A als Hauptprotein des Surfactant, ist ein hydrophiles Molekül, das sich aus sechs homologen Untereinheiten zusammensetzt (104). Diese Untereinheiten bestehen ihrerseits aus drei Polypeptidketten (je einer SP-A1 Kette und zwei SP-A2 Ketten), welche über Disulfidbrücken verbunden sind (Abb. 7).

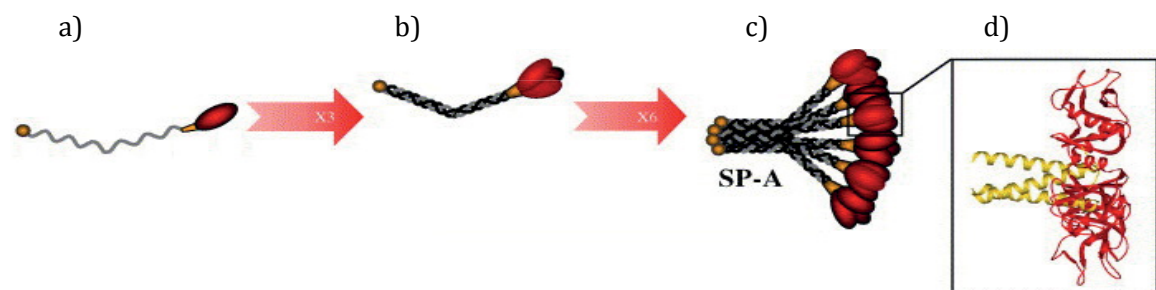


Abb. 7: Aufbau von humanem Surfactant-Protein A (SP-A). a) Polypeptidkette aus 248 Aminosäuren. b) Zusammenschluss von 3 Polypeptidketten (x3) zu einem SP-A Trimer. Disulfidbrücken in der N-terminalen Region verknüpfen die Polypeptidketten miteinander. c) SP-A Hexamer (x6). Insgesamt 18 Polypeptidketten bilden ein SP-A Molekül. d) Röntgen-Kristallographie eines SP-A Trimers. Modifiziert nach Kishore *et al.*; 2005 (104).

SP-A zählt zu den Kollagen-enthaltenden C-type Lectinen, den sogenannten Collectinen. Eine einzelne SP-A Polypeptidkette wird aus 248 Aminosäuren gebildet, wobei folgende Regionen unterschieden werden: amino-terminale Region (7 Aminosäuren), Kollagen-Region (73 Aminosäuren), Neck-Region (34 Aminosäuren), CRD (*carbohydrate recognition domains*) -Region (123 Aminosäuren). Die Kollagen-Region setzt sich aus der wiederkehrenden Sequenz Gly-X-Y zusammen, welche an Aminosäure 67 (Prolin) durchbrochen wird.

1.7 *Acute Respiratory Distress Syndrome*

1.7.1 Definition

Das akute Lungenversagen bzw. *ARDS* ist gekennzeichnet durch eine akute respiratorische Insuffizienz, die in Folge einer Vielzahl verschiedener pulmonaler Schädigungen entstehen kann (102,105).

In der Vergangenheit versuchten verschiedene Definitionen das *ARDS* zu beschreiben. Lange galten die auf der *American-European Consensus Conference* festgelegten Kriterien zur Definition des *ARDS* (106,107). Dabei wurde das *ARDS* über folgende Kriterien definiert (108): Horowitz Quotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ≤ 300 , akuter Beginn, bilaterale Infiltrate in der Röntgenaufnahme, pulmonal – kapillärer Verschlussdruck (PCWP) ≤ 18 mmHg. 2011 veröffentlichte die Europäische Gesellschaft für Intensivmedizin die Berlin-Definition, welche heute zur Anwendung kommt (109). Hierbei werden drei Schweregrade, entsprechend dem Grad der Hypoxämie unter Beachtung des positiven end-expiratorischen Druckes (PEEP), unterschieden:

1. Mild: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 201\text{--}300$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H₂O
2. Moderat: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 101\text{--}200$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H₂O
3. Schwer: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg, bei einem PEEP ≥ 5 cm H₂O

Zur Definition gehören weiterhin der akute Beginn (innerhalb einer Woche), bilaterale Infiltrate in der Röntgenaufnahme bzw. der Computertomographie und die Ursache des Lungenödems. Ein kardiales Lungenödem muss definitionsgemäß ausgeschlossen werden. Hierfür wird heute, im Gegensatz zum früher verwendeten Pulmonalkatheter, die Echokardiographie empfohlen.

Im Gegensatz zur bisherigen Definition korreliert die Berlin-Definition besser mit dem Mortalitätsrisiko: Es liegt bei 27 % bei mildem *ARDS*, 32 % bei moderatem und 45 % bei schwerem *ARDS* (109).

1.7.2 Ätiologie

Die Ursachen eines *ARDS* lassen sich in intrapulmonale und extrapulmonale untergliedern. Die häufigste Ursache einer direkten pulmonalen Schädigung (= intrapulmonales *ARDS*) ist die Aspiration von Mageninhalt. Die Lunge kann aber auch durch Inhalationstraumata, beispielsweise bei der Inhalation von toxischen Gasen oder hyperbarem Sauerstoff, durch Intoxikationen, Kontusion, Transplantationen, Embolien oder Beinahe-Ertrinken direkt geschädigt werden. Dem gegenüber stehen die indirekten pulmonalen Schädigungen (= extrapulmonales *ARDS*). Sepsis und Multiorganversagen (MOV) mit Schock sind die häufigsten Ursachen. Massentransfusionen, Verbrauchskoagulopathie, die akute Pankreatitis und Drogenintoxikationen sind seltenere Ereignisse (102).

1.7.3 Pathogenese

Die Pathogenese des *ARDS* wird in drei Stadien eingeteilt (102,110):

1. Die akute bzw. inflammatorische, exsudative Phase

Die alveolär-kapilläre Membran wird durch Einwirkung unterschiedlichster Noxen zerstört. Zunächst wird nur das kapilläre Endothel beschädigt. Dies führt zu einer gesteigerten Kapillarpermeabilität, so dass ein interstitielles Lungenödem entsteht. Es tritt eine Entzündungsreaktion auf, die mit einem massiven Einstrom an neutrophilen Granulozyten einhergeht. Diese wiederum setzen Entzündungsmediatoren, Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies frei.

2. Die subakute bzw. proliferative Phase

Durch die oben genannten Mechanismen kommt es auch zur Zerstörung der alveolären Epithelmembran. Typ I und Typ II Pneumozyten gehen zugrunde. Der Surfactant-Haushalt ist gestört, und die Oberflächenspannung der Lunge stark erhöht. Flüssigkeit, Proteine und zelluläre Bestandteile treten in die Alveolen über. Auf diese Weise entsteht ein alveoläres Lungenödem. Der Proteinanteil im Alveolarraum ist hierbei stark erhöht, und es bilden sich hyaline Membranen.

3. Die chronische bzw. fibrosierende Phase

Die Spätphase ist durch fibroproliferative Prozesse gekennzeichnet. Die Anzahl von neutrophilen Granulozyten verringert sich, während parallel die Menge an Lymphozyten und Makrophagen zunimmt. Die Membranen zwischen Kapillaren und Alveolen verdicken sich, so dass sich im Zuge dieser Endothelproliferation eine Lungenfibrose entwickelt. Die verlängerte Diffusionsstrecke und die zunehmende Perfusionsverschlechterung führen im Endstadium zur respiratorischen Insuffizienz (72,102,105,111). Dieses Stadium ist irreversibel.

1.7.4 Reparaturmechanismen / *Remodelling*

Patienten, die ein *ARDS* überleben, weisen eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich zum Zustand während des *ARDS* auf. Zurückbleibende Schäden sind meist milde Restriktionseinschränkungen, Obstruktionen und Gasaustauschstörungen mit einer verminderten CO₂-Diffusionskapazität (102,112–114). Radiologische Befunde bei *ARDS* überlebenden Patienten zeigen in 80 % der Fälle keine pathologischen Veränderungen, wohingegen in 20 % der Fälle eine Lungenfibrose, Pleuraverdickungen und bullöse Veränderungen nachgewiesen werden können (115). Histopathologisch kann nach *ARDS* zwar ein diffuser alveolärer Schaden mit intraalveolärer Fibrose und zystischen Veränderungen zurückbleiben, jedoch verfügen die Alveolen auch über zahlreiche Reparaturmechanismen, welche ein sogenanntes *Remodelling* ermöglichen. Hierbei werden defekte alveoläre Zellen und hyaline Membranen abgebaut, und die Alveolarintegrität wieder hergestellt. Welche Mechanismen dem *Remodelling* zugrundeliegen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt, allerdings scheinen verschiedene Systeme involviert zu sein: Zum einen sind zelluläre Prozesse, wie bspw. eine Reepithelialisierung durch Fibroblastenproliferation, die Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarkszellen, die Expression von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) und die Apoptose der Zellen selbst beteiligt (112,116–120). Des Weiteren greifen alveoläre Enzymsysteme in die Reparaturmechanismen ein. Hierzu zählen die Proteasomen, neutrophile Granulozyten durch vermehrte Produktion von Elastase, Kollagenase und weiteren Enzymen und die Makrophagen durch die Freisetzung von Mediatoren und Wachstumsfaktoren (121,122). Auch lösliche Peptide wie bspw. Interleukine scheinen eine Auswirkung auf das *Remodelling* zu haben (123,124).

1.8 Fragestellung

Proteasomen haben als Multienzymkomplexe eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung und Regulation des Proteinhaushaltes, in dem sie mit ihren unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten Proteine abbauen. Extrazelluläre Proteasomen konnten in der Lunge nachgewiesen werden (71,73).

Das *ARDS* ist eine Erkrankung, die durch eine erhöhte Kapillarpermeabilität mit einem erhöhten Proteingehalt im Alveolarraum einhergeht. Extrazelluläres, biologisch aktives 20S Proteasom und Immunoproteasomkomponenten konnten in den Alveolen von *ARDS*-Patienten in deutlich höheren Konzentrationen als bei lungengesunden Probanden nachgewiesen werden (72,99). Trotz der erhöhten alveolären Proteasomkonzentration ist die proteasomale Aktivität des 20S Proteasoms im Vergleich zu Gesunden herabgesetzt (72,99). Als Ursache hierfür wurde ein Inhibitor des Proteasoms diskutiert (72). Die vorliegende Arbeit hat daher folgende Fragestellungen:

1. Können die beschriebenen erhöhten Proteinkonzentrationen in den in dieser Arbeit verwendeten BAL-Proben von *ARDS*-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Probanden bestätigt werden?
2. Können mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese in BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten unterschiedliche Proteinmuster identifiziert werden?
3. Welche spezifischen Proteine lassen sich massenspektrometrisch in einzelnen, für lungengesunde Probanden und *ARDS*-Patienten markanten Proteinbanden identifizieren?
4. Für solche identifizierten Proteine, von denen eine pathophysiologische Bedeutung für das *ARDS* vermutet wird, soll anschließend ihr Verdau durch das 20S Proteasom analysiert und die Verdau-Produkte massenspektrometrisch bestimmt werden. Insbesondere sollten hierbei folgende Fragestellungen geklärt werden:
 - a) Welche Bedeutung haben die höheren Proteinstrukturen für den Verdau durch das 20S Proteasom? Müssen die identifizierten Proteine modifiziert werden

(z.B. durch Oxidation) und Proteinstrukturen degradiert werden, damit sie dem Verdau durch das 20S Proteasom zugänglich sind?

- b) Welche Aktivitäten des Proteasoms sind am Verdau bzw. sind die einzelnen proteasomalen Aktivitäten in unterschiedlicher Weise an dem Verdau der identifizierten Proteine beteiligt und welche Rückschlüsse können damit auf den Proteinverdau durch das 20S Proteasom geschlossen werden?

Zur Beantwortung der Fragen wurden zunächst die Proteinkonzentrationen in den BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten mittels Proteinbestimmung nach Lowry vergleichend bestimmt und dann die BAL-Proben mittels 1D-Gelelektrophorese auf spezifische Muster und Banden analysiert. Aus einzelnen, für lungengesunde Probanden und *ARDS*-Patienten markanten Proteinbanden wurden Proteine extrahiert und massenspektrometrisch bestimmt. Insulin als Modellprotein und das humane Serum Albumin (HSA) und SP-A, welche mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden und für die eine pathophysiologische Bedeutung für das *ARDS* vermutet wird, wurden anschließend durch das 20S Proteasom verdaut und die entstandenen Verdau-Produkte massenspektrometrisch bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Erklärung über die ethische Konformität der durchgeführten Versuche

Die Entnahme, Einlagerung in eine Biobank und Verwendung von BAL-Proben bei ARDS-Patienten und lungengesunden Probanden sowie die anschließenden Untersuchungen dieser Proben wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen begutachtet und genehmigt. (Voten der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen Nr. 06-3170: *Archivierung von Gewebe und Körperflüssigkeiten in einer Biobank bei Patienten mit Lungenerkrankungen zur Ermittlung möglicher Krankheitsursachen sowie prädiktiver Faktoren hinsichtlich Therapieansprechen und Prognose*; Nr. 01-97-1697: *Proteolyseaktivität und ubiquitilierte Proteine in der Bronchoalveolären Lavage bei ARDS-Patienten als auch lungengesunden Probanden*).

Hierbei wurde die Deklaration von Helsinki in ihrer aktuellen Fassung (10/2013) beachtet.

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischer Qualität (p.a.) verwendet. Destilliertes Wasser (H₂O)-*Aqua dest.*- wurde aus einer Millipore Anlage bezogen (Milli-Q H₂O). Chemikalien der folgenden Firmen wurden verwendet: Biozol (Eching), Enzo Life Science (Lörrach), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

2.3 Bronchoalveoläre Lavage

Die BAL ist ein Verfahren zur Spülung des Alveolarraums im Rahmen einer Bronchoskopie. Im Zuge dieser Untersuchung wurde Sekret aus dem Alveolarraum gewonnen. Im klinischen Alltag dient sie zur Diagnostik und Therapie von Lungenveränderungen und -erkrankungen. Die BAL-Proben wurden im Rahmen von routinemäßigen Untersuchungen zur viralen und bakteriologischen Diagnostik in Lokalanästhesie entnommen. Vier Aliquots warme (37 °C), sterile, isotonische Kochsalzlösung (40 ml) wurden mittels eines Bronchoskops in einen

Segmentbronchus eingebracht und vorsichtig zurückgezogen (72,125,126). Ein Volumen größer 50% wurde zurückgewonnen, gefiltert und zentrifugiert (500 g, 10 min, 5°C). Der Überstand wurde unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen zum einen von lungengesunden Probanden (n= 20), und zum anderen von ARDS-Patienten (n= 36). Alle BAL-Proben stammen aus der Ruhrlandklinik Essen, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen.

2.4 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom wurde uns von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhardt Dahlmann (Institut für Biochemie, Charité Berlin) zur Verfügung gestellt. Das 20S Proteasom wurde aus humanen Erythrozyten gewonnen. Eine Probe wurde aus dem Material von zwei bis drei Probanden gepoolt. Da die einzelnen, gepoolten Chargen aus unterschiedlichen Probanden stammten, unterschieden sich diese hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivitäten. Zur Lagerung bei 4°C wurde das Proteasom in TEAD-Puffer gelöst. Um das 20S Proteasom bei -80°C über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurde 50% Glycerin beigelegt. Um mit Glycerin-freiem Proteasom zu arbeiten, wurden die einzelnen Proteasom-Chargen vor der Verwendung zunächst mittels Dialyse gereinigt. Als Dialysatoren wurden *Slide A-Lyzer Mini Dialysis Units* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) mit einem *Cut Off* von 10 kDa verwendet.

Das 20S Proteasom wurde in dem Dialysator aufgetragen und dieser in einer Styropor-Halterung auf 2000 ml Milli-Q H₂O gelegt, so dass die Unterseite des Dialysators kontinuierlich von Wasser umströmt wurde. Nach 15 min wurde das Milli-Q H₂O gegen frisches ausgetauscht. Nach weiteren 15 min wurde die Dialyse beendet. Das gereinigte 20S Proteasom wurde in einem Reaktionsgefäß bei 4°C gelagert. Aus dem nach der Dialyse gewonnenen Volumen wurde bei bekanntem Anfangsvolumen und bekannter Konzentration des 20S Proteasoms vor Dialyse, die anschließende Konzentration des 20S Proteasom berechnet.

2.5 Fluoreszenz-Enzym-Assay

Mit dem Fluoreszenz-Enzym-Assay wurde die Enzymaktivität der einzelnen katalytischen Zentren im 20S Proteasom quantifiziert. Hierfür wurden dem 20S Proteasom Substrate zur Verfügung gestellt, welche potentielle Schnittstellen für die proteolytischen Einheiten enthalten. Als Substrate wurden Peptide verwendet, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. In dieser Arbeit wurde 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC) verwendet. Da für das Proteasom drei proteolytische Aktivitäten bekannt sind, ergaben sich die folgenden Substrate:

- Suc-LLVY-AMC = 3-Carboxy-Propionyl-LLVY-7-Amino-4-Methylcumarin
→ Zur Untersuchung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität
- BZ-VGR-AMC = Benzoyl-VGR-7-Amino-4-Methylcumarin
→ Zur Untersuchung der Trypsin-ähnlichen Aktivität
- Z-LLE-AMC = 3-Carboxy-Propionyl-LLE-7-Amino-4-Methylcumarin
→ Zur Untersuchung der Caspase-ähnlichen Aktivität

Zunächst wurden Stammlösungen der Substrate in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt:

- Suc-LLVY-AMC: 10 mM
- BZ-VGR-AMC: 4 mM
- Z-LLE-AMC: 4 mM

Vor dem jeweiligen Enzym-Assay wurden die Stammlösungen mit TEAD-Puffer (Tabelle 4) auf die gewünschte Konzentration verdünnt:

- Suc-LLVY-AMC: 200 μ M
- BZ-VGR-AMC: 400 μ M
- Z-LLE-AMC: 400 μ M

Auch das 20S Proteasom wurde in TEAD-Puffer auf die benötigte Konzentration verdünnt ($c=0,05$ g/l). Der Testansatz umfasste 20 μ l 20S Proteasom ($c=0,05$ g/l) und 20 μ l Substrat ($c_{\text{Suc}}=200$ μ M, $c_{\text{Bz}}=400$ μ M, $c_{\text{Z}}=400$ μ M). Es erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch 200 μ l Stopp-Lösung (Tabelle 5) beendet. Als Standard wurde eine AMC-Eichreihe gelöst in DMSO verwendet. Die verwendeten Einzelkomponenten wurden als Blanks mitgemessen.

Tabelle 4: Zusammensetzung des TEAD-Puffers.

	Konzentration	Molare Masse
TRIS-HCl	20 mM	157,6 g/mol
Natrium-EDTA	1 mM	414,2 g/mol
Natriumazid	1 mM	65,0 g/mol

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,2 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 1 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Stopp-Lösung.

	Konzentration	Molare Masse
Natriumchloracetat	100 mM	116,47 g/mol
Natriumacetat	30 mM	82,03 g/mol
Essigsäure	70 mM	60,00 g/mol

Sobald das 20S Proteasom zu der Substratlösung hinzugegeben wurde, konnten die proteolytischen Zentren der β -Untereinheiten das Substrat verdauen, indem hinter dem Peptid, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff verbunden ist, geschnitten wurde. Peptid und Fluoreszenzfarbstoff lagen dann getrennt vor. AMC hat die Eigenschaft, nur im freien Zustand zu fluoreszieren. Das bedeutet, dass keine Fluoreszenz gemessen wurde, solange AMC gebunden an dem Peptid vorlag (Abb. 8).

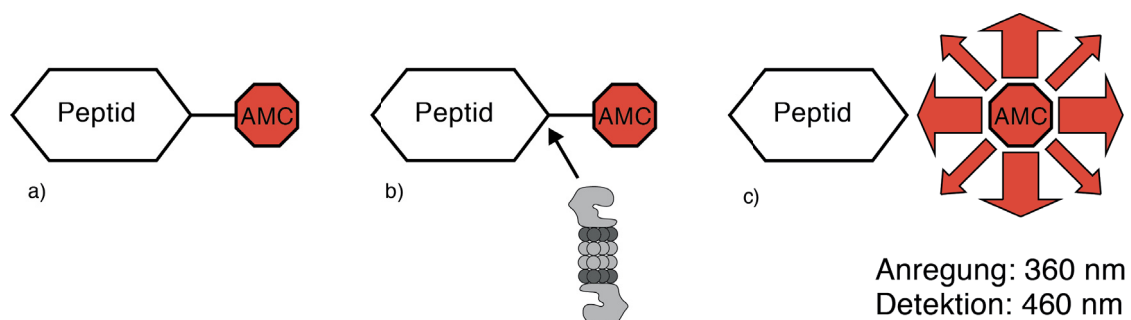


Abb. 8: Prinzip des Fluoreszenz-Assays. a) Das Peptid gekoppelt an den Fluoreszenzstoff 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC) lag als Substrat vor. AMC zeigte, gebunden an dem Peptid, keine Fluoreszenz. b) Zugabe von 20S Proteasom. Durch die proteolytischen Aktivitäten des 20S Proteasoms wurde AMC von dem Peptid getrennt. c) AMC liegt frei vor. In freier Form fluoresziert das AMC. Angeregt wird es mit einer Wellenlänge von 360 nm. Die Emission wird mit 460 nm detektiert.

Die zu messende Fluoreszenz ist ein Maß für das Vorliegen von freiem AMC, welches wiederum proportional zu der Proteolyse durch das 20S Proteasom ist. Somit kann die proteolytische Aktivität quantitativ bestimmt werden.

Zur Messung der Fluoreszenz wurde der Farbstoff zunächst bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt. Die Detektion der Emission fand dann bei 460 nm statt. Die Aufzeichnung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz *Plate Readers* (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Bad Friedrichshall).

2.6 Surfactant-Protein A

Humanes SP-A wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Matthias Amrein (Institut für Zell-Biologie, Anatomie, Physiologie und Labor Medizin, Universität Calgary, Kanada) zur Verfügung gestellt. Dort wurde es aus den BAL-Proben von Patienten mit Alveolar-Proteinose gewonnen. Hierfür wurde die Butanol Extraktion nach Haagsman *et al.* angewendet (127). Um das Protein zu isolieren, wurden mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt. Die Reinheit der Proben wurde mittels Gelelektrophorese und Coomassie Färbung verifiziert. Das in dieser Arbeit verwendete SP-A (3 mg/ml) lag in TRIS-Puffer gelöst vor und wurde bei -80 °C gelagert.

2.7 Lowry-Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentrationen der BAL zu bestimmen, wurde die Methode nach Lowry angewendet (128). Diese quantitative Proteinbestimmung beruht auf den folgenden chemischen Reaktionen:

- Biuretreaktion: Komplexbildung zwischen Kupfer(II)Ionen und Peptidbindungen im alkalischen Milieu
- Reduktion der Kupfer(II)Ionen zu Kupfer(I)Ionen
- Die Kupfer(I)Ionen reduzieren das zugegebene gelbe Folin-Ciocalteu-Phenol Reagenz zu Molybdänblau

Das entstehende Molybdänblau wurde photometrisch bestimmt. In Tabelle 6 sind die Bestandteile des Lowry-Reagenz aufgelistet.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Lowry-Reagenz.

Reagenz A		Reagenz B		Reagenz C	
Na ₂ CO ₃	10 g	KNa-Tartrat	2 g	CuSO ₄	1 g
0,1 M NaOH	500 ml	<i>Aqua dest.</i>	100 ml	<i>Aqua dest.</i>	100 ml

Zur Herstellung des Lowry-Reagenz wurden 20 ml des Reagenz A und jeweils 200 µl der Reagenzien B und C benötigt.

Mit dem Verfahren nach Lowry können Proteinkonzentrationen nur in klaren Lösungen korrekt bestimmt werden. Da die BAL-Proben als Zellsuspension eine Trübung aufwiesen, wurden alle Proben zunächst zentrifugiert. Hierfür wurden die Proben der ARDS-Patienten für 25 min bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Die Überstände wurden direkt für die Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Die Zellpellets wurden je nach Probe mittels Milli-Q H₂O, Triton X 100 1% und Ultraschallbad in Lösung gebracht, bevor sie für den Lowry-Test zur Verfügung standen. Die BAL der lungengesunden Probanden wurden ebenfalls in Überstände und Zellpellets getrennt. Diese wurden bei 1500 g für 40 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen. Die Zellpellets wurden in Milli-Q H₂O in Lösung gebracht. Zellpellets und Überstände wurden daraufhin getrennt voneinander untersucht. Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurden Überstände und Zellpellets der BAL 1:100 verdünnt (5 µl Probe + 495 µl Milli-Q H₂O). Je 100 µl der verdünnten Probe wurden mit 500 µl Lowry-Reagenz versetzt. Die Inkubation erfolgte 10 min bei Raumtemperatur (RT). Es folgte die Zugabe von 50 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (Fluka, Buchs, Schweiz), welches zuvor 1:1 mit Milli-Q H₂O verdünnt wurde. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde die Extinktion bei 740 nm photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mit Hilfe einer Eichreihe von bovinem Serumalbumin (BSA, 0-200 µg/ml) errechnet. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.8 1D-Gelelektrophorese

Mit der eindimensionalen Gelelektrophorese (1D-GE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Auf diese Weise kann die Proteinzusammensetzung der BAL dargestellt werden. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels *SDS-PAGE* (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Zur Herstellung der Gele (Tabelle 7) und für die Durchführung wurden die folgenden Chemikalien benötigt:

0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8

- 15,8 g TRIS-HCl auf 200 ml Milli-Q H₂O auffüllen, pH 6,8

1,5 M TRIS-Base, pH 8,8

- 54,51 g TRIS-Base auf 300 ml Milli-Q H₂O auffüllen, pH 8,8

10% SDS

- 5 g SDS auf 50 ml Milli-Q H₂O auffüllen

10% APS

- 1 g APS auf 10 ml Milli-Q H₂O auffüllen

Lade-Puffer

- 1 ml 0,5M TRIS-HCl, pH 6,8
- 2 ml Glycerol
- 1 g SDS
- 30 mg Bromphenolblau
- 7 ml Milli-Q H₂O

Elektrophorese-Puffer (10-fach)

- 30 g TRIS-Base
- 144 g Glycin
- 10 g SDS
- *ad* 1 l Milli-Q H₂O

Coomassie Färbelösung

- 100 g Aluminiumsulfat-18-Hydrat
- 240 ml Ethanol (80%)
- 47 ml ortho-Phosphorsäure (85%)
- 0,4 g Coomassie-Brilliant-Blue-G250
- *ad* 2 l Milli-Q H₂O

Coomassie Entfärbelösung

- 240 ml Ethanol (80%)
- 47 ml ortho-Phosphorsäure (85%)
- *ad* 2 l Milli-Q H₂O

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

Sammelgel (2 Gele)		Trenngel 11% (2 Gele)	
PAA 30%	2,55 ml	PAA 30%	7,26 ml
Milli-Q H ₂ O	8,25 ml	Milli-Q H ₂ O	7,54 ml
0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	3,75 ml	1,5 M TRIS Base, pH 8,8	5 ml
SDS 10%	150 µl	SDS 10%	200 µl
Temed	30 µl	Temed	20 µl
APS 10%	150 µl	APS 10%	100 µl

Das anionische *SDS* überdeckt die Ladungen der Proteine so effektiv, dass die Wandergeschwindigkeit der Proteine allein vom Molekulargewicht (MW) abhängt. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller gelangen sie durch das Polymergitter. Die Proben wurden mit Lade-Puffer (1:5) verdünnt und erhitzt (95 °C), um die Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Disulfidbrücken wurden mittels β -Mercaptoethanol aufgespalten. Mittels Hamilton-Spritze wurden die Proben aufgetragen, die Gelkammern mit Elektrophorese-Puffer gefüllt und eine Spannung angelegt. Zur Abschätzung des MW der Proteine wurde ein Marker aufgetragen (*Precision Plus Protein Standards*, Bio-Rad). Mit einer modifizierten Coomassie Färbung nach Kang *et al.* wurden Proteinbanden sichtbar gemacht (129). Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei ca. 10 ng Protein. Vor der Färbung wurden die Gele dreimal 5 min mit Milli-Q H₂O gewaschen, da überschüssiges *SDS* die Bindung des Coomassie Farbstoffs verhinderte. Über Nacht wurden die Gele mit der Färbelösung behandelt. Nach der Inkubation wurden die Gele erneut mit Milli-Q H₂O gewaschen und anschließend entfärbt. Zur Auswertung und Dokumentation wurden sie mit Hilfe der MagicScan Software (Umax, Version 4.4) gescannt.

2.9 Tryptischer In-Gel-Verdau

Um Proteine mittels Massenspektrometrie sequenzieren zu können, mussten diese zuvor enzymatisch in Peptide gespalten werden. Hierzu wurde Trypsin verwendet, welches spezifisch C-terminal hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet. Für den tryptischen *In-Gel*-Verdau wurden folgende Chemikalien benötigt:

Coomassie Entfärbelösung

- 40% Ethanol (96%)
- 10% Eisessig

Waschlösung 1

- 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
- 50% Acetonitril

Waschlösung 2

- 100% Acetonitril

Trypsin-Lösung (c=0,1 µg/µl)

- 20 µg Trypsin
- 200 µl Trypsinpuffer

Trypsinpuffer

- 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Elutionspuffer

- 50% Acetonitril
- 5% Ameisensäure
- 45% Milli-Q H₂O

Das 1D-Gel wurde auf einen mit Ethanol gereinigten Leuchttisch platziert und die zu bestimmende Proteinbande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Bande wurde in kleine Gelstücke (ca. 1 mm³) geschnitten und in ein Protein *LoBind* Reaktionsgefäß überführt. Die folgenden Waschschrte fanden bei RT auf einem Schüttler statt. Zunächst wurde die unspezifische Coomassie Färbung mit Hilfe einer Entfärbelösung herausgewaschen. Nach jedem der folgenden Waschschrte wurde die Lösung mit Hilfe einer *GELoader*-Pipettenspitze abgenommen und in einem separaten *LoBind* Reaktionsgefäß gesammelt. Der erste Waschschrte mit Waschlösung 1 wurde 10 min durchgeführt. Es folgten drei Waschschrte mit Waschlösung 1 á 30 min und ein Waschschrte mit Waschlösung 2 á 30 min. Anschließend wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Für den tryptischen Verdau wurde Trypsin in Ammonium-hydrogencarbonat-Puffer gelöst und auf Eis gelagert, um den Eigenverdau von Trypsin zu minimieren. Die Trypsinlösung wurde auf die

getrockneten Gelstücke gegeben, so dass diese vollständig bedeckt waren und aufquellen konnten. Nach 30 min wurde das überschüssige Trypsin abgenommen und ausreichend Trypsinpuffer auf die Gelstücke pipettiert, damit diese bei der Inkubation nicht trocken fielen. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt. Im Anschluss wurde das Eluat, welches ab diesem Zeitpunkt Peptide enthält, in einem neuen *LoBind* Reaktionsgefäß gesammelt. Doppeltes Volumen Milli-Q H₂O im Vergleich zum Trypsinpuffer wurde auf die Gelstücke gegeben, dann wurden diese für 5 min geschüttelt und für 5 min in ein Ultraschallbad gegeben. Der Überstand wurde abgenommen und als Eluat gesammelt. Anschließend wurde die Probe dreimal für 30 min mit Elutionspuffer und einmal für 30 min mit 100% Acetonitril (ACN) inkubiert, der Überstand erneut aufgefangen und zum Ende das gesamte Eluat in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die abgetragene Lösung aus den Waschschritten, der sogenannte *Wash*, die Gelstücke und das gewonnene Eluat wurden bei -20 °C gelagert. Für die massenspektrometrische Analyse stand das getrocknete Eluat zur Verfügung.

2.10 Massenspektrometrie

2.10.1 Technische Grundlagen

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein analytisches Verfahren zur Bestimmung der molekularen Masse von Ionen im Hochvakuum. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich auch Proteine identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Massenspektren der entstandenen Peptide des tryptischen Proteinverdaus analysiert.

Ein Massenspektrometer ist in drei Einheiten gegliedert:

- **Ionenquelle** → Ionenerzeugung
- **Analysator** → Ionentrennung
- **Detektor** → Ionennachweis

Für jede dieser Einheiten stehen verschiedene Gerätetypen zur Verfügung, die untereinander kombiniert werden können. In dieser Arbeit wurden die massenspektrometrischen Analysen mit einem Elektrospray-Ionisation-Quadrupol-Quadrupol-*Time of Flight* (ESI-Qq-TOF, QSTAR XL, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

2.10.1.1 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist ein Ionisierungsprozess, bei dem die Analytlösung in einem elektrischen Feld versprüht und in die Gasphase überführt wird. Die Methode wurde von J. B. Fenn *et al.* und M. Dole *et al.* etabliert (130). Im Jahr 2002 wurde Fenn hierfür mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes wird die Lösung in kleinste Tröpfchen versprüht (Abb. 9). Die dafür benötigte Hochspannung liegt zwischen einer leitfähigen Glaskapillare und der Interface-Platte, welche die Schnittstelle zum Analysator bildet. Zunächst wird der Analyt in Ameisensäure, welche die Protonierung des Analyten erleichtert und Methanol, welches die Sprayeigenschaft verbessert, aufgenommen. Dabei bildet sich an der Spitze der Glaskapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, hier Kationen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines sogenannten Taylor-Konus als feines Spray austreten. Da das Lösungsmittel an der Tröpfchenoberfläche stetig verdampft, nimmt die Ladungsdichte zu. Schließlich zerfallen die Tröpfchen spontan (= Coulomb-Explosionen). Die entstehenden gasförmigen Ionen treten in das Hochvakuum ein, welches hinter der Interface-Platte besteht. Senkrecht zum Eintritt in das Hochvakuum strömt Stickstoff als sogenanntes *Curtain-Gas*. Der Stickstoff erleichtert die Desolvatisierung, indem der Analyt mit den Stickstoffmolekülen kollidiert. Die ESI ist eine sogenannte weiche Ionisierungsmethode, da während des Prozesses den Molekülen thermische Energie entzogen wird (= endergonischer Prozess) und kaum Fragment-Ionen entstehen.

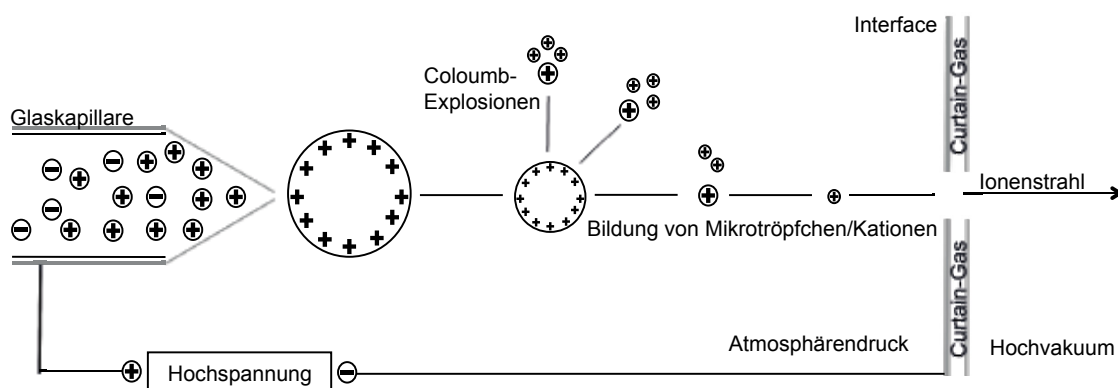


Abb. 9: Prinzip der Elektrospray-Ionisation (ESI). Der Analyt befindet sich in einer metallbedampften, leitfähigen Glaskapillare und wird durch anliegenden Gasdruck in das elektrische Feld versprüht. Zwischen Glaskapillare und *Interface*-Platte liegt eine Hochspannung an. Die positiv geladenen Tröpfchen verlieren stetig an Oberfläche, da das Lösungsmittel im elektrischen Feld kontinuierlich verdampft. Somit nimmt das Verhältnis zwischen Oberflächenladung und Oberfläche zu, bis die Tröpfchen spontan zerfallen, da die Ladungen sich gegenseitig abstoßen (Coulomb-Explosionen). Die entstehenden Ionen treten durch einen Stickstoffstrom (*Curtain-Gas*) in das Hochvakuum ein.

2.10.1.2 Quadrupol

Ein Quadrupol-Analysator (Q) trennt die Ionen, indem er als Massenfiter arbeitet. Das bedeutet, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) den Detektor erreichen. Ein Quadrupol ist aufgebaut aus vier parallelen, stabförmigen Metallelektroden, zwischen denen eine definierte Gleich- und Wechselspannung angelegt wird. Durch das Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung zueinander wird die Flugbahn der im ESI erzeugten Ionen je nach ihrem m/z -Verhältnis beeinflusst (Abb. 10).

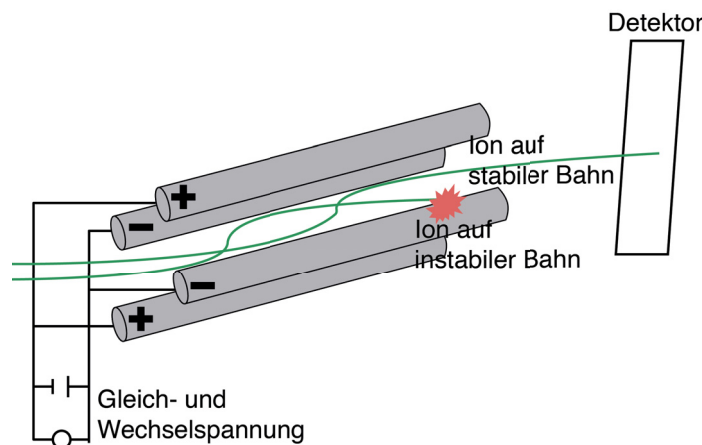


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Quadrupols. An vier parallel zueinander ausgerichteten stabförmigen Metallelektroden liegt eine Gleich- und Wechselspannung an. Je nach Einstellung der Spannung fliegen Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) auf einer stabilen Bahn und erreichen den Detektor. Ionen mit einem anderen m/z -Verhältnis kollidieren hingegen mit den Metallstäben.

Während die einen Ionen bei einer bestimmten Spannung auf einer stabilen oszillierenden Bahn fliegen, fliegen andere auf instabilen Bahnen und kollidieren mit den Metallstäben. Durch Variation der Spannung und der Frequenz können Ionen anhand ihres m/z -Verhältnis selektiert werden.

2.10.1.3 Time of Flight

Im Flugzeit-Massenspektrometer, *Time of Flight* (TOF), findet die Analyse der Masse über die Messung der Flugzeit statt. Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis haben nach gleicher Beschleunigung in der Ionenquelle die gleiche kinetische Energie, aber aufgrund ihrer Masse eine unterschiedliche Geschwindigkeit ($E = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$). Je nach ihrer Größe brauchen die Ionen unterschiedlich lange, um das Flugrohr zu passieren. Große Ionen erreichen den Detektor später als kleine Ionen. Aus der gemessenen Flugzeit lässt sich bei bekanntem Kalibrant die Masse ermitteln.

2.10.1.4 Tandem Hybrid Massenspektrometer

Das in dieser Arbeit verwendete Tandem Hybrid Massenspektrometer (QSTAR XL, Applied Biosystems, Darmstadt) besteht aus drei Quadrupolen (Q0, Q1, Q2) und einem TOF-Analysator. Q0 stabilisiert den in der Ionenquelle erzeugten Ionenstrom. Q1 selektiert das zu untersuchende Ion, indem die Spannung auf das gewünschte m/z -Verhältnis angepasst wird. Q2 wirkt als Kollisionszelle, indem es zum kollisionsinduzierten Zerfall anregt. Die entstehenden Fragment-Ionen werden dann mittels TOF analysiert. Im TOF kann nur ein gepulster Ionenstrom bestimmt werden. Daher werden die in der ESI entstehenden Ionen diskontinuierlich erzeugt. Dies wird erreicht, indem die ESI-Quelle orthogonal zum TOF geleitet und die Beschleunigungsspannung gepulst wird. Die Bedienung des QSTAR XL erfolgte über das Programm Analyst (Version 1.5, Applied Biosystems, Darmstadt).

2.10.2 Probenvorbereitung

Bevor die Proben aus dem tryptischen Verdau massenspektrometrisch untersucht wurden, mussten diese entsalzt werden, da Salze die Messung negativ beeinflussen. Zunächst wurden die getrockneten Peptide in Waschlösung (4 % Methanol, 5 % Ameisensäure) resuspendiert. Ein C-18 *Stage-Tip* (20 μ l Tip mit Säule von Proxeon, Odense, Dänemark), wirkte als Mikrochromatograph und wurde vorbereitet. Hierfür wurden hintereinander zweimal 20 μ l ACN und zweimal 20 μ l Waschlösung aufgetragen und durch die Säule gedrückt. Daraufhin wurde die Probe aufgetragen, durchgedrückt und aufgefangen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Säule dreimal mit je 7 μ l Waschlösung gewaschen. Die Waschlösung wurde ebenfalls in einem separaten *LoBind* Reaktionsgefäß (= *Wash*) aufgefangen. Mit der Elutionslösung wurden die Peptide aus der Säule gespült. 7 μ l Elutionslösung (60 % Methanol, 5 % Ameisensäure) wurden aufgetragen, durchgedrückt und in einem neuen *LoBind* Eppendorf-Gefäß (= *Eluat*) aufgefangen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal auf diese Weise wiederholt. Das Eluat stand für die Massenspektrometrie zur Verfügung.

2.10.3 Proteinidentifizierung

Wenn Proteine mit den oben beschriebenen Geräten analysiert werden, spiegelt das Massenspektrum die Häufigkeitsverteilung der vorhandenen Ionen für das jeweilige m/z -Verhältnis wieder.

Durch die Elektrospray Ionisation treten oftmals auch Ionen auf, die mehrfach geladen sind. Das bedeutet, dass ein Protein mehrere Signale in dem Massenspektrum erzeugen kann, wenn es in unterschiedlichen Ladungszuständen vorliegt. Dabei lässt sich der Ladungszustand aus dem Isotopenmuster des jeweiligen Signals bestimmen. Hierbei gibt die monoisotopische Masse eines Elements die Masse des leichtesten Isotops wieder. Aus der Massendifferenz der Signale von einem Isotop kann die Ladung berechnet werden:

- Massendifferenz bei **einfach** geladenen Ionen $[M+H]^{1+}=1 \text{ Da}$
- Massendifferenz bei **zweifach** geladenen Ionen $[M+H]^{2+}=1/2 \text{ Da}=0,5 \text{ Da}$
- Massendifferenz bei **dreifach** geladenen Ionen $[M+H]^{3+}=1/3 \text{ Da}=0,33 \text{ Da}$

Proteine können nicht allein über das m/z-Verhältnis identifiziert werden. Proteine können trotz gleichem Molekulargewicht eine unterschiedliche Aminosäuresequenz haben und somit auch andere Eigenschaften und Funktionen besitzen.

2.10.3.1 *Peptide mass fingerprint*

Der sogenannte *peptide mass fingerprint* (PMF) ermöglicht die Proteinidentifizierung. Hierbei wird ein Protein in Peptide zerlegt, welche massenspektrometrisch analysiert werden. Ein Übersichtsspektrum bildet alle in der Probe vorhandenen Peptide ab. Über das Isotopenmuster werden die jeweiligen Massen bestimmt. In Datenbanken, welche Massenlisten für Proteine enthalten, können die Massen abgeglichen werden. Bei einer signifikanten Übereinstimmung gilt das Protein als identifiziert. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist, dass die Proteine nur an bestimmten Stellen geschnitten werden. Im Rahmen des tryptischen Verdaus, der in dieser Arbeit angewendet wurde, werden die Proteine hinter Arginin und Lysin geschnitten. Die Nachteile dieser Methode der Proteinidentifizierung bestehen zum einen darin, dass nur in Datenbanken registrierte Proteine bestimmt werden können. Ob Informationen zu einem Protein vorliegen, hängt vor allem davon ab, wie gut das Proteom der zu untersuchenden Spezies identifiziert ist.

2.10.3.2 *Product Ion Scan*

Möchte man neben der Masse auch die Aminosäuresequenz der einzelnen Peptide bestimmen, kann ein Protein noch spezifischer identifiziert werden. Das ermöglicht die Tandem-MS-Analyse (MS/MS) (Abb. 11).

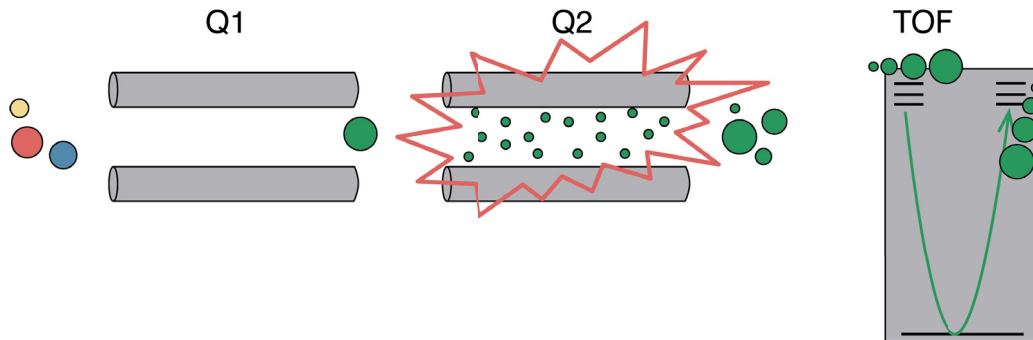


Abb. 11: Erzeugung von Fragment-Ionen im Massenspektrometer. Q1 (Quadrupol) selektiert das Ion heraus, welches in Q2, der Kollisionszelle fragmentiert wird. Im TOF (*Time of flight*) werden die aufgetretenen Fragment-Ionen schließlich an Hand ihrer Massen analysiert.

Während beim Übersichtsspektrum alle Peptide den Detektor erreichen, wird bei diesem Verfahren der Q1 so eingestellt, dass nur Ionen einer bestimmten Masse selektiert werden. Diese werden dann in der Kollisionszelle Q2 fragmentiert. In diesem Fall wurde Stickstoff für die Erzeugung der Fragment-Ionen genutzt. Die entstehenden Fragment-Ionen gelangen in das TOF und werden dort anhand des m/z -Verhältnisses getrennt. Analysiert man die Massen der Fragment-Ionen, welche die Massen einzelner Aminosäuren wiedergeben, kann auf die Aminosäuresequenz des selektierten Peptids rückgeschlossen werden (= Produkt-Ionen-Analyse). Diese Auswertung wurde entweder mit Hilfe einer Datenbankrecherche (Mascot database, Matrix Science Ltd., London, UK) oder per Hand (*De novo*-Sequenzierung) durchgeführt.

2.11 *In-vitro*-Verdau Versuche

Um zu untersuchen, welche Proteine potentielle Substrate für das 20S Proteasom darstellen und unter welchen Bedingungen diese von dem 20S Proteasom proteolytisch abgebaut werden, wurden *in-vitro*-Verdau Versuche mit unterschiedlichen Proteinen durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proteine nach entsprechender Vorbereitung in geeigneten Puffern dem 20S Proteasom zum Verdau angeboten. Als Modellprotein wurde zunächst Insulin proteolytisch verdaut.

2.11.1 *In-vitro*-Verdau von Insulin

Für den *in-vitro*-Verdau wurde rekombinantes Humaninsulin verwendet. 2,9 mg Insulin wurden in 100 μ l Milli-Q H_2O gelöst, um eine 5 mM Insulinlösung herzustellen.

Als Verdauopuffer wurde 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure HEPES-Puffer (Tabelle 8) verwendet. Zusammengefasst wurden folgende Chemikalien benötigt:

- 20S Proteasom, Charge 2 C=0,625 µg/µl
- Humanes Insulin C=5 mM
- Dithiothreitol (DTT) C=0,1 M

Tabelle 8: Zusammensetzung des HEPES-Puffers.

	Konzentration	Molare Masse
HEPES-Puffer	20 mM	238,3 g/mol
Magnesiumacetat	2 mM	214,4 g/mol

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,8 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben.

Um den Einfluss von DTT auf den Verdau von Insulin zu untersuchen, wurden sowohl Versuchsansätze mit als auch ohne DTT hergestellt. Zudem wurden Kontrollexperimente ohne 20 Proteasom angefertigt, um auszuschließen, dass das Insulin aufgrund anderer Effekte degradiert wird. Daraus ergibt sich das folgende Pipettierschema (Tabelle 9).

Tabelle 9: Pipettierschema zum *in-vitro*-Verdau Versuch von humanem Insulin.

	Verdau a1	Verdau a2	Verdau b1	Verdau b2
Insulin [5 mM]	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
HEPES-Puffer	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
20S Proteasom [Charge 2]	1,6 µl	-	1,6 µl	-
DTT [0,1 M]	4 µl	4 µl	-	-

Die Proben wurden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Für die Massenspektrometrie wurden nach 0, 7, 20 und 70 Stunden jeweils 10 µl einer Probe entnommen, mittels *Stage-Tip* entsalzt und analysiert.

2.11.2 *In-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin

Für den *in-vitro*-Verdau Versuch von HSA wurden die folgenden Chemikalien benötigt, welche in einem TRIS-HCl Puffer (Tabelle 10) gelöst wurden:

- 20S Proteasom, Charge 3; 4 C=0,6 µg/µl; C=1,0 µg/µl
- Humanes Serum Albumin (HSA) C=0,05 mM
- Dithiothreitol (DTT) C=2 mM

Tabelle 10: Zusammensetzung des TRIS-HCl-Puffers.

	Konzentration	Molare Masse
TRIS-HCl-Puffer	50 mM	157,6 g/mol
Magnesiumchlorid	10 mM	201,3 g/mol

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,8 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 1 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben.

2.11.2.1 Grundaufbau des *in-vitro*-Verdaus von humanem Serum Albumin

Es wurde eine 0,05 mM HSA-Lösung hergestellt. Zur vollständigen Lösung des Proteins wurde die Probe für 5 min bei RT auf einen Schüttler gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 mM DTT. Nach 30-minütiger Inkubation bei 56°C wurde die Probe direkt auf Eis gestellt. Dann wurde das entfaltetete HSA oxidiert. Der Versuchsansatz wurde so durchgeführt, dass parallel die Auswirkung unterschiedlicher *Cut Offs* als auch die zugegebene H₂O₂ Konzentration getestet wurden. Der Oxidierungsgrad wurde variiert, indem unterschiedliche Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (0 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM) zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Das sich absetzende Sediment, welches sich während der Oxidation bildete, wurde von dem Überstand mittels Zentrifugation getrennt (2000 g, 2 min, RT). Im Anschluss wurde das überschüssige H₂O₂ mittels Dialyse entfernt. Für die Dialyse wurden *Centrifugal Filter Units* von Amicon benutzt. Versuche mit unterschiedlichen *Cut Offs* der Filtereinheit wurden durchgeführt (30 kDa und 50 kDa). Zum Vergleich diente eine Probe, die nicht dialysiert wurde. Die Dialyse zur Entfernung von H₂O₂ wurde in drei Schritten durchgeführt:

1. Reinigung der *Centrifugal Filter Unit* und Entfernung des Glycerins (2 x 500 µl Milli-Q H₂O, 14.000 g–20 min–4 °C).

2. Reinigung der Probe und Entfernung des H_2O_2 (250 μl Probe + 250 μl Milli-Q H_2O , 14.000 g–20 min–4 °C und 2 x 500 μl Milli-Q H_2O , 14.000 g–20 min–4 °C).

3. *Respin* der Probe, d.h. Zurückgewinnen des oxidierten HSA (Filter umdrehen, 1.000 g–4 min–4 °C).

Nach Reduktion mittels DTT, Oxidation mittels H_2O_2 , Zentrifugation und Dialyse des überschüssigen H_2O_2 folgte der *in-vitro*-Verdau des HSA. Hierfür wurden das vorbereitete HSA (20 μl) und 20S Proteasom (50 μl) zu einem TRIS-HCl-Puffer (15 μl) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 und 18 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden jeweils 10 μl einer Probe entnommen, mittels *Stage-Tip* entsalzt und massenspektrometrisch Übersichtsspektren aufgezeichnet. Abb. 12 zeigt den Versuchsaufbau des *in-vitro*-Verdaus von HSA.

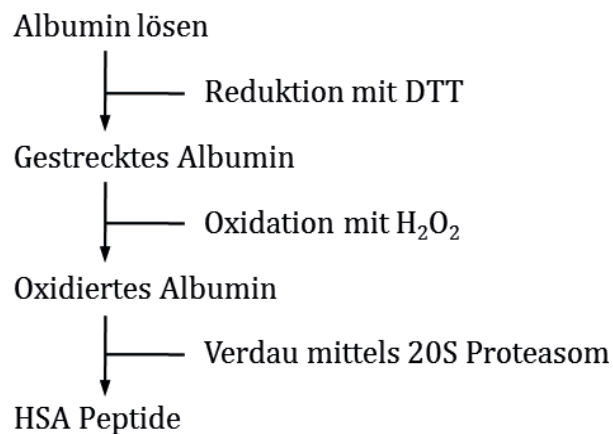


Abb. 12: Schematische Darstellung des Ablaufs des *in-vitro*-Verdau Versuch von humanem Serum Albumin (HSA). Das HSA wird zunächst in Lösung gebracht. Es folgt eine Oxidation mittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das oxidierte Albumin wird dem 20S Proteasom zum Verdau angeboten.

2.11.2.2 Auswirkungen der Variation des Verdaupuffers auf den *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin

Um zu untersuchen, ob unter Verwendung eines anderen Puffersystems (TEAD-Puffer) der *in-vitro*-Verdau optimiert werden kann, wurden zwei Versuchsansätze parallel pipettiert. Zum einen wurde der Versuch wie oben beschrieben in TRIS-HCl-Puffer und zum anderen in TEAD-Puffer durchgeführt. In beiden Ansätzen wurde die gleiche Proteasom-Charge verwendet. Die Inkubation wurde bei 37°C durchgeführt. Nach 1- und 18-stündiger Inkubation wurden die Proben mittels MS analysiert.

2.11.3 *In-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A

Für den *in-vitro*-Verdau Versuch von SP-A wurden die folgenden Chemikalien eingesetzt:

- 20S Proteasom, Charge 5; 6; 7 C = 1,0 µg/µl
- Surfactant-Protein A (SP-A) in unterschiedlichen Konzentrationen
- Dithiothreitol (DTT)

Für die Oxidation des SP-A und den anschließenden *in-vitro*-Verdau wurden unterschiedliche Puffer verwendet (Tabellen 11 und 12). Die Versuchsbedingungen orientierten sich an den von Whittier *et al.* beschriebenen Calmodulin-Versuchen (86).

Tabelle 11: Zusammensetzung des Oxidations-Puffers nach Whittier (86).

	Konzentration	Molare Masse
Homo-PIPES	100 mM	316,4 g/mol
Kaliumchlorid	0,2 M	74,5 g/mol
Magnesiumchlorid	2 mM	203,3 g/mol
Calciumchlorid	0,2 mM	110,9 g/mol

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 5,0 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Verdau-Puffers nach Whittier (86).

	Konzentration	Molare Masse
TRIS-HCl	200 mM	157,6 g/mol
Kaliumchlorid	0,4 M	74,5 g/mol
Magnesiumchlorid	40 mM	203,3 g/mol
EDTA	0,4 mM	380,3 g/mol

Der pH-Wert des Puffers wurde auf 7,5 eingestellt.

2.11.3.1 Grundaufbau des *in-vitro*-Verdaus von Surfactant-Protein A

Für den *in-vitro*-Verdau wurden zunächst 100 µM SP-A mit 0,1 M DTT reduziert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 56°C. Anschließend wurden 20 µl des reduzierten SP-A mit 20 µl 2-fach angesetztem, mit H₂O₂ versetztem Puffer für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde dann von überschüssigem H₂O₂ gereinigt. Hierfür

wurden *Centrifugal Filter Units* von Amicon mit einem *Cut Off* von 10 kDa benutzt. Es wurde nach dem gleichen Protokoll gearbeitet wie für den HSA-Verdau Versuch beschrieben. Der Oxidationsstatus des SP-A wurde mittels MS (1 µl Probe + 1 µl 60% MeOH) bestimmt, indem die SP-A Massen vor und nach Oxidation verglichen wurden. Der anschließende *in-vitro*-Verdau von SP-A (12 µl) mit 20S Proteasom (18 µl) fand im TRIS-HCl-Puffer (10 µl) statt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Die Analysen der Proben erfolgten zunächst nach 18 Stunden. Hierfür wurden je 7 µl Probe entnommen und mittels *Stage-Tip* entsalzt. Abb. 13 zeigt den Versuchsaufbau des *in-vitro*-Verdaus von SP-A.

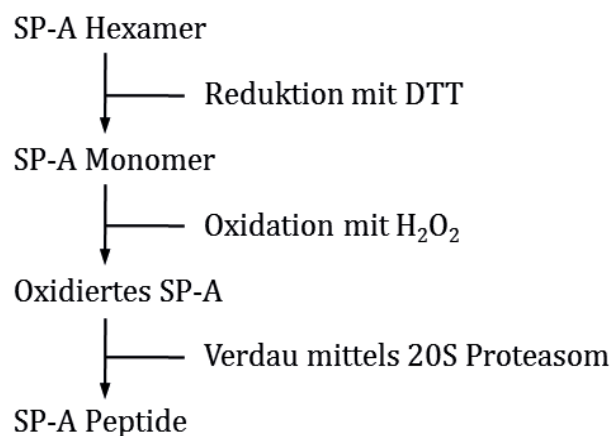


Abb. 13: Schematische Darstellung des Ablaufs des *in-vitro*-Verdau Versuch von Surfactant-Protein A (SP-A). Das SP-A wurde zunächst mit Hilfe von Dithiothreitol (DTT) reduziert. Es folgte eine Oxidation des entstandenen SP-A Monomers mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Das oxidierte SP-A wurde im Folgenden dem 20S Proteasom zum Verdau angeboten.

2.11.3.2 Auswirkungen verschiedener 20S Proteasom Chargen auf den *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A

Das humane 20S Proteasom erhielten wir von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhardt Dahlmann (Institut für Biochemie, Charité Berlin). Man muss davon ausgehen, dass die einzelnen Proteasom-Chargen unterschiedliche proteolytische Aktivitäten aufweisen, da das 20S Proteasom aus verschiedenen Probanden stammt. Daher wurde der Grundversuch wie oben beschrieben, nicht nur mit der Proteasom Charge fünf, sondern auch mit den Proteasom Chargen sechs und sieben (beide aus demselben *Pool* stammend) durchgeführt. Die jeweiligen Peptide und Schnittstellen wurden miteinander abgeglichen, um nachzuweisen, dass sich die proteolytische Aktivität zwischen den Proteasomen unterschiedlicher Probanden unterscheidet.

2.11.3.3 *Auswirkungen der Variation des Oxidationspuffers auf den in-vitro-Verdau von Surfactant-Protein A*

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Puffer auf die Oxidation und den Verdau zu untersuchen, wurde SP-A parallel zum einen im Homo-PIPES-Puffer (pH 5,0) und zum anderen im TRIS-HCl-Puffer (pH 7,5) oxidiert. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Bei der Beurteilung im Massenspektrometer wurden die Intensitäten der aufgetretenen Verdausignale miteinander verglichen und rückgeschlossen, welcher Puffer sich für den *in-vitro*-Verdau von SP-A besser eignet.

2.11.3.4 *Kinetik des in-vitro-Verdau von Surfactant-Protein A*

Um die Kinetik des oben beschriebenen Verdaus von SP-A beschreiben zu können, wurde eine Versuchsreihe angefertigt, in der die Probe nach 10-, 30-, 60-, und 120-minütiger Inkubation untersucht wurden. Ziel war es, zu beschreiben, welche Peptide zu welchem Zeitpunkt auftreten und zu untersuchen, ob kleinere Peptide aus bereits anderen, früher auftretenden Peptiden entstehen. Parallel wurde untersucht, ob die Gesamtmenge an vorliegendem uverdauten SP-A abnimmt.

2.11.3.5 *Hemmung des in-vitro-Verdaus von Surfactant-Protein A durch Epoxomicin*

In diesem Versuch wurde der Effekt der Inhibierung des Proteasoms durch Epoxomicin untersucht. Es wurden die Auswirkungen von unterschiedlichen Konzentrationen an Epoxomicin untersucht (Tabelle 13). Puffer, 20S Proteasom und Epoxomicin wurden zunächst für 60 min bei RT inkubiert, bevor das oxidierte SP-A hinzugegeben wurde. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die Proben mittels *Stage-Tip* entsalzt und massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 13: Aufbau des Versuches zur Untersuchung der Auswirkung von unterschiedlichen Epoxomicin Konzentrationen auf den *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A (SP-A).

	Ohne Epoxomicin	Mit Epoxomicin [1 mM]	Mit Epoxomicin [0,01 mM]
SP-A [40 µM]	9 µl	9 µl	9 µl
TRIS-HCl-Puffer	7,5 µl	4,5 µl	4,5 µl
20S Proteasom [Charge 7]	13,5 µl	13,5 µl	13,5 µl
Epoxomicin	-	3 µl	3 µl

2.11.3.6 Auswirkungen von Hitzeschokproteinen auf den *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A

In dieser Versuchsserie wurde der Einfluss von Hsp 90 untersucht, indem zwei unterschiedliche Ansätze mit Hsp 90 angelegt. Zum einen wurde das oxidierte SP-A mit Hsp 90 vorinkubiert, bevor 20S Proteasom hinzugegeben wurde. Zum anderen wurde das 20S Proteasom mit Hsp 90 für eine Stunde vorinkubiert und erst danach das oxidierte SP-A hinzu pipettiert. Als Kontrolle wurde ein Versuchsansatz ohne Hsp 90 durchgeführt (Tabelle 14). Die Inkubation erfolgte während des gesamten Versuches bei 37 °C. Nach 30 min, 1, 2 und 18 Stunden wurden die Verdauprodukte in den einzelnen Proben massenspektrometrisch analysiert und verglichen.

Tabelle 14: Aufbau des Versuches zur Untersuchung der Auswirkung von Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90) auf den *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A (SP-A).

	Ohne Hsp 90	mit Hsp 90 SP-A Vorinkubation	mit Hsp 90 20S Vorinkubation
SP-A [40 µM]	--	9 µl	--
Puffer	7,5 µl	3,5 µl	3,5 µl
20S Proteasom [Charge 7]	13,5 µl	--	13,5 µl
Hsp 90 [1,5µM]	--	4 µl	4 µl
1 h Vorinkubation bei 37 °C			
SP-A [40 µM]	9 µl	--	9 µl
20S Proteasom [Charge 7]	--	13,5 µl	--

2.12 Statistische Auswertungen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden mittels GraphPad Prism5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ausgewertet. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen der BAL-Proben wurde der Median, die 25. und 75. Perzentile sowie der *range*/Bereich mit Angabe des Minimum und Maximum angegeben. Bei den Fluoreszenzbestimmungen wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Signifikanzen wurden anhand des *student-t-test* ermittelt. Hierbei wurden p-Werte < 0,05 als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Bronchoalveolären Lavage

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich die Proteinkonzentrationen und –zusammensetzungen von BAL-Proben bei ARDS-Patienten und lungengesunden Probanden unterscheiden. Insgesamt wurden 20 BAL lungengesunder Probanden und 36 BAL-Proben von ARDS-Patienten vergleichend analysiert.

3.1.1 Proteinkonzentrationen in Bronchiallavagen

Um die Proteinkonzentrationen in BAL von lungengesunden Probanden mit denjenigen von ARDS-Patienten zu vergleichen, wurden von den vorliegenden Proben Proteinbestimmungen mittels Lowry-Test durchgeführt. Es wurde für jede Probe sowohl die Proteinkonzentration im Zellpellet als auch die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (Abb. 14).

Bei lungengesunden Probanden betrug die mediane Proteinkonzentration im Zellpellet 249,8 µg/ml (*range*: 5,2 – 1437,0 µg/ml) und 142,65 µg/ml im Überstand (*range*: 77,1 – 423,0 µg/ml). Es zeigte im Zellpellet eine signifikant höherer Proteinkonzentrationen als im Überstand ($p = 0,005$, *student-t-test*).

Für die ARDS-Patienten ergab sich ein Median von 1782,3 µg/ml (*range*: 267,5 – 11162,6 µg/ml) im Zellpellet und von 2141 µg/ml im Überstand (*range*: 231,8 – 12488,2 µg/ml). Im Gegensatz zu den lungengesunden Probanden war die Konzentration im Zellpellet und Überstand nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,46$; *student-t-test*).

Vergleicht man die Zellpellets und Überstände der lungengesunden Probanden und der ARDS-Patienten miteinander, zeigen sich bei ARDS-Patienten im Vergleich zu den lungengesunden Probanden eine signifikant höhere Proteinkonzentrationen in den Zellpellets und Überständen ($p = 0,0005$ für die Zellpellets bzw. $p = 0,0003$ für die Überstände, *student-t-test*; Abb. 14).

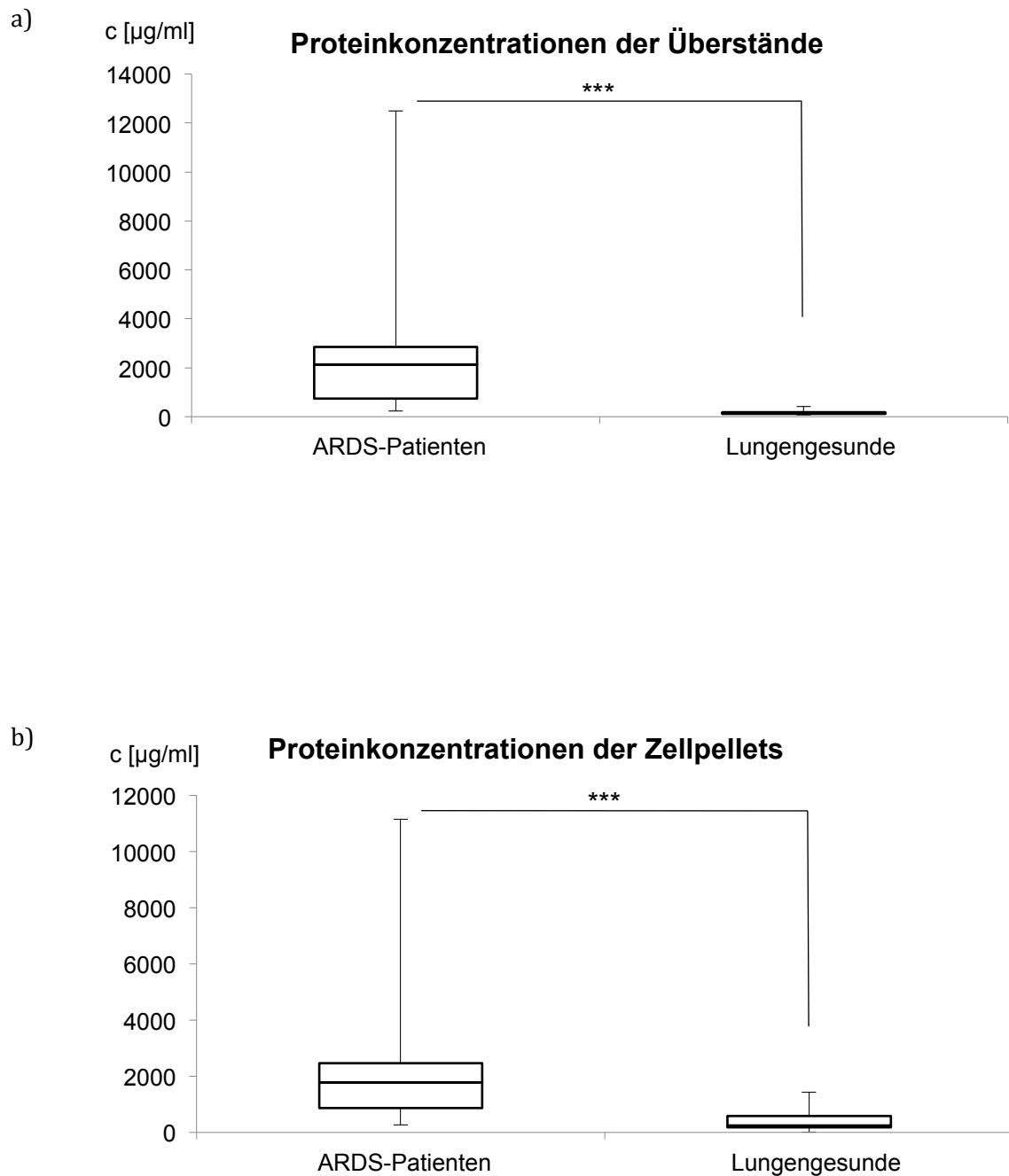


Abb. 14: Vergleichende Proteinkonzentrationen in BAL von ARDS-Patienten und lungengesunden Probanden in den Zellpellets (a) und Überständen (b). ARDS-Patienten: n= 36, lungengesunde Probanden: n= 20. Sowohl in den Überständen als auch den Zellpellets war die bestimmte Proteinkonzentration der ARDS-Patienten signifikant höher im Vergleich zu lungengesunden Probanden (** $p < 0,001$). In der Abbildung sind der Median, die 25. und 75. Perzentile, sowie das Minimum und das Maximum angegeben.

3.1.2 Proteinmuster und Proteinidentifizierung

Zur weiteren Charakterisierung der BAL wurde die Proteinzusammensetzung sowohl der lungengesunden Probanden als auch der *ARDS*-Patienten bestimmt. Ziel dieser Untersuchung sollte sein, Proteine zu identifizieren, welche sich zwischen lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten unterscheiden.

3.1.2.1 Proteinmuster der BAL lungengesunder Probanden

Die Analyse der Proteinmuster lungengesunder Probanden zeigte Proteinbanden, die sich nahezu konstant in allen Proben – sowohl im Überstand als auch im Zellpellet – nachweisen ließen (Abb. 15). Hierzu gehörten beispielsweise prominente Banden bei circa 63 kDa und 70 kDa (+; Abb. 15a) sowie eine Doppelbande bei circa 55-60 kDa (→; Abb. 15b). In allen Überständen, jedoch nicht in den Zellepellets der dazugehörigen Proben, konnten Proteinbanden bei ungefähr 30 kDa (*; Abb. 15b) und 40 kDa (*; Abb. 15b) identifiziert werden. Des Weiteren zeigten einige Proben Proteinbanden im höher molekularen Bereich bei größer 70 kDa (| ; Abb. 15b).

Insgesamt war das Proteinmuster der einzelnen Proben bei lungengesunden Probanden im Vergleich sehr homogen, so dass sich in den einzelnen Proben wenige für die einzelnen Proben spezifische Banden nachweisen ließen. Die Analyse der Proben lungengesunder Probanden zeigte außerdem, dass die Zellpellets in der Summe eine größere Anzahl Proteinbanden aufwiesen als die Überstände dieser Proben. Analog dazu konnte auch eine deutlich höhere Gesamtproteinkonzentration in den Zellpellets der lungengesunden Probanden im Vergleich zu den Überständen dieser Probanden bestimmt werden.

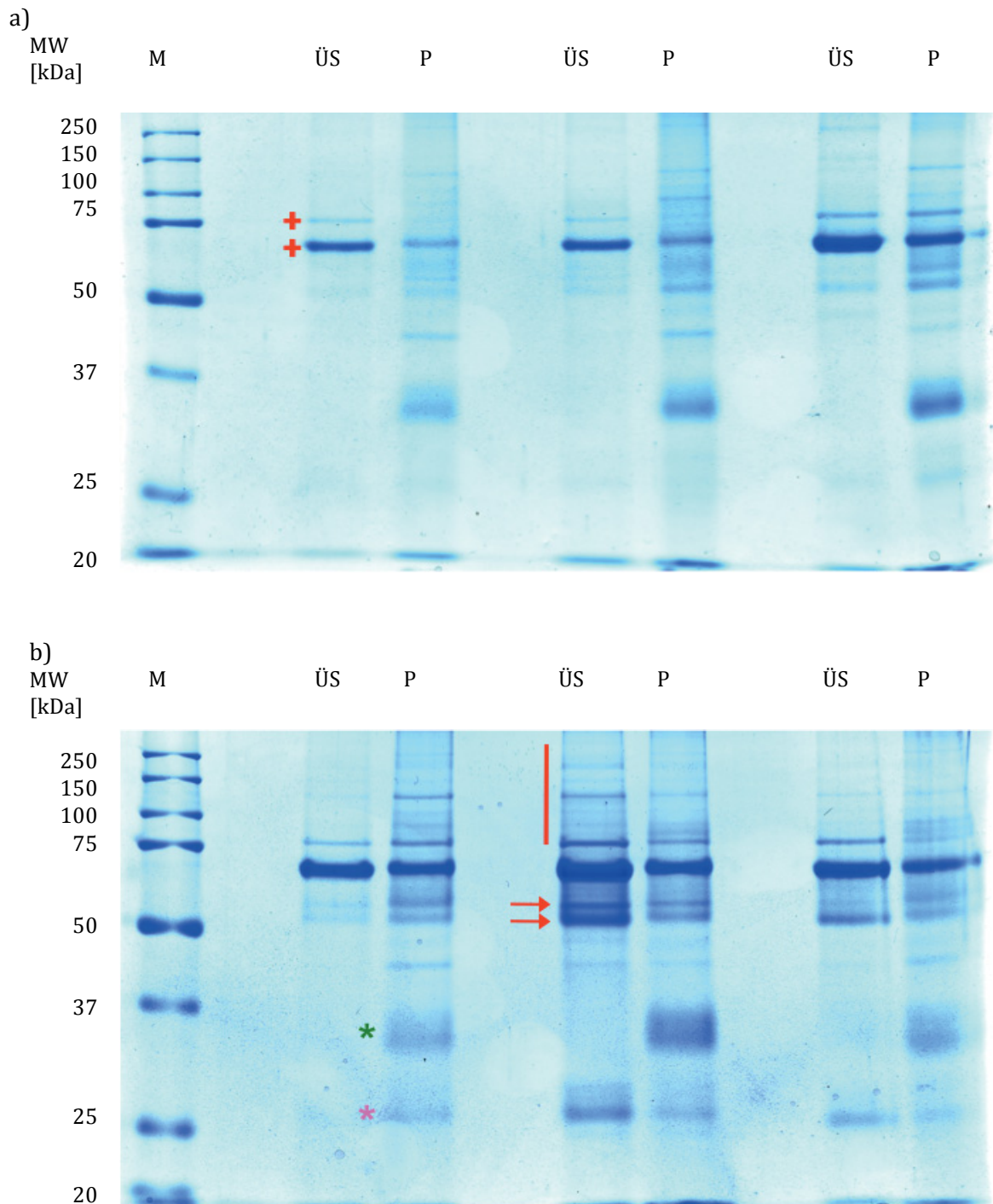


Abb. 15: 1D-Gelelektrophorese der Bronchoalveolären Lavage Proben (BAL) von sechs lungengesunden Probanden. Die beiden 1D-Polyacrylamid-Elektrophorese-Gele zeigen exemplarisch Proben von je drei lungengesunden Probanden - jeweils gelelektrophoretische Auftrennung des Überstandes (ÜS) und des Pellets (P). Der Molekulargewichtsmarker (M) befindet sich jeweils in der linken Lane. Es zeigen sich jeweils Banden, die sich bei nahezu allen Patienten wiederfinden (z.B. bei 63 kDa und 70 kDa „+“; Doppelbande 55-60 kDa „→“). Andere Banden lassen sich nur in den Überständen, nicht jedoch in den Zellepellets der dazugehörigen Proben nachweisen (bei 30 kDa bzw. 40 kDa „*“) Proteinbanden im höher molekularen Bereich bei größer 70 kDa sind durch „|“ gekennzeichnet.

3.1.2.2 *Proteinmuster der BAL der ARDS-Patienten*

Die Auswertung der Proteinmuster von BAL- Überstand und Zellpellet der *ARDS*-Patienten ergab sowohl konstante Banden, die sich bei nahezu allen Proben finden ließen, als auch variable Banden, die nur bei bestimmten Patienten auftraten (Abb. 16). Eine konstante Bande bei allen *ARDS*-Patienten zeigte sich bei circa 63 kDa (⊗; Abb. 16a). Diese Bande trat zwar bei unterschiedlichen Proben in verschiedener Intensität auf, wurde aber für alle 36 *ARDS*-Proben nachgewiesen. Eine Doppelbande bei circa 25 kDa (⊗; Abb. 16b) zeigte sich ebenfalls konstant in allen Proben. Vor allem bei den Überständen, aber auch in einigen Zellpellets der *ARDS*-Patienten zeigten sich Proteinbanden im Bereich größer 75 kDa (|; Abb. 16). Variable Banden konnten beispielweise bei ungefähr 70 kDa (→; Abb. 16b) und 35 kDa (→; Abb. 16a) beschrieben werden. Außerdem konnten in dem Überstand eines *ARDS*-Patienten im Bereich von ungefähr 35 kDa drei gut von einander aufgetrennte, schwach Coomassie-gefärbte Banden differenziert werden (O; Abb. 16a).

Im Gegensatz zu den *ARDS*-Patienten erschien die Proteinzusammensetzung der Proben lungengesunder Probanden viel einheitlicher: Bei *ARDS*-Patienten fand sich eine größere Variabilität im Proteinmuster sowohl im Überstand und Zellpellet einer Probe als auch zwischen den einzelnen Proben. Ferner ließen sich bei *ARDS*-Patienten auch deutlich mehr Proteinbanden nachweisen. Dieses galt sowohl für die Zellpellets als auch für die Überstände.

Charakteristische Banden, welche für *ARDS*- oder lungengesunde Probanden spezifisch waren, wurden in einem weiteren Schritt näher untersucht. Hierzu erfolgte eine Extraktion der ausgewählten Proteinbanden aus den 1D-Gelen, ein tryptischer In-Gel Verdau (IGV) und eine anschließende massenspektrometrische Identifizierung.

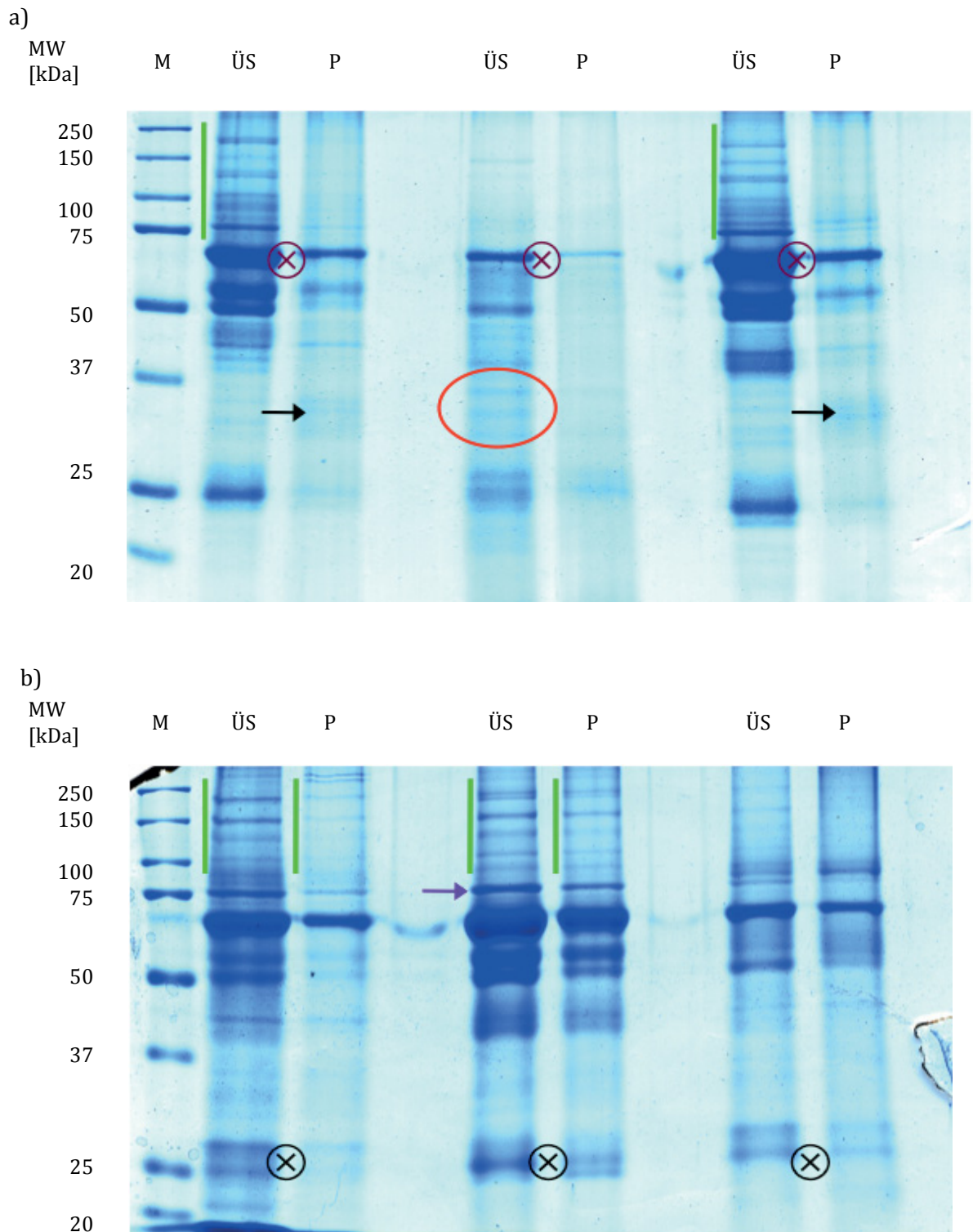


Abb. 16: 1D-Gelelektrophorese der Bronchoalveolären Lavage Proben (BAL) von sechs ARDS-Patienten. Die beiden 1D-Polyacrylamid-Elektrophorese-Gele zeigen exemplarisch Proben von je drei ARDS-Patienten (jeweils gelelektrophoretische Auftrennung des Überstandes (ÜS) und des Pellets (P)). Der Molekulargewichtsmarker (M) befindet sich jeweils in der linken Lane. Links von dieser sind die molekularen Massen des Markers notiert. Insgesamt zeigten sich sowohl konstante (z.B. bei 25 kDa „⊗“ und 63 kDa „⊗“) als auch variable Banden. Variable Banden konnten insbesondere im Bereich größer 75 kDa „|“ und bei ungefähr 70 kDa „→“ und 35 kDa „→“ beschrieben werden.

3.1.2.3 Proteinidentifizierung

Die durchgeführte 1D-Gelelektrophorese zeigte qualitative starke Unterschiede in der Proteinzusammensetzung bei lungengesunden Probanden und ARDS-Patienten. Um diese unterschiedlichen Proteine auf ihre Eignung als Substrat für das 20S Proteasom zu untersuchen, mussten diese zunächst identifiziert werden. Hierfür wurden nach dem Vergleich der 1D-Gele einige charakteristische Proteinbanden ausgewählt und aus den Gelen ausgeschnitten. Im Folgenden wurden diese Proteinbanden mittels tryptischen IGV und Massenspektrometrie (MS) untersucht.

Zur Identifizierung eines Proteins mittels MS wurde zunächst ein Übersichtsspektrum angefertigt (Abb. 17).

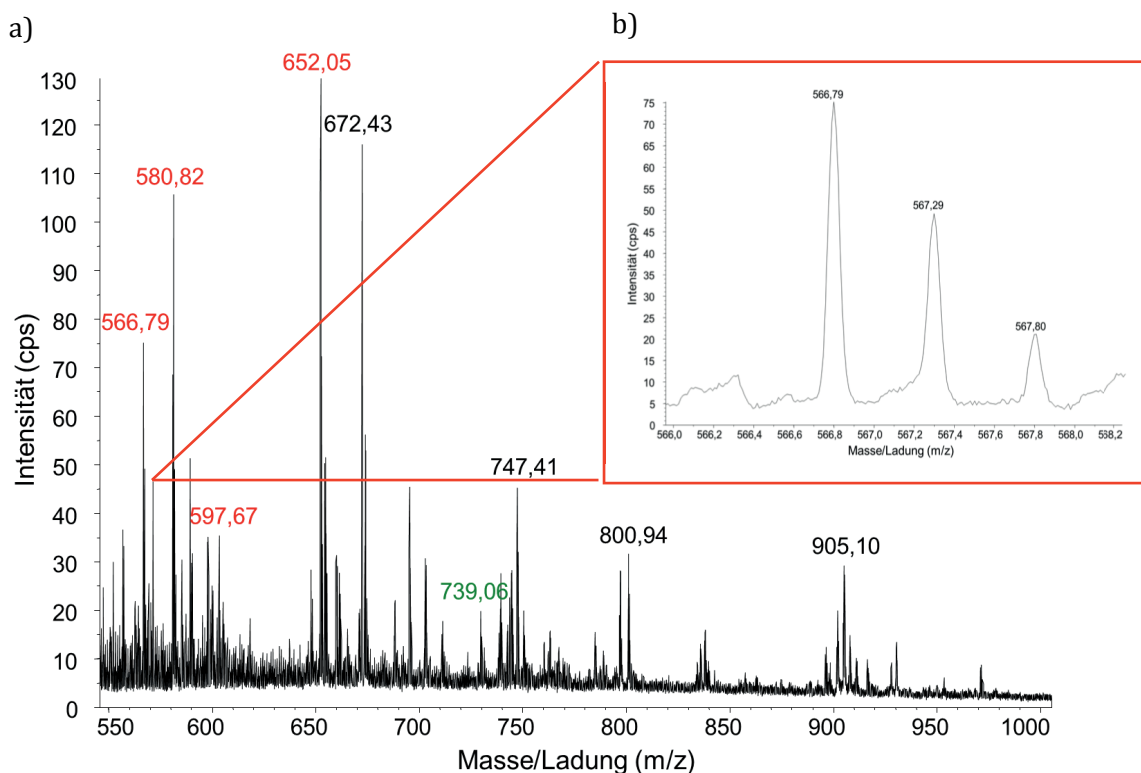


Abb. 17: Massenspektrum einer Proteinbande bei circa 40 kDa. a) In der massenspektrometrischen Untersuchung konnte humanes zytoplasmatisches Aktin identifiziert werden. Die roten Werte geben die identifizierten Peptidsignale wider, der grüne Wert wurde nicht mittels MS/MS-Analyse identifiziert, bestätigte aber die Sequenz des Aktins. b) Beispiel eines Isotopenmusters des m/z-Wertes bei m/z=566,79. Es handelte sich um ein 2-fach geladenes Ion. Die Ladung des Ions konnte aus der Massendifferenz $[(M+H)^{2+}=1/2\text{Da}=0,5\text{ Da}]$ der Isotopen zueinander berechnet werden. Die Identifikation bekannter Peptidabschnitte des Trypsins in den Proben kann durch den vorherigen IGV mit Trypsin erklärt werden. Entsprechende Signale konnten herausgefiltert werden und wurden somit nicht weiter untersucht. In der vorliegenden Probe traten zum Beispiel die 2-fach geladenen Ionen m/z=412,77, m/z=421,77, m/z=523,31 und die 3-fach geladenen Ionen m/z=647,68 und m/z=747,08 Da auf, welche Peptide des Trypsins widerspiegeln.

Nachdem das Übersichtsspektrum aufgezeichnet wurde, wurden Peptidsignale herausgesucht. Hierbei ist zu beachten, dass der IGV mit dem Enzym Trypsin durchgeführt wurde. Dies führt dazu, dass auch Peptidsignale des Trypsins selbst in der Probe auftreten (Eigenverdau von Trypsin). Bekannte Peptidabschnitte des Trypsins wurden herausgefiltert und somit nicht weiter berücksichtigt. Die herausgesuchten Peptidsignale werden im Folgenden selektiert und fragmentiert (Abb. 18). Liegt das Fragmentspektrum eines selektierten, fragmentierten Ions vor, können aus der Differenz der einzelnen Signale die Aminosäuren errechnet werden. Das an dieser Stelle analysierte Fragmentspektrum fand sich als Aminosäuresequenz 197-206 in humanem zytoplasmatischem Aktin. Neben dieser Sequenz konnten acht weitere Aminosäuresequenzen des zytoplasmatischen Aktins bestimmt werden (Tabelle 15). Mit insgesamt 105 identifizierten von insgesamt 375 Aminosäuren entsprach das einer Sequenzabdeckung von 28% des humanen zytoplasmatischen Aktins (Accession Number: P60709, Proteingröße: M= 41,71 kDa, 375 Aminosäuren).

Tabelle 15: Identifizierte Aminosäuresequenzen für humanes zytoplasmatisches Aktin.

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäuresequenz	P0sition
488,75	2	976,50	AGFAGDDAPR	19-28
499,77	2	998,50	DLTDYLMK	184-191
566,79	2	1132,58	GYSFTTTAER	197-206
580,81	2	1160,62	EITALAPSTMK	316-326
505,94	3	1515,82	IWHHTFYNELR	85-95
597,66	3	1790,98	SYELPDGQVITIGNER	239-255
652,05	3	1954,09	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	96-113
739,06	3	2215,18	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	292-312

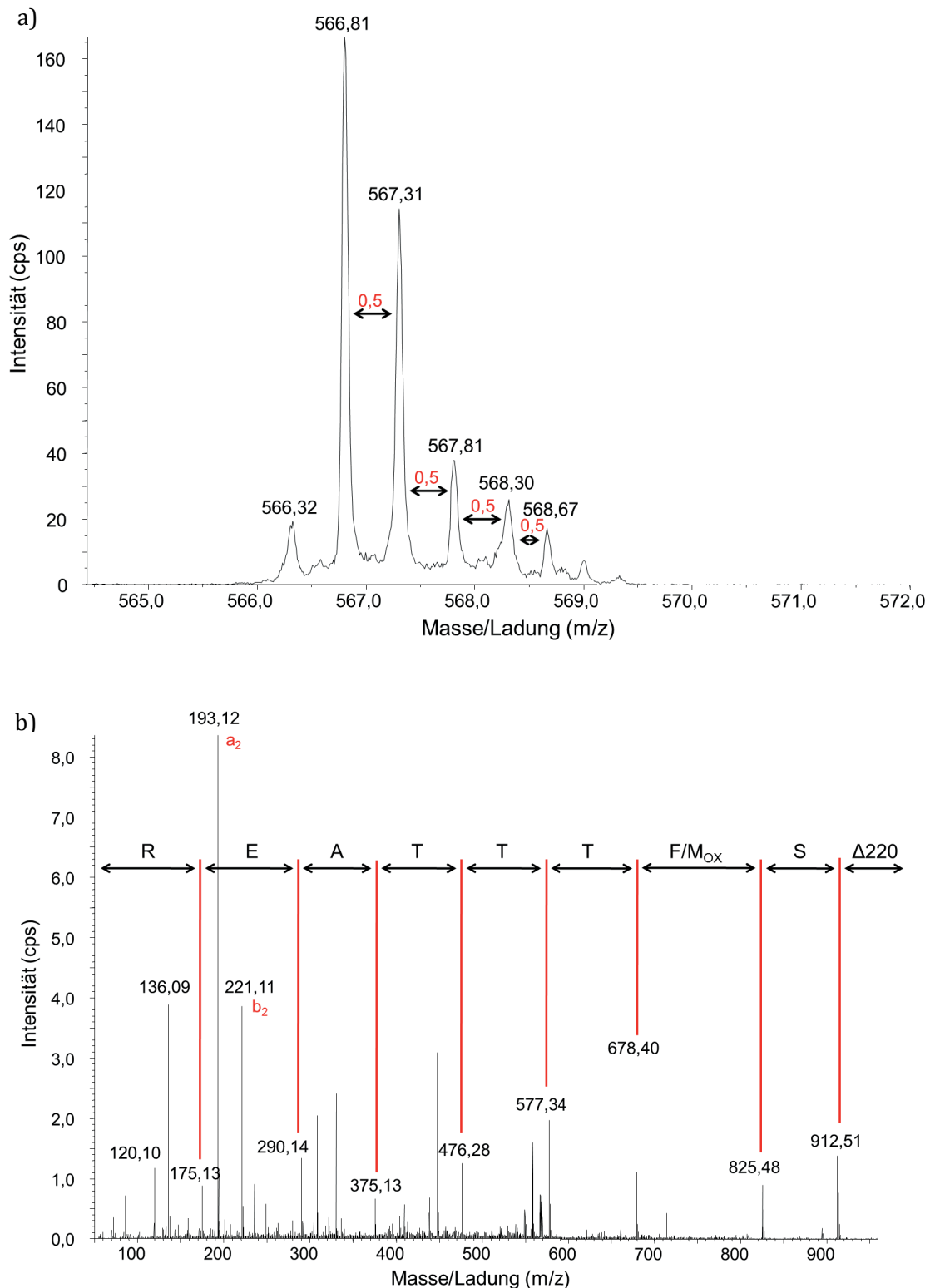


Abb. 18: Massenspektren des selektierten Ions bei $m/z=566,81$ Da. a) Isotopenmuster des selektierten Ions. Die Massendifferenz zwischen den einzelnen Isotopen betrug 0,5 Da. Es handelte sich somit um ein 2-fach geladenes Ion. Es ließ sich eine Gesamtmasse von 1132,58 Da errechnen. b) Fragmentspektrum des selektierten Ions. Aus der Differenz der einzelnen Signale zueinander wurden die Aminosäuren errechnet. Die Summe der Massen aller Aminosäuren ergab die Gesamtmasse des Peptids. Auf diese Weise konnte die gesamte Aminosäuresequenz des Peptids bestimmt werden. Es ergab sich die Aminosäuresequenz: Glycin-Tyrosin-Serin-Phenylalanin-Threonin-Threonin-Threonin-Alanin-Glutamat-Arginin=G-Y-S-F-T-T-T-A-E-R. Das analysierte Fragmentspektrum fand sich als Aminosäuresequenz 197-206 in humanem zytoplasmatischem Aktin. Neben dieser Sequenz konnten acht weitere Aminosäuresequenzen bestimmt werden. Mit insgesamt 105 identifizierten von 375 Aminosäuren entsprach das einer Sequenzabdeckung von 28%.

Insgesamt wurden 17 Proteinbanden mittels IGV und MS analysiert. Dabei konnten fünf Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden (Tabelle 16). Die übrigen zwölf Proteinbanden, welche ebenfalls untersucht wurden, konnten auf Grund einer zu geringen Proteinkonzentration nicht identifiziert werden.

Tabelle 16: Ausgewählte Proteinbanden zur Identifizierung im tryptischen In-Gel-Verdau. Es werden ausgewählte Proteinbanden gezeigt, welche mit Hilfe eines tryptischen In-Gel-Verdau und Massenspektroskopie näher analysiert wurden. Angegeben sind die Probe, aus dem die jeweils ausgewählte Bande stammte und das ungefähre Molekulargewicht der jeweiligen Bande. Spalte 3 gibt an, welches Protein identifiziert wurde.

Probe	Molekulargewicht	Identifiziert
Lungengesund / Pellet	30 kDa	Humanes Surfactant Protein A
ARDS / Überstand	150 kDa	Nein
ARDS / Pellet	40 kDa	Humanes Haptoglobin
ARDS / Pellet	50 kDa	Humanes Fibrinogen - γ -Kette
ARDS / Pellet	100 kDa	Nein
ARDS / Überstand	30 kDa	Nein
ARDS / Überstand	60 kDa	Humanes Serum Albumin
ARDS / Überstand	35 kDa	Nein
ARDS / Überstand	150 kDa	Nein
ARDS / Überstand	240 kDa	Nein
ARDS / Überstand	40 kDa	Humanes zytoplas. Aktin
ARDS / Überstand	15 kDa	Nein
ARDS / Überstand	18 kDa	Nein
ARDS / Überstand	75 kDa	Nein
ARDS / Überstand	120 kDa	Nein
ARDS / Überstand	150 kDa	Nein
ARDS / Überstand	200 kDa	Nein

3.2 Proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms

Bevor die proteolytischen Aktivitäten der 20S Proteasom-Chargen bestimmt wurden, wurde zunächst eine AMC-Eichreihe (23-3000 pmol/ml) erstellt (Abb. 19).

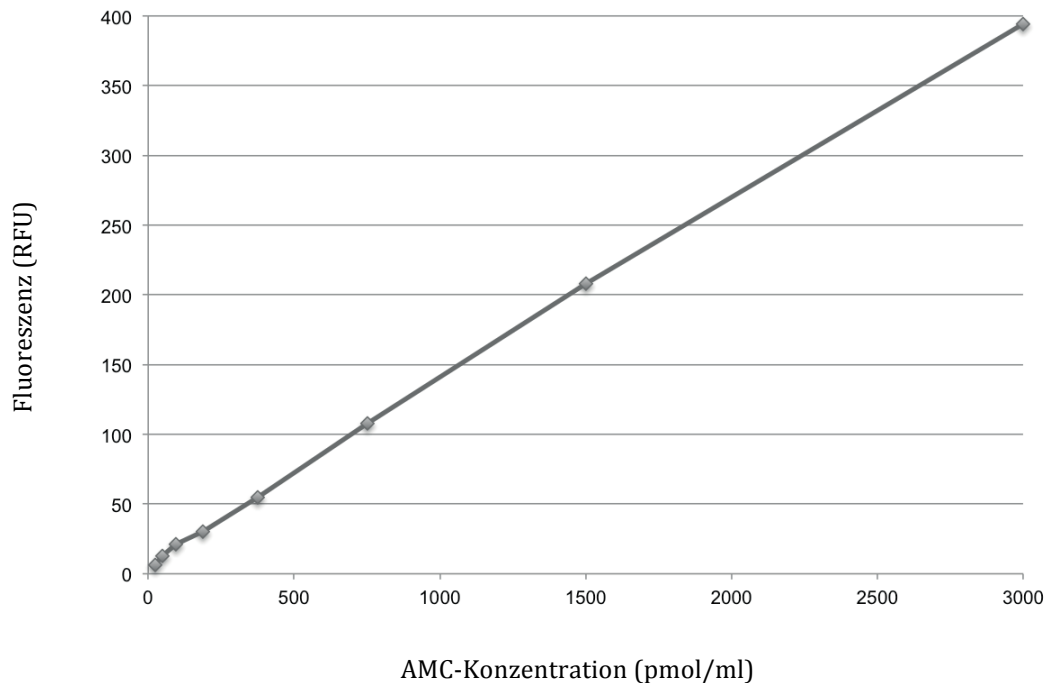


Abb. 19: AMC-Eichreihe. Es wurde eine Standard-Eichreihe erstellt, indem AMC-Konzentrationen zwischen 23-3000 pmol/ml gemessen wurden. (RFU: *relative fluorescence units*, relative Fluoreszenzeinheiten; AMC: 7-Amino-4-Methylcumarin).

Es wurden insgesamt sechs Proteasom-Chargen untersucht (4, 5, 6, 7, 8 und 9). Da diese aus verschiedenen Probanden stammten und aus mehreren Probanden gepoolt wurden, muss davon ausgegangen werden, dass sie sich hinsichtlich der Quantität ihrer proteolytischen Aktivitäten des 20S Proteasoms unterscheiden. Um sicherzustellen, dass das verwendete 20S Proteasom proteolytisch aktiv war und einen Vergleich zwischen den jeweiligen Proteasom-Chargen zu haben, wurden die proteolytischen Aktivitäten zunächst im Fluoreszenz-Enzym-Assay untersucht.

3.2.1 Chymotrypsin-ähnliche Aktivität

Zur Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität der einzelnen Chargen wurde das Modell-Substrat Suc-LLVY-AMC ($c = 200 \mu\text{M}$) verwendet. Die entsprechende relative Fluoreszenz für die einzelnen Enzym-Substrat-Verhältnisse sowie die mittlere relative Fluoreszenz und die Standardabweichungen sind in Tabelle 17 aufgeführt und in Abb. 20 dargestellt.

Tabelle 17: Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität.

Enzym-Substrat-Verhältnis	4	5	6	7	8	9	MW	SD
1:480.000	22,5	27,0	15,5	24,0	22,0	39,0	25,0	3,2
1:240.000	25,5	36,0	24,5	28,0	25,0	64,0	33,8	6,3
1:120.000	47,5	52,5	35,5	38,5	37,5	101,5	52,2	10,2
1:60.000	92,5	101,0	60,0	62,0	68,5	158,0	90,3	15,2
1:30.000	162,0	156,5	88,0	99,5	101,5	244,0	141,9	24,1

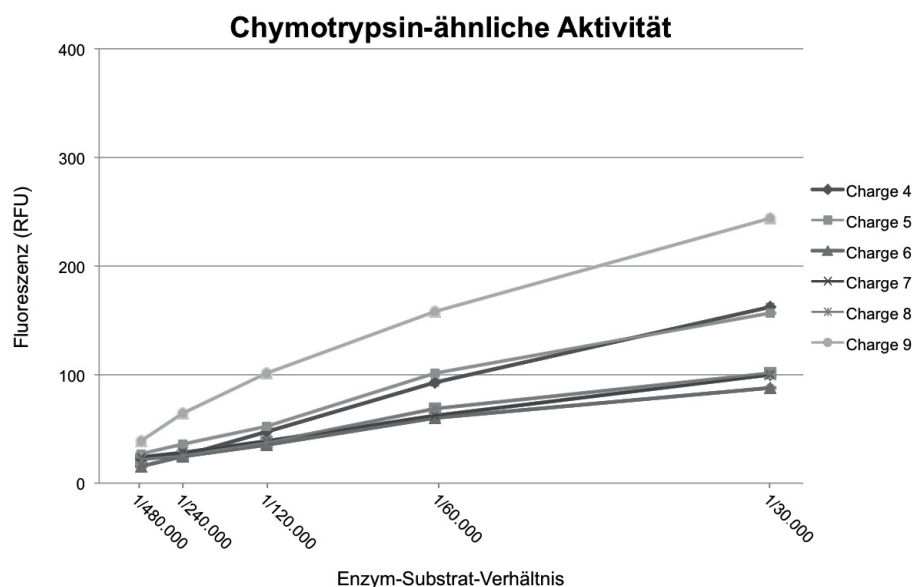


Abb. 20: Ergebnisse der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität (auf der y-Achse in relativen Fluoreszenzeinheiten / *relative fluorescence units* / RFU) der jeweiligen 20S Proteasomchargen vom Enzym-Substrat-Verhältnis (x-Achse, Verdünnung des Proteasoms).

Ein steigendes Enzym-Substrat-Verhältnis bedeutet, dass mehr Enzym, also h-Ery 20S Proteasom, pro Substratmenge zu Verfügung stand. Alle untersuchten Proteasom-Chargen wiesen eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf, wobei es jedoch starke Unterschiede in ihrer Aktivität zwischen den einzelnen Chargen gab. Insbesondere Charge 9 zeigte eine deutliche höhere Chymotrypsin-ähnliche Aktivität als die übrigen untersuchten Chargen.

3.2.2 Trypsin-ähnliche Aktivität

Zur Quantifizierung der Trypsin-ähnlichen Aktivität wurde das Substrat BZ-VGR-AMC ($c = 400 \mu\text{M}$) verwendet (Tabelle 18 und Abb. 21).

Tabelle 18: Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Trypsin-ähnliche Aktivität.

Enzym-Substrat-Verhältnis	4	5	6	7	8	9	MW	SD
1:480.000	96,5	103,5	103,5	111,0	108,5	122,5	107,6	3,6
1:240.000	112,5	111,0	108,5	116,6	115,5	133,0	116,2	3,6
1:120.000	124,5	118,5	112,0	114,0	126,0	156,5	125,3	6,6
1:60.000	143,0	145,5	137,0	134,0	143,5	203,0	151,0	10,6
1:30.000	199,0	194,5	181,5	183,0	195,0	336,0	214,8	24,4

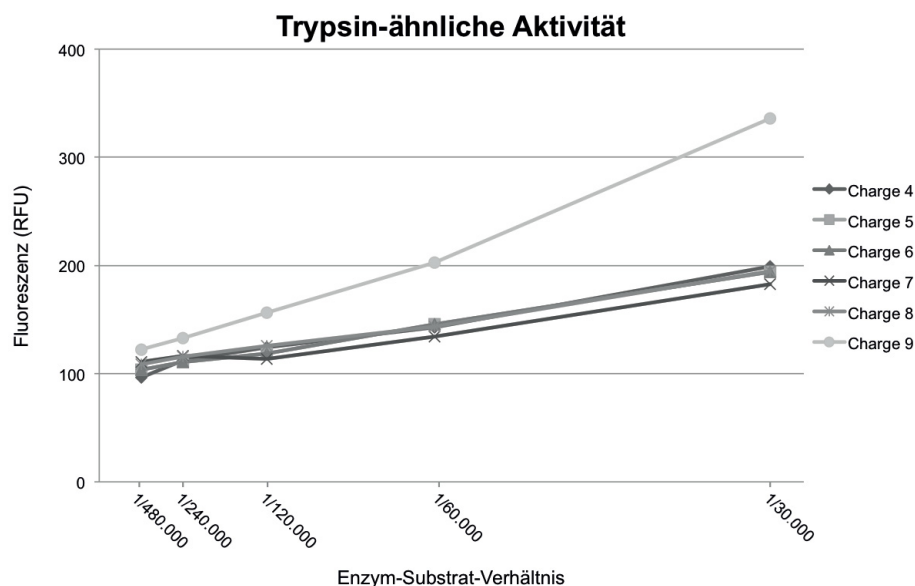


Abb. 21: Ergebnisse der Trypsin-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Trypsin-ähnlichen Aktivität (auf der y-Achse in relativen Fluoreszenzeinheiten / *relative fluorescence units* / RFU) der jeweiligen 20S Proteasomchargen vom Enzym-Substrat-Verhältnis (x-Achse, Verdünnung des Proteasoms).

Alle Proteasomchargen wiesen eine Trypsin-ähnliche Aktivität auf. Analog zur Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität weist auch hier Charge 9 eine hohe Aktivität auf.

3.2.3 Caspase-ähnliche Aktivität

Für die Auswertung der Caspase-ähnlichen Aktivität wurde das Substrat Z-LLE-AMC ($c = 400 \mu\text{M}$) verwendet. Die proteolytischen Aktivitäten der β_1 -Untereinheit zeigten sich für die sechs Proteasomchargen sehr heterogen (Tabelle 19 und Abb. 22).

Tabelle 19: Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Caspase-ähnliche Aktivität.

Enzym-Substrat-Verhältnis	4	5	6	7	8	9	MW	SD
1:480.000	213,5	200,5	205,5	182,5	176,0	199,5	196,3	5,8
1:240.000	279,0	232,5	254,5	180,0	174,5	205,0	220,9	17,0
1:120.000	420,5	335,5	363,0	214,0	189,0	244,5	294,4	37,6
1:60.000	697,0	517,0	561,5	278,0	230,5	326,0	435,0	75,2
1:30.000	1099,0	815,5	913,0	447,0	279,5	442,0	666,0	131,4

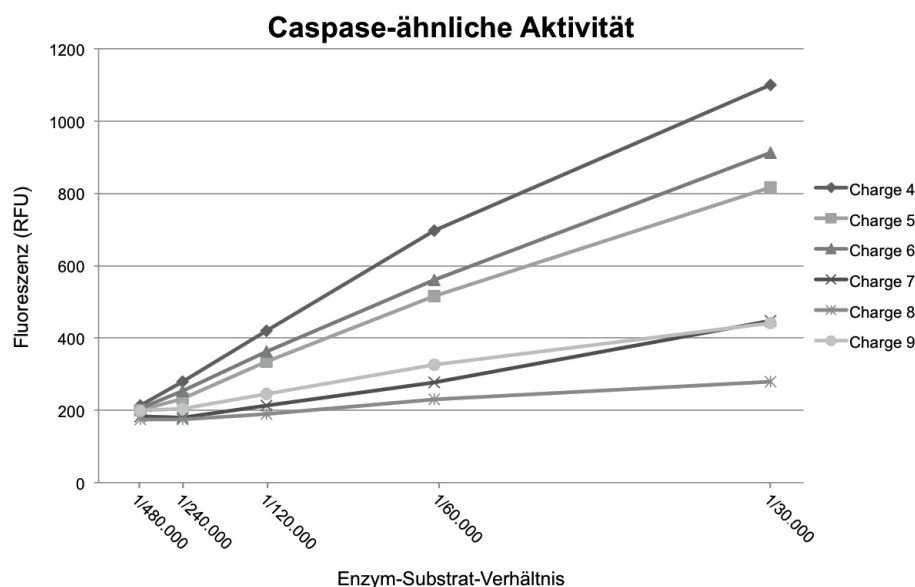


Abb. 22: Ergebnisse der Caspase-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Caspase-ähnlichen Aktivität (auf der y-Achse in relativen Fluoreszenzeinheiten / *relative fluorescence units* / RFU) der jeweiligen 20S Proteasomchargen vom Enzym-Substrat-Verhältnis (x-Achse, Verdünnung des Proteasoms).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass für alle proteolytischen Aktivitäten in allen Proteasom-Chargen die Fluoreszenzen als Maß für die untersuchten Enzym-

Aktivitäten mit zunehmendem Enzym-Substrat-Verhältnis anstiegen. Zwischen den einzelnen Chargen gab es bezogen auf die enzymatischen Aktivitäten einige Unterschiede. Die Diagramme zeigen, dass sich die Verteilung der Fluoreszenz in den einzelnen Chargen für die jeweiligen Aktivitäten unterschieden. Die Trypsin-ähnliche Aktivität war in den in dieser Arbeit untersuchten Chargen die am gleichmäßigsten verteilte Aktivität. Alle Chargen zeigten eine ähnliche Fluoreszenz. Nur Charge 9 bildete hiervon eine Ausnahme. Die Fluoreszenz stieg vor allem bei einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:30.000 stark an. Die Charge 9 zeigte ein ähnliches Verhalten bei der Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, hingegen ein komplett umgekehrtes Verhalten bei der Messung der Caspase-ähnlichen Aktivität. In diesem Fall stieg die Fluoreszenz der Charge 9 nur relativ gering an. Charge 4 und 5 der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität und Charge 4, 5 und 6 der Caspase-ähnlichen Aktivität zeigten ebenfalls einen steilen Anstieg der Fluoreszenz für das Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:30.000. Die Proteasom-Chargen 7 und 8 hatten für die drei gemessenen proteolytischen Aktivitäten das konstanteste Verhalten und fielen im Vergleich mit den anderen Chargen eher gering aus. Bei der Betrachtung der drei proteolytischen Aktivitäten untereinander muss beachtet werden, dass das Substrat für die Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität nur in der Hälfte der Konzentration (200 $\mu\text{mol/l}$) im Vergleich zu den anderen beiden Substraten vorlag. Somit ist verständlich, warum die gemessene Fluoreszenz bei diesem Substrat am niedrigsten ausfiel, obwohl beschrieben ist, dass die β_5 -Untereinheit der Proteasomen die höchste proteolytische Aktivität aufweist.

3.3 Der *in-vitro*-Verdau verschiedener Proteine

3.3.1 *In-vitro*-Verdau von Insulin

Insulin ist ein Heterodimer, welches sich aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer B-Kette (30 Aminosäuren) zusammensetzt. Diese sind über zwei Disulfidbrücken verbunden. Innerhalb der A-Kette befindet sich eine weitere Disulfidbrücke (Abb. 23).

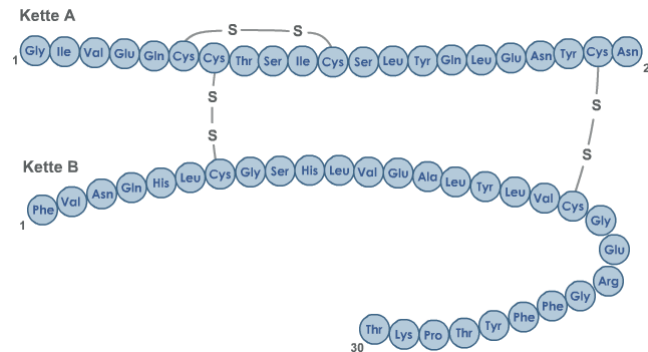


Abb. 23: Struktur des Insulins. Heterodimer bestehend aus einer A-Kette und einer B-Kette, die verbunden sind über zwei Disulfidbrücken. Insgesamt umfasst das Protein 51 Aminosäuren.

In einer ersten Untersuchung konnten wir zeigen, dass Insulin prinzipiell durch das 20S Proteasom degradiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Um das Verdauverhalten des 20S Proteasom näher zu analysieren, erfolgte zunächst ein Modell-Versuch anhand des *in-vitro*-Verdaus von Insulin. Dabei sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen das 20S Proteasom Insulin degradiert und welche Produkte entstehen. Zunächst sollte evaluiert werden, ob eine vorherige Auflösung der höheren Proteinstrukturen für einen Verdau durch das 20S Proteasom notwendig ist. Vergleichend wurde daher der Verdau von Insulin nach Aufspaltung der Disulfidbrücken durch DTT und ohne Reduktion durch DTT analysiert:

- A1: Insulin + DTT + 20S Proteasom
- A2: Insulin + DTT (= Negativkontrolle 1)
- B1: Insulin + 20S Proteasom
- B2: Insulin (= Negativkontrolle 2)

Alle Ansätze wurden nach 0-, 7-, 20-, und 70-stündiger Inkubation massenspektrometrisch untersucht:

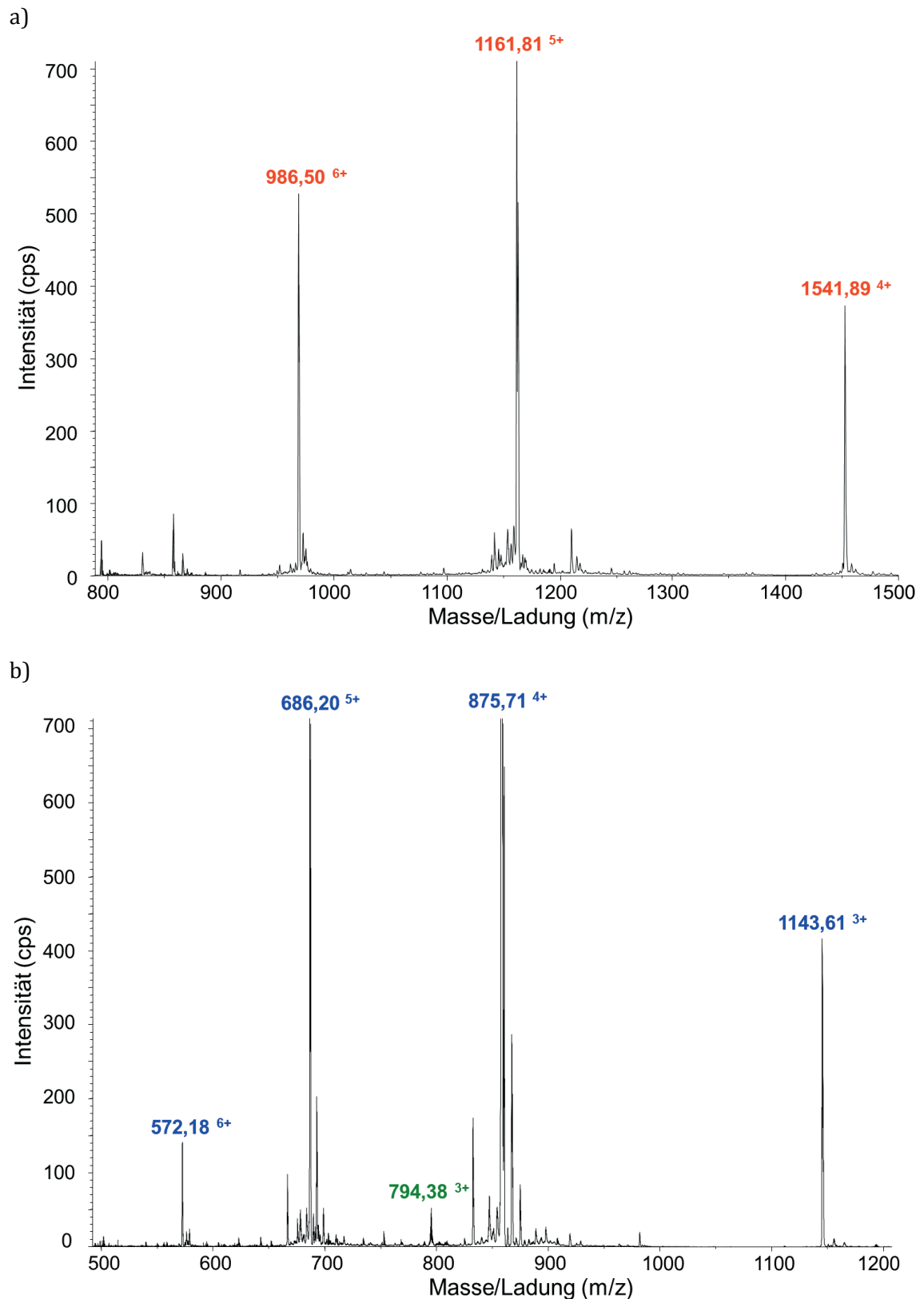


Abb. 24: Übersichtsspektren der Insulin-Versuchsansätze B2 und A2. a) Übersichtsspektrum des Versuchsansatzes von Insulin ohne Zugabe von Dithiothreitol (DTT) oder 20S Proteasom (B2) nach 20 Stunden. Zu erkennen sind die Signale des Insulins, bestehend aus A- und B-Kette in unterschiedlichen Ladungszuständen (orange). B) Übersichtsspektrum des Versuchsansatzes von Insulin und DTT (A2) nach 20 Stunden. A-Kette (grün) und B-Kette (blau) liegen nun in verschiedenen Ladungszuständen getrennt voneinander vor.

Für den Versuchsansatz B2 (nur Insulin) wurde zu jedem Messpunkt das vollständige Insulinmolekül bestehend aus A- und B-Kette in den verschiedenen Ladungszuständen (4-, 5- und 6-fach) nachgewiesen (Abb. 24 a). Weder einzeln auftretende A- und B-Ketten, noch Verdauprodukte des Insulins konnten identifiziert werden. Im Vergleich dazu waren in dem Versuchsansatz A2 (Insulin mit DTT ohne 20S Proteasom) neben dem vollständigen Insulin auch die einzelnen A- und B-Ketten in unterschiedlichen Ladungszuständen nachweisbar (Abb. 24 b).

Die getrennt vorliegenden A- und B-Ketten waren bereits 1 Stunde nach Zugabe von DTT identifizierbar, sowie auch zu jedem späteren Zeitpunkt. Verdauansatz A2 bestätigte im Vergleich zu Verdauansatz B2, dass DTT eine suffiziente Aufspaltung der Disulfidbrücken des Insulins ermöglichte.

Nach Zugabe von 20S Proteasom zu Insulin ohne vorherige Aufspaltung der Disulfidbrücken (Versuchsansatz B1), zeigte sich in der massenspektrometrischen Analyse ein ähnliches Bild zu dem Versuchsansatz B2. Es konnten keine Verdauprodukte von Insulin nachgewiesen werden (Abb. 25).

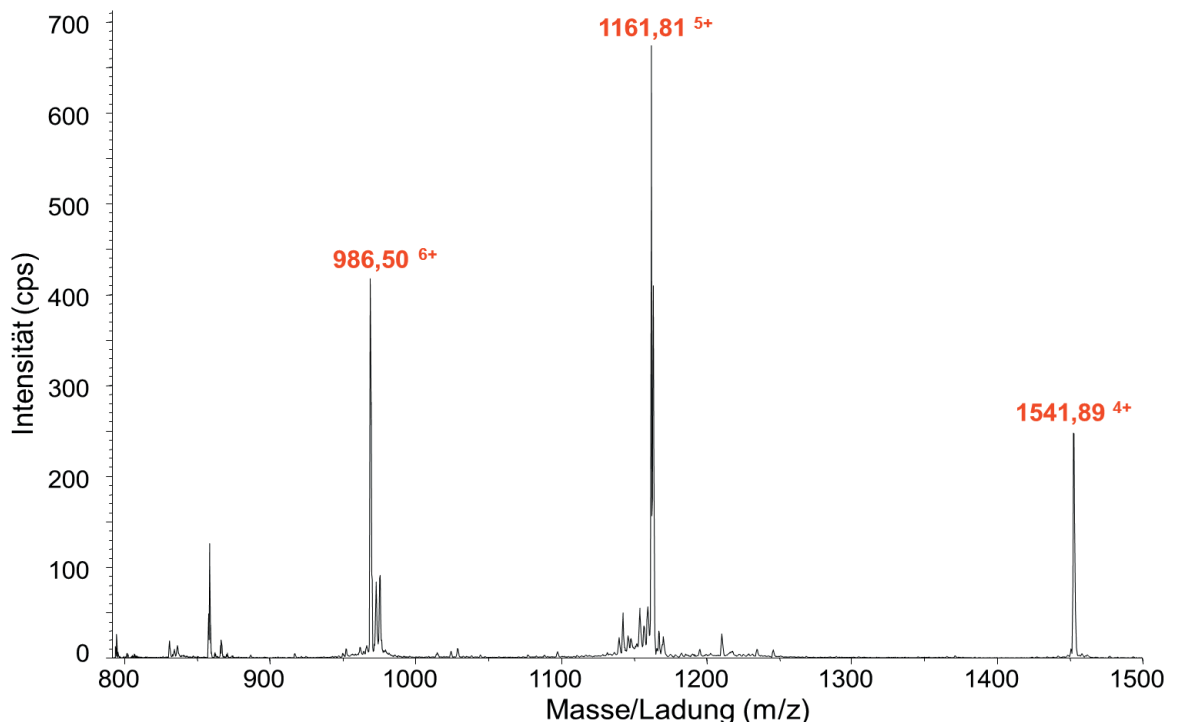


Abb. 25: Übersichtsspektrum des Insulin-Versuchsansatz B1. Zugabe von 20S Proteasom zum Insulin ohne vorherige Reduktion der Disulfidbrücken des Insulins mittels Dithiothreitol (DTT). Zu sehen ist das gesamte Insulin-Molekül in verschiedenen Ladungszuständen (orange). Verdauprodukte konnten nicht identifiziert werden.

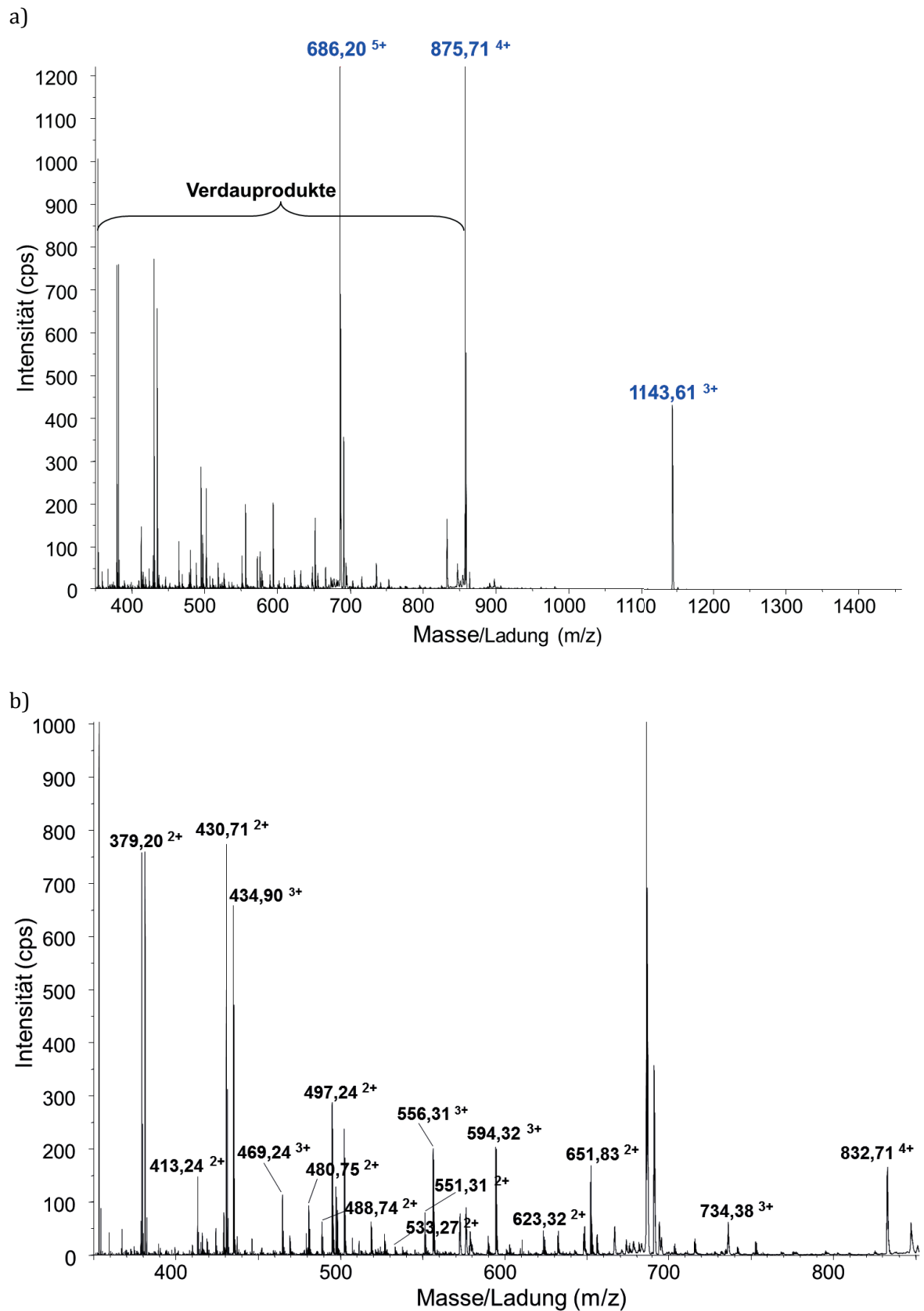


Abb. 26: Übersichtsspektrum des Insulin-Versuchsansatz A1. In diesem Fall erfolgte eine Inkubation sowohl mit Dithiothreitol (DTT) als auch mit dem 20S Proteasom. a) Zu erkennen sind zahlreiche Signale zwischen 350 und 700 kDa. b) Vergrößerung des Masse/Ladungs-Bereich zwischen 350 und 850 kDa mit Beschriftung der untersuchten Aminosäuresequenzen aus dem Ansatz A1.

Ein anderes Bild ergab sich, wenn sowohl DTT als auch 20S Proteasom zum Insulin gegeben wurden (Versuchsansatz A1). Es zeigten sich bei dem Verdau von Insulin durch das 20S Proteasom nach vorheriger Degradation der Sekundärstrukturen mittels DTT zahlreiche Verdausignale im Bereich zwischen 350 und 700 kDa (Abb. 26). Die Verdauprodukte konnten sowohl nach 20-stündiger als auch nach 70-stündiger Inkubation identifiziert werden.

Aus den Übersichtsspektren ließ sich ableiten, dass der Verdaupuffer alleine keinen Einfluss auf die Struktur des Proteins hatte und Insulin weiterhin als gesamtes Molekül unter Erhalt der Disulfidbrücken vorlag. Auch die alleinige Zugabe von 20S Proteasom führte zu keiner Veränderung dieses Zustandes. Erst die Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT führte zu einem entsprechenden Nachweis der A- und B-Kette im Übersichtsspektrum. In dem Versuchsansatz, in dem neben DTT auch 20S Proteasom verwendet wurde, wurden neben den einzelnen Ketten zahlreiche weitere Peptidsignale, vor allem zwischen 350 und 700 kDa, als Verdauprodukte des Insulins identifiziert. Ein Verdau von Insulin durch das 20S Proteasom war also nur nach vorheriger Auflösung der höheren Proteinstrukturen – insbesondere der Disulfidbrücken – möglich.

Um zum einen sicherzustellen, dass die hier bestimmten Signale tatsächlich Peptide aus dem Insulin-Molekül zuzuordnen waren und um zum anderen festzustellen, welche enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms für den jeweiligen Verdau verantwortlich war, wurden diese Signale mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. In Abb. 27 wird beispielhaft die massenspektrometrische Analyse eines Peptids ($m/z = 379,38$) erläutert.

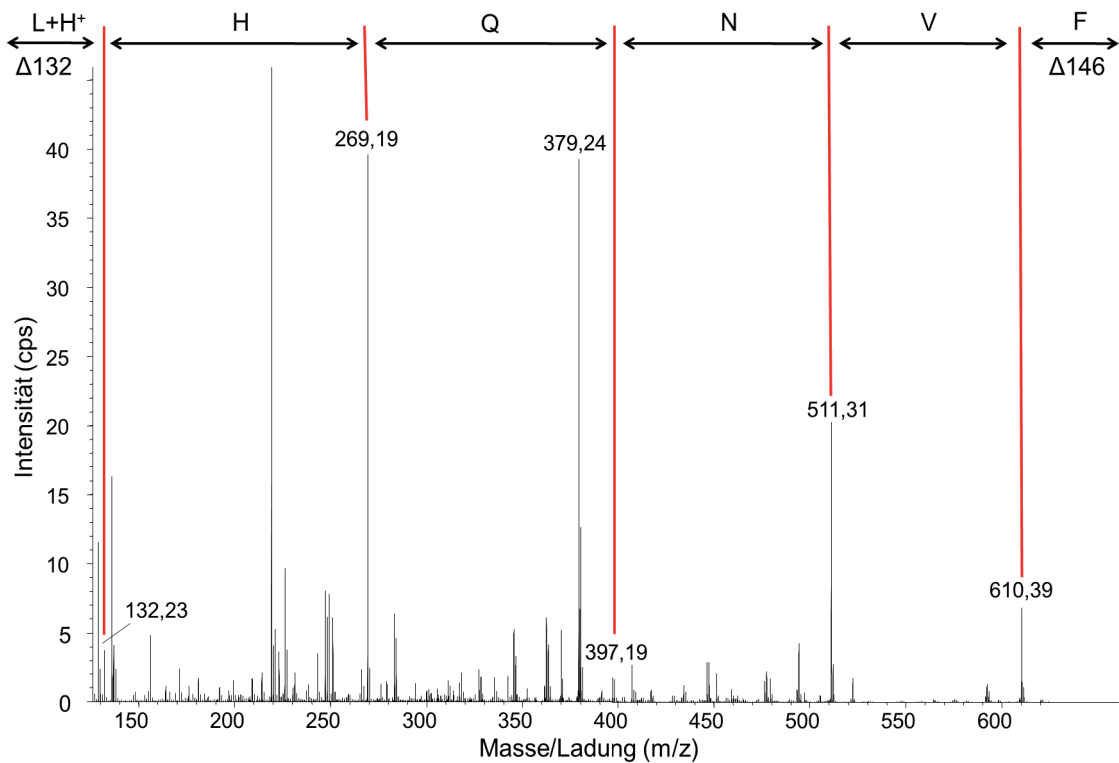


Abb. 27: MS-MS-Analyse des 2-fach geladenen Ions 379,19 Da. Es handelt sich um ein 2-fach geladenes Ion mit einer Masse von 757,38 Da. ($379,38 \text{ Da} \times 2 - 1$). An Hand der Differenz zwischen den verschiedenen Signalen konnte die Masse einzelner Aminosäuren bestimmt werden (F= Phenylalanin: 147,06 Da; V= Valin: 99,06 Da; N= Asparagin: 114,04 Da; Q= Glutamin: 128,05 Da; H= Histidin: 137,05 Da; L= Leucin: 131,08 Da). $\Delta 146$ entspricht Phenylalanin (F) $\Delta 132$ entspricht Leucin (L) plus einem Wasserstoffatom (H). Somit ergab sich für das fragmentierte Ion die Aminosäuresequenz: Phenylalanin-Valin-Asparagin-Glutamin-Histidin-Leucin. (F-V-N-Q-H-L). Im Anschluss konnte die identifizierte Aminosäuresequenz mit der Sequenz des Insulins abgeglichen werden. Die Sequenz befindet sich im Insulin in der B-Kette an Position b 1-6. Als C-terminale Aminosäure konnte ein Leucin bestimmt werden, so dass man daraus schließen kann, dass das identifizierte Fragment an dieser Stelle durch eine Caspase-ähnliche Aktivität des h-Ery 20S Proteasoms von der B-Kette abgespalten wurde.

Alle identifizierten Signale sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Anhand der Peptidsequenzen und der Schnittstellen konnte rückgeschlossen werden, welche enzymatische Untereinheit des 20S Proteasoms für den Schnitt verantwortlich gewesen sein musste (Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche, Caspase-ähnliche oder keine dieser bekannten Aktivitäten). Ferner wurden die identifizierten Peptide mit der Gesamtsequenz des Insulins abgeglichen und in einer Schnittkarte dargestellt (Abb. 28). Auf diese Weise konnten die Positionen der einzelnen Verdauprodukte im Insulin zugeordnet und eine genauere Aussage über die Schnittstellen und somit das Verdauverhalten des 20S Proteasoms vorgenommen werden.

Tabelle 20: Identifizierte Aminosäuresequenzen im *in-vitro*-Verdau von Insulin mit 20S Proteasom.

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäure- sequenz	Enzymatische Aktivitäten	
379,20	2	757,40	b 01 - 06	Ø/Chymotrypsin	
413,24	2	825,48	b 08 - 15	*/Chymotrypsin	
430,71	2	860,42	b 01 - 07	Ø/*	
464,74	2	928,48	b 07 - 15	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
480,75	2	960,50	b 23 - 30	Trypsin/Ø	
488,74	2	976,48	b 20 - 27	*/*	
497,23	2	993,46	b 05 - 13	*/Caspase	
526,75	2	1052,50	a 01 - 10	Ø/*	
551,31	2	1101,62	b 08 - 17	*/Chymotrypsin	
589,79	2	1178,58	b 18 - 27	Chymotrypsin/*	
623,32	2	1245,64	b 21 - 30	*/Ø	
		a 12 - 21	*/Ø		
651,83	2	1302,66	b 20 - 30	*/Ø	
434,90	3	1302,70	b 20 - 30	*/Ø	
469,24	3	1405,72	b 19 - 30	*/Ø	
752,87	2	1504,74	b 07 - 19	Chymotrypsin/*	
502,27	3	1504,81	b 18 - 30	Chymotrypsin/Ø	
518,62	3	1553,86	b 01 - 14	Ø/*	
556,31	3	1666,93	b 01 - 15	Ø/Chymotrypsin	
594,32	3	1780,96	b 16 - 30	Chymotrypsin/Ø	
655,69	3	1965,07	b 14 - 30	Caspase/Ø	
715,72	3	2145,16	b 01 - 19	Ø/*	
734,38	3	2201,14	b 01 - 20	Ø/*	
832,71	4	3327,84	b 01 - 29	Ø/Trypsin	

Aus den aufgezeichneten Signalen (m/z) und den dazugehörigen Ladungszuständen (z), ließen sich die jeweiligen Massen (m) berechnen. Die Position der jeweiligen Aminosäuresequenzen im Protein gibt Spalte 4 wieder. a= A-Kette und b= B-Kette des Insulins. Spalte 5 erklärt die enzymatische Aktivität, die für den jeweiligen Schnitt verantwortlich gewesen ist: Ø: keine Aktivität= Anfang/Ende der Kette, Caspase= Caspase-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Aspartat oder Glutamat, Trypsin= Trypsin-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Arginin oder Lysin, Chymotrypsin= Chymotrypsin-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Leucin, Phenylalanin, Tryptophan oder Tyrosin, *= atypische Aktivität: Schnitt hinter keiner der zuvor genannten Aminosäuren. Der Farbcode in Spalte 6 entspricht der Darstellung der jeweiligen Aminosäuresequenz in der Schnitkarte (Abb. 28).

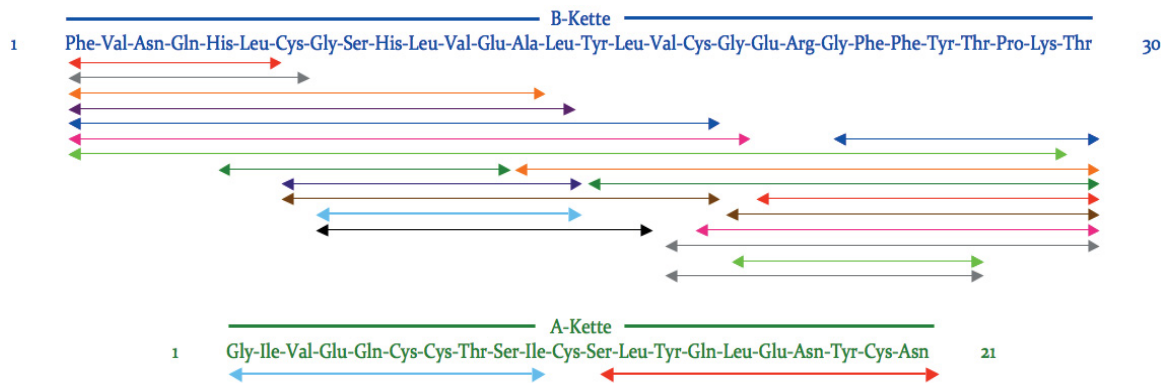


Abb. 28: Schnitkarte des Insulins im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom. Insgesamt konnten 23 Peptidfragmente identifiziert werden: 21 Peptide in der B-Kette des Insulins. 2 Peptide in der A-Kette des Insulins. Die Peptide haben eine Länge zwischen 6 und 29 Aminosäuren. A- und B-Kette des Insulins sind durch unterschiedliche Farben hervorgehoben: blau: B-Kette (30 Aminosäuren), grün: A-Kette (21 Aminosäuren). Die Farben in der rechten Spalte der Tabelle 20 sind identisch mit den im Protein eingezeichneten Pfeilen.

Durch die nachgewiesenen Peptide wurde nahezu die gesamte A- und B-Kette des Insulins wiedergespiegelt (Sequenzabdeckung 98%, Abb. 28). Lediglich das Cys-11 der A-Kette war in keinem der identifizierten Peptide vorhanden. Insgesamt konnten 23 Peptide mit einer Länge zwischen 6 und 29 Aminosäuren nachgewiesen werden.

Eine genauere Analyse der einzelnen Schnittstellen ist in Tabelle 21 zusammengefasst. Hier zeigte sich, dass sich für alle potentiellen Schnittstellen der Trypsin-ähnlichen Aktivität auch entsprechende Fragmente fanden. Hingegen fanden sich für die B-Kette Produkte, die sich jeweils nur auf ca. 25% der potentiellen Schnittstellen der Chymotrypsin- und Caspase-ähnlichen Aktivität zurückführen ließen. Für die A-Kette fanden sich keine durch Verdauung der Chymotrypsin- oder Caspase-ähnlichen Aktivität entstandenen Produkte. Alle identifizierten Schnittstellen in der A-Kette und 8 von 14 (57,1%) der identifizierten Schnittstellen in der B-Kette waren nicht durch eine der drei bekannten Proteasom-Aktivitäten zu erklären und wurden daher als atypisch bezeichnet.

Tabelle 21: Identifizierte Schnittstellen im *in-vitro*-Verdau von Insulin mit 20S Proteasom. Übersicht über die identifizierten Schnittstellen und die zugehörige Proteasom-Aktivität. Die Anzahl der potentiellen Schnittstellen berechnet sich aus der Anzahl der jeweiligen Aminosäuren.

Identifizierte Schnittstellen	Anzahl	Anteil	Potentielle Schnittstellen
<i>Insulin A-Kette</i>			
Caspase-ähnliche Aktivität	0	0,00%	2
Chymotrypsin-ähnlich Aktivität	0	0,00%	4
Trypsin-ähnliche Aktivität	0	0,00%	0
atypische Schnittstellen	2	100,00%	15
Gesamt	2		21
<i>Insulin B-Kette</i>			
Caspase-ähnliche Aktivität	1	7,70%	2
Chymotrypsin-ähnlich Aktivität	4	30,80%	9
Trypsin-ähnliche Aktivität	2	15,40%	2
atypische Schnittstellen	6	46,20%	17
Gesamt	13		30

3.3.2 *In-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin

Am Beispiel von Insulin wurde bereits die Bedeutung der Auflösung höherer Proteinstrukturen für den Verdau durch das 20S Proteasom gezeigt. HSA in seiner 3D-Struktur ist ein komplexeres Molekül als Insulin. Unter Anderem wird das Protein durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert. Um eine etwaige Rückfaltung nach Reduktion des Proteins zu verhindern, wurden die im Anschluss an die Reduktion freiliegenden Cysteine mittels H_2O_2 oxidiert.

3.3.2.1 *Optimierung der Versuchsbedingungen des in-vitro-Verdaus von humanem Serum Albumin*

Vor Durchführung der eigentlichen Verdau Versuche, wurden zunächst natives HSA und mit DTT und H_2O_2 versetztes HSA massenspektrometrisch untersucht. Abb. 29 zeigt das Massenspektrum des nativen HSA in einer Konzentration von 0,05 mM. Es konnte eine Gesamtmasse von 66,564 kDA errechnet werden.

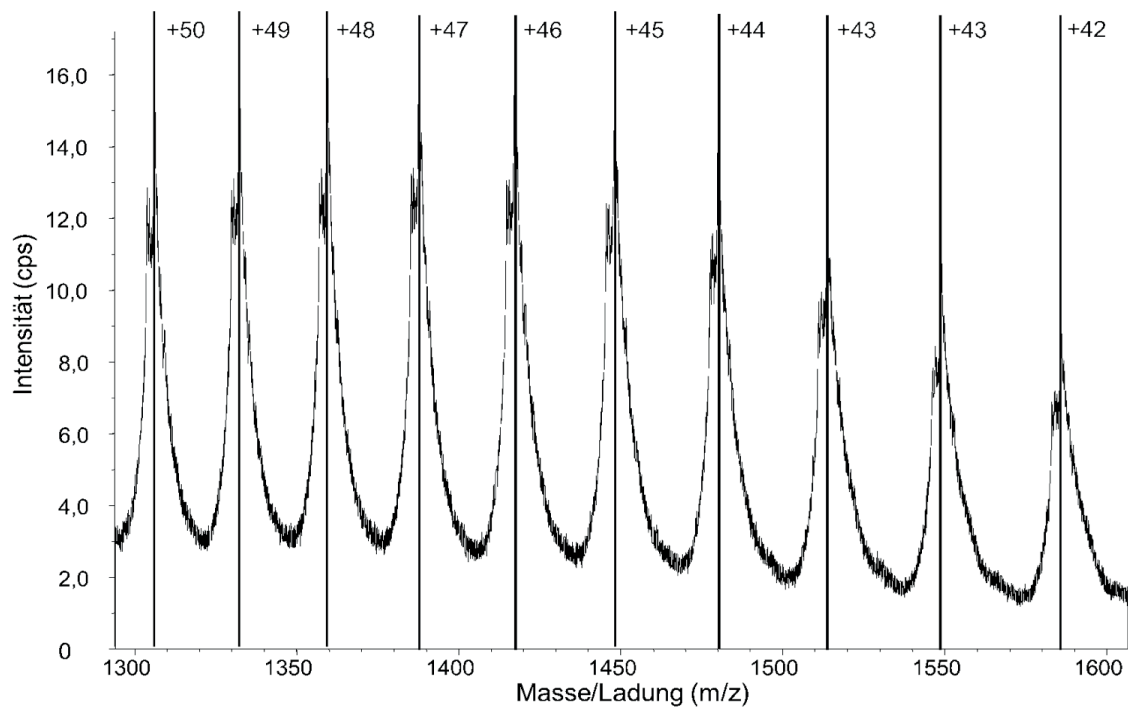


Abb. 29: Massenspektrum von nativem humanem Serum Albumin (HSA). Massenspektrum von nativem HSA mit Angabe der Ladungszustände und Berechnung der Gesamtmasse mit Hilfe der Dekonvolving. Es wurde eine durchschnittliche Gesamtmasse von 66,564 kDa berechnet.

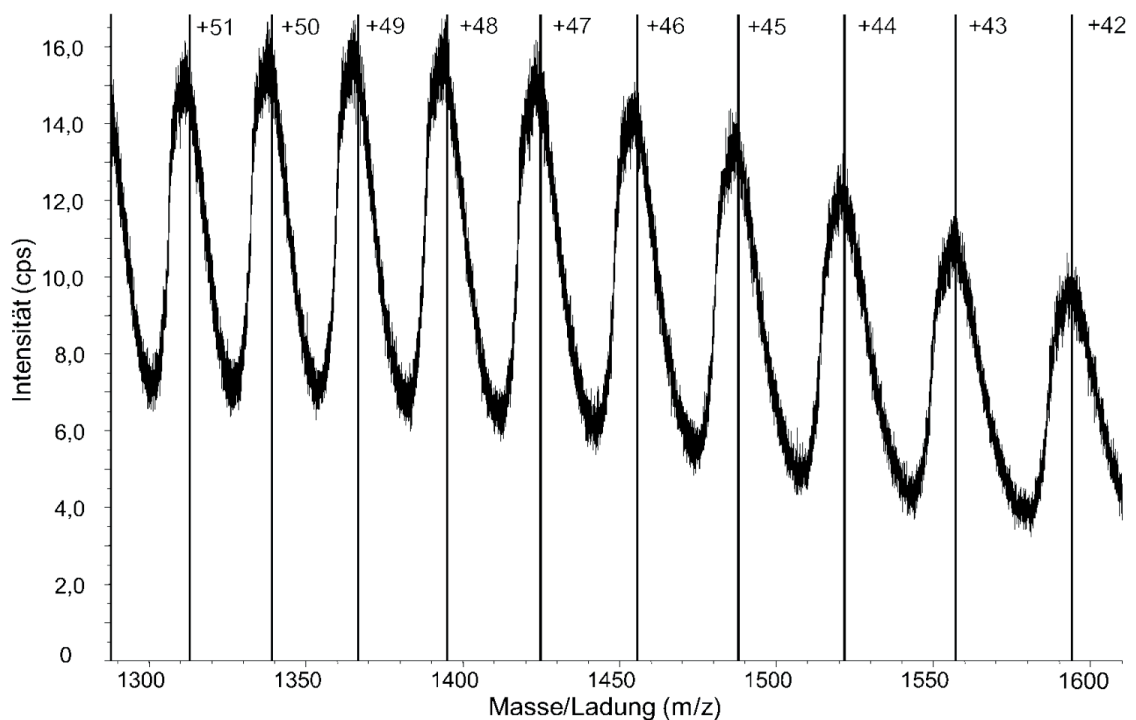
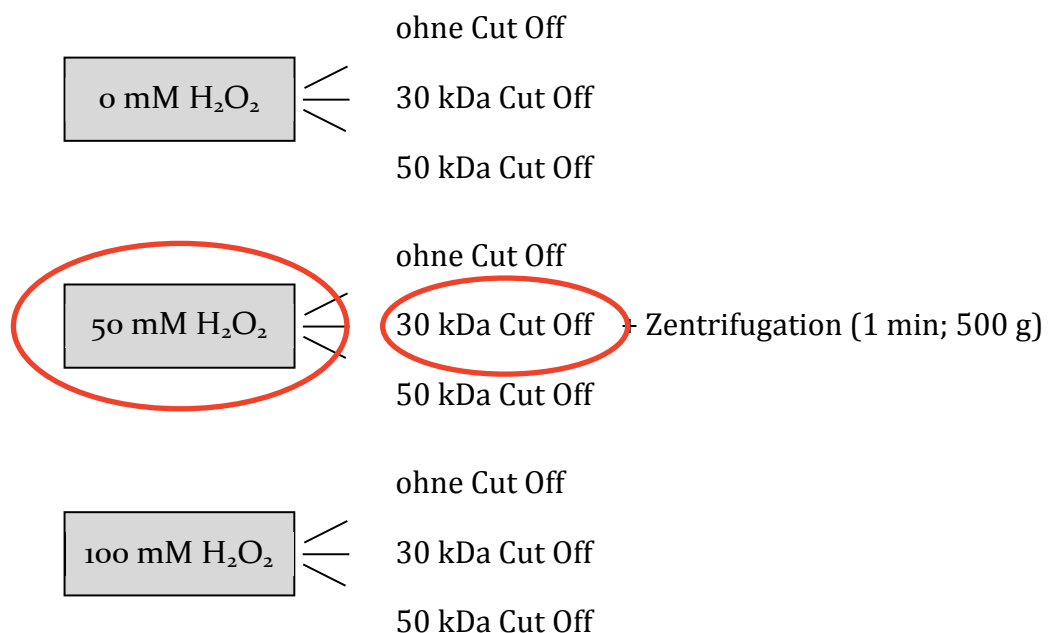


Abb. 30: Massenspektrum von humanem Serum Albumin (HSA) nach Reduktion mittels Dithiothreitol (DTT) und Oxidation mittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Darstellung von HSA im Masse/Ladungs-Bereich (m/z) zwischen 1300 und 1600 mit Angabe der Ladungszustände und Berechnung der Gesamtmasse. Mit Hilfe der Dekonvolving konnte die Gesamtmasse des untersuchten Proteins berechnet werden. Es wurde eine durchschnittliche Gesamtmasse von 66,917 kDa berechnet.

Nach Aufnahme des Massenspektrums des nativen HSA wurden die Disulfidbrücken mittels DTT gespalten, die freien Cysteine mittels H_2O_2 stabilisiert und das so vorbehandelte HSA massenspektrometrisch untersucht (Abb. 30). Im Vergleich zum nativen HSA zeigte sich eine Massenzunahme von 353 Da. Diese Massenzunahme lässt sich – bei einer O_2 -Molekülmasse von 16 Da – durch eine zusätzliche Bindung von 22 O_2 -Molekülen an HSA erklären. In Vorversuchen wurde die optimale H_2O_2 Konzentration (0 mM, 50 mM, 100 mM H_2O_2) ermittelt. Unter der Verwendung von H_2O_2 zeigte sich eine weißliche Trübung der Probe, welche zu einer erschwerten Verarbeitung in der Probenvorbereitung mittels *Stage-Tip* führte. Wahrscheinlich wurde die Trübung durch Präzipitate hervorgerufen, welche vor Aufnahme der Massenspektren aus der Probe entfernt werden sollten. Dies war durch Zentrifugation mit Hilfe einer Tischzentrifuge und Dialyse (*Centrifugal Filters* / Amicon) möglich. Dieses wurde in einem weiteren Vorversuch untersucht: Zunächst wurde die Bedeutung der Dialyse evaluiert. Hierbei wurde bei mit DTT und H_2O_2 versetzten Proben 1. auf die Dialyse verzichtet, 2. eine Dialyse mit einem 30 kDa *Cut Off*-Filter und 3. eine Dialyse mit einem 50 kDa *Cut Off*-Filter durchgeführt. Hierbei konnten nach Dialyse mit *Centrifugal Filters* mit einem *Cut Off*-Wert von 30 kDa die besten Messergebnisse erzielt werden. Die weitere Untersuchung zeigte außerdem, dass eine kurze Zentrifugation essentiell war, um den Niederschlag durch das zugegebene H_2O_2 zu entfernen.



Zusammenfassend konnte das beste massenspektrometrische Signal nach Oxidation mit 50 mM H₂O₂, einer 1-minütigen Zentrifugation (500 g) und einer Dialyse mit 30 kDa *Cut Off*-Filter erzielt werden. Die weiteren Versuche wurden jeweils unter diesen Versuchsbedingungen durchgeführt.

3.3.2.2 Grundlagen des *in-vitro*-Verdaus von humanem Serum Albumin

Für den *in-vitro*-Verdau mittels 20S Proteasom wurde der Ansatz aus HSA, DTT und H₂O₂ in einem in Anlehnung an Verdauversuche an oxidiertem Calmodulin, TRIS-HCl-Puffer vorbereitet (86).

Vor Zugabe des 20S Proteasoms wurde eine Probe mittels MS analysiert. Eine Entsalzung mittels *Stage-Tip* zeigte, dass diese zahlreiche Störsignale verhindert und zu einem eindeutigen Massenspektrum führt. Daher erfolgte eine vorherige *Stage-Tip*-Bearbeitung mit 10 µl Probenvolumen. Nach Inkubation mit 20S Proteasom bei 37 °C wurde der Versuchsansatz auf Verdauprodukte untersucht. Nach 18-stündiger Inkubation konnten sechs Signale erfasst werden. Die identifizierten Peptide sind in Tabelle 22 aufgelistet und in Abbildung 31 als Schnitkarte in die HSA-Aminosäuresequenz eingezeichnet.

Tabelle 22: Identifizierte Aminosäuresequenzen im *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin mit 20S Proteasom.

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäure- sequenz	Enzymatische Aktivitäten	
369,71	2	738,42	247-252	Trypsin/Chymotrypsin	
442,75	2	884,50	421-427	Caspase/Chymotrypsin	
446,27	2	891,54	294-301	*/Caspase	
562,29	2	1123,58	398-406	*/Caspase	
599,36	2	1197,72	421-430	Caspase/*	
787,90	2	1574,80	519-531	Caspase/Chymotrypsin	

Aus den aufgezeichneten Signalen (m/z) und den dazugehörigen Ladungszuständen (z), ließen sich die jeweiligen Massen (m) berechnen. Die Position der jeweiligen Aminosäuresequenzen im Protein gibt Spalte 4 wieder. Spalte 5 zeigt die enzymatische Aktivität, die für den jeweiligen Schnitt verantwortlich gewesen ist: Caspase= Caspase-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Glutamat oder Aspartat, Trypsin= Trypsin-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Arginin oder Lysin, Chymotrypsin= Chymotrypsin-ähnliche Aktivität: Schnitt hinter Leucin, Phenylalanin, Tryptophan oder Tyrosin, * = atypische Aktivität = Schnitt hinter keiner der zuvor genannten Aminosäuren. Farbcode in Spalte 6 entspricht der Darstellung der jeweiligen Aminosäuresequenz in der Schnitkarte (Abb. 31).



Abb. 31: Schnittkarte des humanen Serum Albumin (HSA) im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom. Insgesamt konnten 6 Peptidfragmente identifiziert werden. Die Farben in der rechten Spalte der Tabelle 22 sind identisch mit den in der Aminosäuresequenz eingezeichneten Pfeilen.

Insgesamt konnten sechs Peptide mit insgesamt 46 Aminosäuren als Verdauprodukte identifiziert werden. Das entspricht bei einer Gesamtgröße des HSA von 609 Aminosäuren einer Sequenzabdeckung von nur 7,5%. Im Vergleich zu Insulin zeigte sich also eine deutlich niedrigere Sequenzabdeckung.

Analog zum Insulinversuch wurden an Hand der Schnittstellen der identifizierten HSA-Peptide Rückschlüsse auf die Aktivitäten des 20S Proteasoms gezogen.

Im *in-vitro*-Verdau des HSA war die Caspase-ähnliche Aktivität für die meisten der enzymatischen Schnitte verantwortlich (5 von 12 Schnittstellen). An drei Stellen erfolgte der Verdau durch keine der bekannten Proteasom-Aktivitäten. Bei der Analyse der bereits bekannten Aktivitäten des 20S Proteasoms lagen die durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität bedingten Schnittstellen hinter Phenylalanin. Im Gegensatz zum Insulinverdau fanden sich keine Schnittstellen hinter Leucin. Vier der fünf Schnittstellen der Caspase-ähnlichen Aktivität lagen hinter Glutamat. Die Trypsin-ähnliche Aktivität bedingte im Verdau von HSA Schnittstellen hinter Arginin.

Auch beim Verdau von HSA durch das 20S Proteasom konnten Schnittstellen nachgewiesen werden, die für keine der bekannten Proteasom-Aktivitäten typisch sind. So wurde HSA hinter den Aminosäuren Alanin, Serin und Valin verdaut. Bereits im Insulin *in-vitro*-Verdau zeigten sich Schnittstellen hinter Alanin und Valin.

- Caspase-ähnliche Aktivität: 5 1-mal hinter Aspartat
4-mal hinter Glutamat
- Chymotrypsin-ähnlich Aktivität: 3 0-mal hinter Leucin
3-mal hinter Phenylalanin
0-mal hinter Tryptophan
0-mal hinter Tyrosin
- Trypsin-ähnliche Aktivität: 1 1-mal hinter Arginin
0-mal hinter Lysin
- Atypische Aktivität: 3 1-mal hinter Alanin
1-mal hinter Serin
1-mal hinter Valin

Im Vergleich zum Verdau von Insulin zeigen sich beim HSA Verdau deutlich weniger Schnittstellen und Fragmente. Dies gilt sowohl absolut als auch relativ. (Insulin insgesamt 30 Schnittstellen pro insgesamt 51 Aminosäuren, d.h. 5,9 Schnittstellen pro 10 Aminosäuren; HSA insgesamt 11 Schnittstellen pro 609 Aminosäuren, d.h. 0,18 Schnittstellen pro 10 Aminosäuren)

3.3.2.3 Auswirkungen des Verdaupuffers auf die Verdauprodukte im *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob das verwendete Puffersystem Auswirkungen auf die Oxidation des HSA und den *in-vitro*-Verdau zeigte. Hierfür wurde anstelle des zuvor genutzten TRIS-HCl-Puffers ein TEAD-Puffer verwendet. Massenspektren wurden nach 1 – und 18-stündiger Inkubation angefertigt.

Beide Proben zeigten unabhängig von dem verwendeten Puffer bei der Messung nach 1 Stunde ein in der Intensität und Verteilung sehr gutes HSA-Signal (Abb. 32).

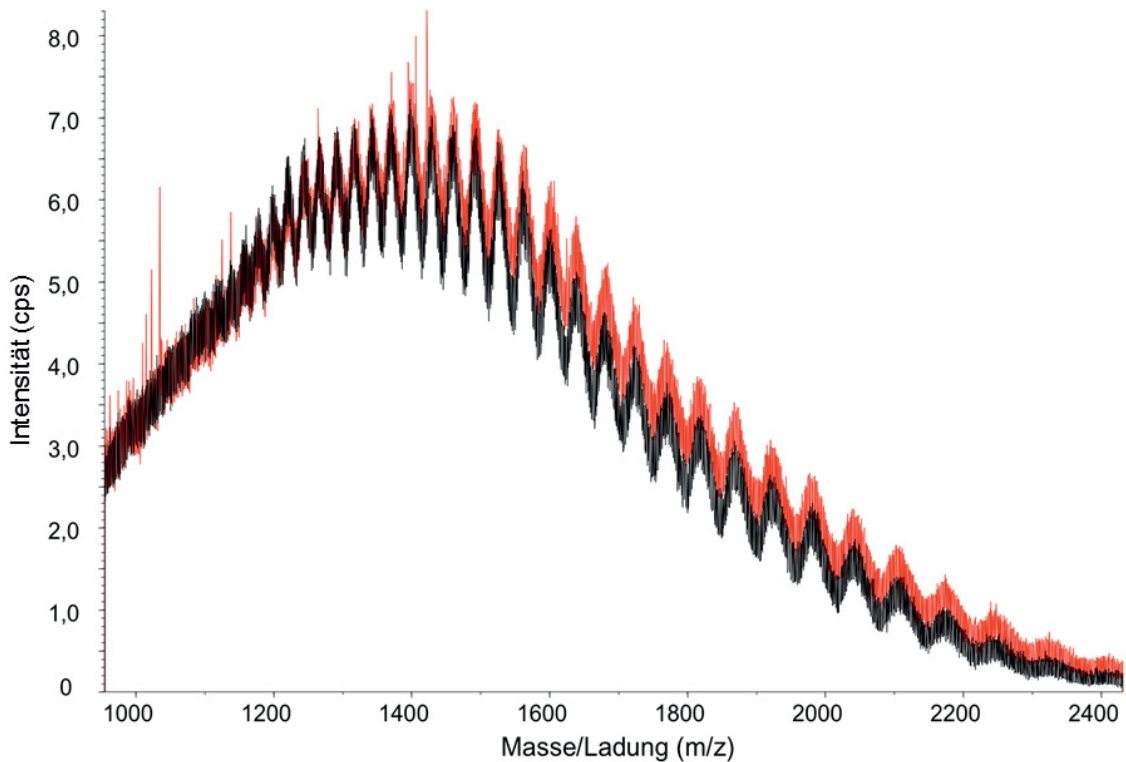


Abb. 32: Auswirkung unterschiedlicher Oxidationspuffer im *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin. Massenspektren von unverdaulichem, oxidiertem HSA in TRIS-HCl-Puffer (roter Graph) und TEAD-Puffer (schwarzer Graph). Berechnungen des Oxidationsstatus zeigten, dass eine Oxidation im TEAD-Puffer wesentlich effizienter verlief (TEAD-Puffer: 45-fach oxidiertes HSA, TRIS-HCl-Puffer: 22-fach oxidiertes HSA).

Um den Oxidationszustand des HSA unter Verwendung des jeweiligen Puffers zu überprüfen, wurde die Gesamtmasse berechnet. Diese betrug bei Oxidation im TEAD-Puffer 67,29 kDa. Das bedeutet, dass HSA in 45-fach oxidiertem Zustand vorlag (Abb. 33). Im TRIS-Puffer konnte HSA nur 22-fach oxidiert werden. In TEAD-Puffer gelöstes HSA wurde somit deutlich höher oxidiert als in TRIS-HCl-Puffer. Interessanterweise mussten neben Cysteinen und Methioninen auch noch andere Aminosäuren oxidiert worden sein, weil nur insgesamt 40 Cysteine und Methionine in der Aminosäuresequenz des HSA vorkommen. Hierfür kommen vor allem Tryptophan und Histidin in Frage.

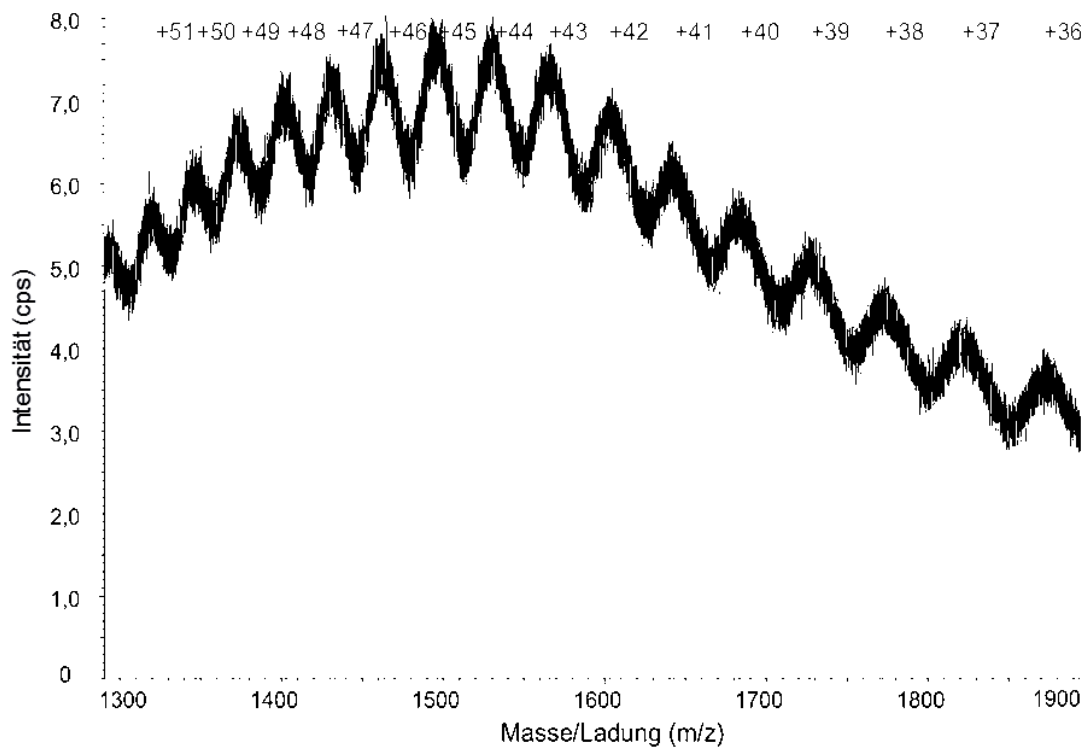


Abb. 33: Oxidationszustand des humanen Serum Albumin (HSA) unter TEAD-Puffer. Die durchschnittliche Masse betrug ca. 67,296 kDa. Aus der Massendifferenz zum nativen HSA berechnete sich, dass HSA in circa 45-fach oxidiertem Zustand vorlag.

Trotz erfolgreicher Oxidation zeigte weder der Versuchsansatz im TEAD-Puffer noch der im TRIS-HCl-Puffer nach 1- und 18-stündiger Inkubation nach Zugabe von 20S Proteasom Verdauensignale des HSA. Nach 18 Stunden ließen sich in beiden Ansätzen keine Verdauungsprodukte, aber immer noch das intakte, oxidierte HSA nachweisen. Die Versuche zu Auswirkungen des Verdauungspuffers erfolgten mit der Proteasom-Charge 5. Es wurde eine gleiche Konzentration an 20S Proteasom verwendet wie im HSA Grundversuch. Da die identifizierten Verdauungsprodukte des HSA aus einem Verdau mittels Proteasom-Charge 4 stammen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Proteasom-Charge 5 trotz nachgewiesener enzymatischer Aktivität im Fluoreszenz-Test nicht in der Lage ist, oxidiertes HSA zu verdauen. Es kann an dieser Stelle also keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Verwendung des TEAD-Puffer oder des TRIS-HCl-Puffers zu einem effizienteren *in-vitro*-Verdau des HSA durch das 20S Proteasom führt.

3.3.3 *In-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A

In allen Zellpellets, die aus BAL-Proben lungengesunder Probanden gewonnen wurden, konnte eine Proteinbande bei ca. 30 kDa identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte nur bei wenigen ARDS-Patienten eine entsprechende Proteinbande nachgewiesen werden. Aus der Bande konnte SP-A massenspektrometrisch identifiziert werden (Abb. 34).

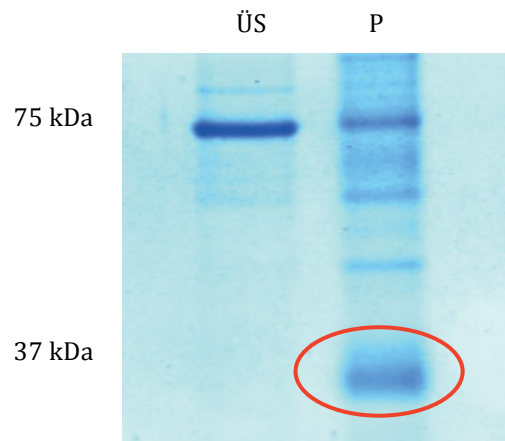


Abb. 34: 1D-Gel einer BAL eines lungengesunden Probanden (Überstand und Pellet). Darstellung der Proteinbande bei ca. 30 kDa im Zellpellet. Die Bande konnte als Surfactant-Protein A (SP-A) identifiziert werden und fand sich in allen Zellpellets der BAL-Proben der lungengesunden Probanden wieder. (ÜS = Überstand, P = Pellet).

Um den Zusammenhang zwischen extrazellulärem 20S Proteasom und SP-A besser zu verstehen und zu untersuchen, ob in ARDS-Patienten SP-A besser verdaut wird bzw. das 20S Proteasom in ARDS-Patienten anders arbeitet als in lungengesunden Probanden wurden auch *in-vitro*-Verdau Versuche mit SP-A und dem 20S Proteasom durchgeführt. Ziel sollte es sein, den Verdau zu charakterisieren, insbesondere in Bezug auf die entstehenden Verdauprodukte und deren Schnittstellen. Zudem sollte untersucht werden, welchen Einfluss die 3D-Struktur des SP-A auf einen *in-vitro*-Verdau des SP-A hat, da das 20S Proteasom i.d.R. nur denaturierte Proteine verdaut.

3.3.3.1 *Optimierung der Versuchsbedingungen des in-vitro-Verdaus von Surfactant-Protein A*

Zunächst wurde untersucht, ob das native SP-A massenspektrometrisch dargestellt werden kann. Das Massenspektrum einer 0,1 mM SP-A-Lösung konnte kaum dargestellt werden, weil das SP-A Signal des in TRIS-HCl-Puffer gelösten SP-A durch die in der Probe vorhandenen Salze überdeckt wurde. Eine Minimierung der Salzkonzentration durch Probenaufreinigung mittels *Stage-Tip* gelang nicht, da SP-A

ein stark hydrophiles Protein ist. Dadurch bindet SP-A nicht an die Entsalzungssäule (*Stage-Tip*) und ließ sich bereits im ersten Waschschrift eluieren. Somit war SP-A neben den Salzen im *Wash* nachweisbar. Das dazugehörige Massenspektrum des *Wash* ist in Abb. 35 dargestellt.

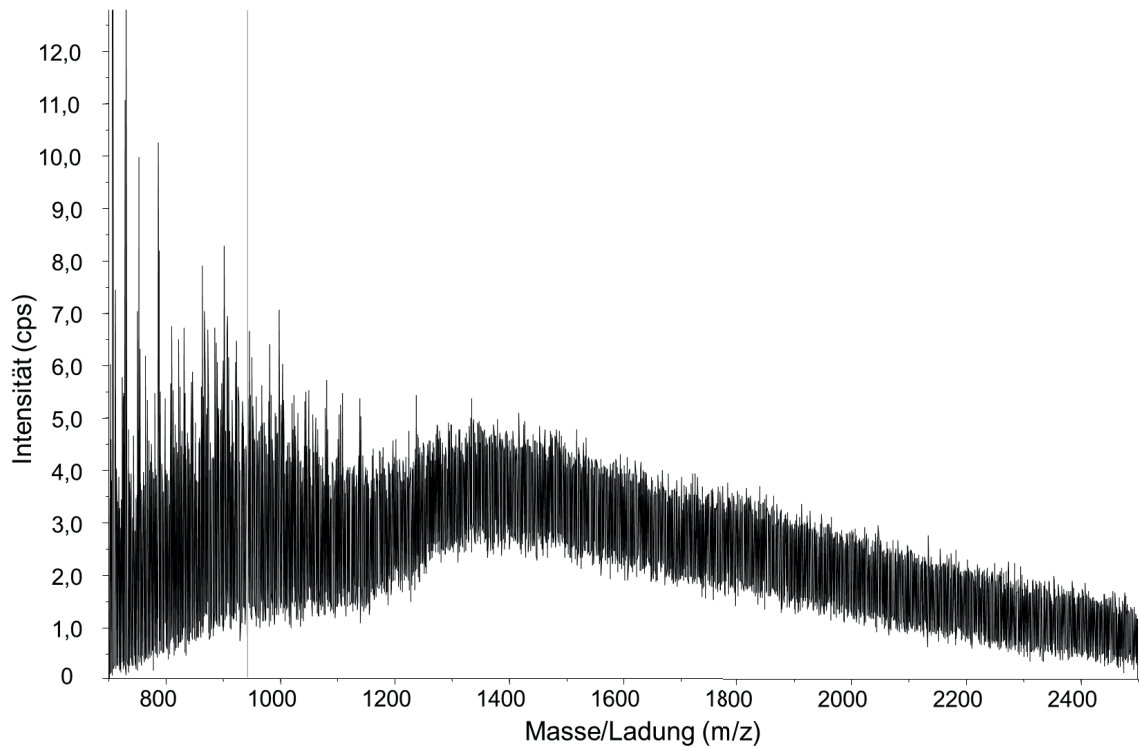


Abb. 35: Massenspektrum von nativen Surfactant-Protein A (SP-A). SP-A ließ sich bereits im ersten Waschschrift eluieren und war somit im *Wash* der Probe enthalten. Hohe Salzkonzentrationen überlagern als Störsignale das eigentliche Massenspektrum.

Um einzelne SP-A1 und SP-A2-Ketten zu erhalten, wurde SP-A zunächst mittels 0,1 M DTT über 30 min bei 56°C reduziert. Die Größe einer SP-A-Kette beträgt ca. 26 kDa. Die einzelnen SP-A-Ketten konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden und durch Probenaufreinigung von den Salzen getrennt werden, so dass das Massenspektrum der einzelnen SP-A-Kette nicht mehr durch Störsignale überdeckt wurde (Abb. 36). Die Massenbestimmung durch Dekonvolierung ergab eine Masse von 26,779 kDa.

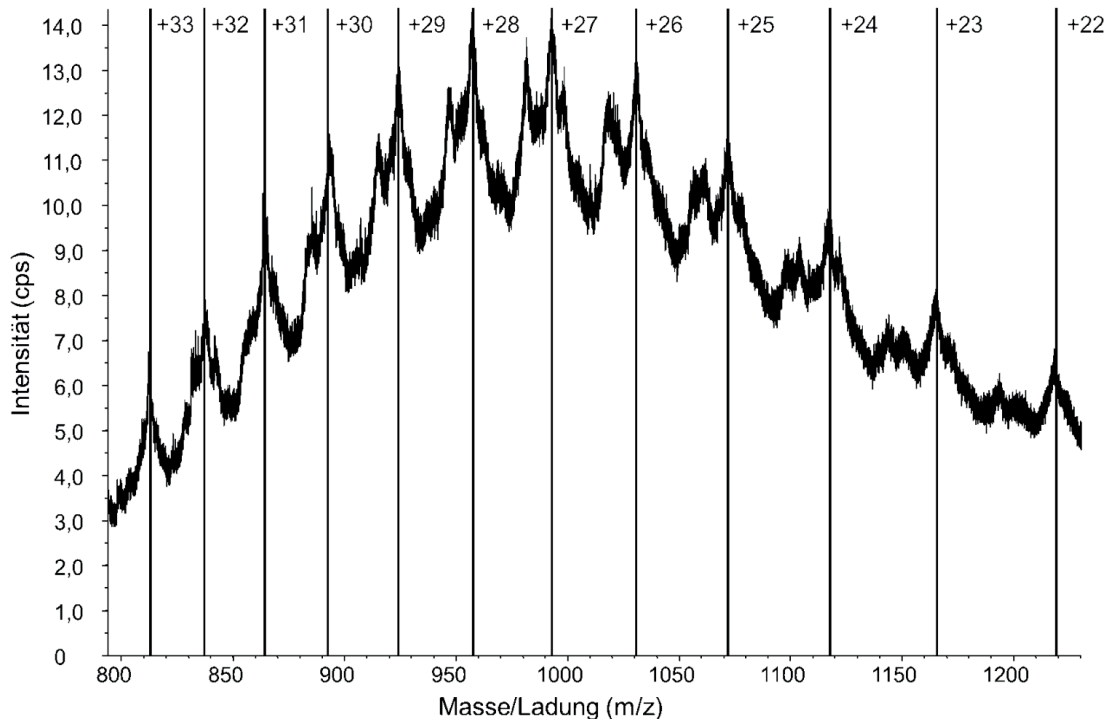


Abb. 36: Massenspektrum von Surfactant-Protein A (SP-A) nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT). Es wurde eine durchschnittliche Gesamt-Masse von 26,779 kDa berechnet.

Im Anschluss an die Reduktion wurden die SP-A-Ketten oxidiert. In Anlehnung an die Verdauprobversuche mit oxidiertem Calmodulin durch Whittier *et al.* wurde wie bereits im HSA-Verdau der TRIS-HCl-Puffer verwendet (86). Unmittelbar vor Zugabe zum SP-A wurde der Oxidationspuffer mit 100 mM H_2O_2 versetzt. Eine anschließende massenspektrometrische Messung konnte kein SP-A-Signal, weder von nicht-oxidiertem noch von oxidiertem SP-A nachweisen. Dieses Ergebnis wurde durch eine Störung der massenspektrometrischen Analyse durch überschüssiges H_2O_2 erklärt. Daher wurde - um die Messergebnisse zu optimieren - das überschüssige H_2O_2 durch Dialyse entfernt. In der im Anschluss durchgeführten Massenspektrometrie konnte das SP-A gut detektiert werden (Abb. 37).

Aus der Massendifferenz von 372 Da zwischen dem reduzierten, jedoch noch nicht-oxidierten und dem oxidierten SP-A konnte berechnet werden, dass 22 O_2 -Moleküle an die SP-A Kette gebunden hatten.

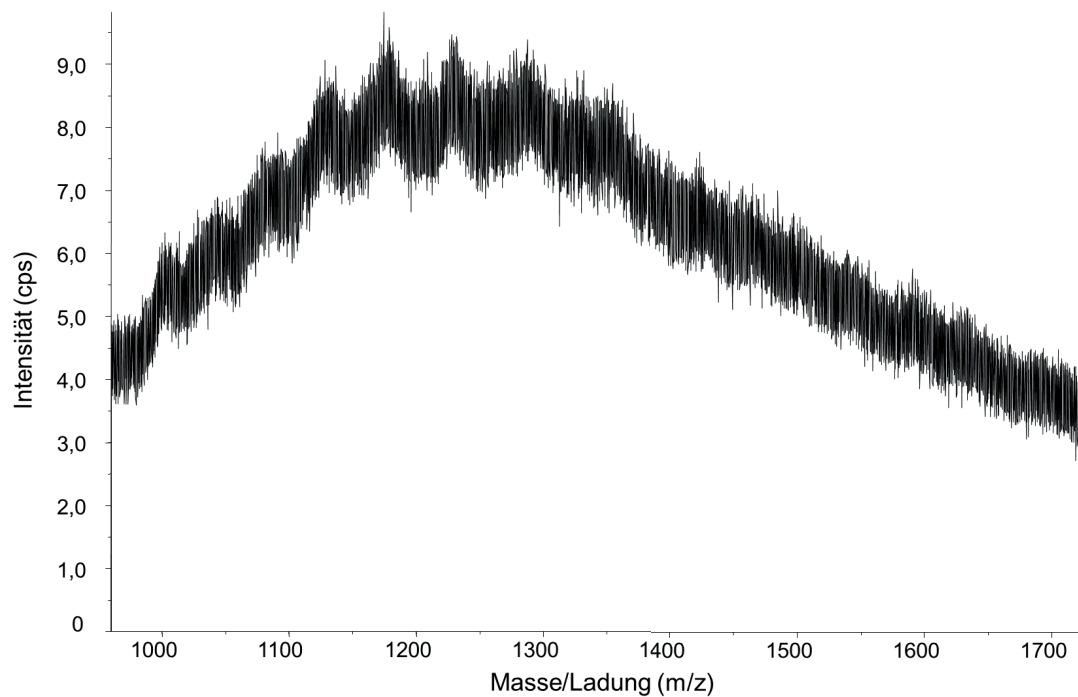


Abb. 37: Massenspektrum von Surfactant-Protein A (SP-A) nach Reduktion und Oxidation. Es wurde eine durchschnittliche Gesamt-Masse von 28,151 kDa berechnet. Aus der Massendifferenz zum reduzierten SP-A (=372 Da) ließ sich errechnen, dass SP-A 22-fach oxidiert wurde.

3.3.3.2 Grundlagen des *in-vitro*-Verdaus von Surfactant-Protein A

Nach erfolgreichem massenspektrometrischen Nachweis von oxidiertem SP-A wurde der *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom durchgeführt. Nach 15- und 24-stündiger Inkubation wurden Übersichtsspektren angefertigt. Für beide Zeitpunkte konnten Verdauprodukte nachgewiesen werden.

Tabelle 23 umfasst alle Verdauprodukte, die nach Zugabe von 20S Proteasom aus dem SP-A identifiziert werden konnten. Insgesamt konnten 35 Peptide als Verdauprodukte bestimmt werden. Das entspricht bei einer Gesamtgröße des SP-A aus 248 Aminosäuren einer Sequenzabdeckung von 52%.

Wie in den zuvor durchgeführten *in-vitro*-Verdau Versuchen wurde auch für SP-A eine Schnitkarte angelegt und die nachgewiesenen Peptide dort eingezeichnet (Abb. 38).

Tabelle 23: Identifizierte Aminosäuresequenzen im *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A mit 20S Proteasom.

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäure- sequenz	Enzymatische Aktivitäten	
426,25	2	851,50	134-141	*/*	
441,24	2	881,48	242-248	*/-	
448,27	2	895,54	115-121	Chymotrypsin/*	
477,56	2	954,12	102-109	*/*	
484,74	2	968,48	241-248	Chymotrypsin/-	
513,82	2	1026,64	173-181	*/Chymotrypsin	
528,26	2	1055,52	140-149	Chymotrypsin/Caspase	
533,30	2	1065,60	112-119	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
355,87	3	1065,61	112-119	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
573,32	2	1145,64	94-104	Caspase/Caspase	
579,30	2	1157,60	113-121	*/*	
584,31	2	1167,62	165-174	*/*	
613,30	2	1225,60	190-200	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
625,34	2	1249,68	122-133	*/*	
635,36	2	1269,72	171-181	Caspase/Chymotrypsin	
423,92	3	1269,76	171-181	Caspase/Chymotrypsin	
637,42	2	1273,84	94-105	Caspase/Caspase	
647,86	2	1294,72	112-121	Chymotrypsin/*	
432,25	3	1294,75	112-121	Chymotrypsin/*	
656,35	2	1311,70	128-139	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
661,27	2	1321,54	229-239	Chymotrypsin/Chymotrypsin	
666,87	2	1332,75	122-134	*/*	
674,35	2	1347,70	122-134	*/*	
715,36	2	1429,72	137-149	Caspase/Caspase	
743,39	2	1485,78	128-141	Chymotrypsin/*	
503,30	3	1507,90	110-121	*/*	
377,72	4	1507,90	110-121	*/*	
758,91	2	1516,82	94-107	Caspase/Chymotrypsin	
506,28	3	1516,84	94-107	Caspase/Chymotrypsin	
767,41	2	1533,82	122-136	*/Caspase	
786,91	2	1572,82	165-178	*/*	
808,36	2	1615,72	227-239	Caspase/Chymotrypsin	
589,62	3	1766,86	154-170	Caspase/Caspase	

858,45	2	1715,90	94-109	Caspase/*	
572,31	3	1715,93	94-109	Caspase/*	
644,03	3	1930,09	94-111	Caspase/Chymotrypsin	
664,35	3	1991,05	165-181	*/Chymotrypsin	
778,01	3	2332,03	128-149	Chymotrypsin/Caspase	
783,67	3	2349,01	227-242	Caspase/Trypsin	
811,49	3	2432,47	219-238	*/*	
812,01	3	2434,03	229-248	Chymotrypsin/-	
802,14	4	3205,56	94-121	Caspase/*	

Aus den aufgezeichneten Signalen (m/z) und den dazugehörigen Ladungszuständen (z), ließen sich die jeweiligen Massen (m) berechnen. Die Position der jeweiligen Aminosäuresequenzen im Protein gibt Spalte 4 wieder. Spalte 5 erklärt die enzymatische Aktivität, die für den jeweiligen Schnitt verantwortlich gewesen war: Caspase = Caspase-ähnliche Aktivität = Schnitt hinter Glutamat oder Aspartat, Trypsin = Trypsin-ähnliche Aktivität = Schnitt hinter Arginin oder Lysin, Chymotrypsin = Chymotrypsin-ähnliche Aktivität = Schnitt hinter Leucin, Phenylalanin, Tryptophan oder Tyrosin * = atypische Aktivität = Schnitt hinter keiner der zuvor genannten Aminosäuren. Farbcode in Spalte 6 entspricht der Darstellung der jeweiligen Aminosäuresequenz in der Schnitkarte (Abb. 38).



Abb. 38: Schnitkarte des Surfactant-Protein A (SP-A) im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom. Insgesamt konnten 35 Peptidfragmente identifiziert werden. Die Farben in der rechten Spalte der Tabelle 23 sind identisch mit den im Protein eingezeichneten Pfeilen.

Die Schnitkarte zeigte, dass Verdauprodukte ausschließlich aus dem mittleren beziehungsweise C-terminalen Ende des Proteins entstanden. Es konnten keine

Verdauprodukte vor der Aminosäure an Position 94 identifiziert werden. Das bedeutet unter Berücksichtigung des Aufbaus des SP-A, dass die nachgewiesenen Verdauprodukte fast ausschließlich aus der „neck“-Region (Aminosäure 101-133), der CRD-Region (Aminosäure 133-248) und zum Teil aus der Kollagen-ähnlichen Region (Aminosäure 28-100) stammen. In diesem Zusammenhang könnte der spezielle Aufbau der Kollagen-ähnlichen Region eine entscheidende Rolle bei der Degradation des Proteins gespielt haben. Ferner fällt auf, dass die Schnittstellen nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern das SP-A hinter bestimmten Aminosäuren (z.B. Glu-93, Thr-121, Val-164 oder Tyr-181) häufiger geschnitten wurde. Betrachtet man die jeweiligen Schnittstellen der im SP-A Verdau entstandenen Peptide, ergaben sich für alle Schnittstellen die folgende Verteilung:

- Caspase-ähnliche Aktivität: 18 4-mal hinter Aspartat
14-mal hinter Glutamat
- Chymotrypsin-ähnlich Aktivität: 21 11-mal hinter Leucin
3-mal hinter Phenylalanin
0-mal hinter Tryptophan
7-mal hinter Tyrosin
- Trypsin-ähnliche Aktivität: 1 1-mal hinter Arginin
0-mal hinter Lysin
- Atypische Aktivität: 27 4-mal hinter Alanin
1-mal hinter Asparagin
1-mal hinter Cystein
2-mal hinter Glycin
1-mal hinter Histidin
1-mal hinter Isoleucin
9-mal hinter Threonin
6-mal hinter Valin
2-mal hinter Serin

Interessanterweise entstanden die meisten Verdauprodukte beim SP-A Verdau durch die atypische proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms, analog zu den Beobachtungen beim Insulin-Verdau. Bei dem SP-A Versuch lag eine noch stärkere Heterogenität der Schnittstellen vor. Insgesamt konnten 27 proteolytische Schnittstellen hinter neun verschiedenen Aminosäuren keiner der bekannten 20S Proteasom Aktivitäten zugeordnet werden. Vergleicht man die Versuche von Insulin und SP-A hinsichtlich der drei bekannten enzymatischen Aktivitäten, ist die Häufigkeit ihres Auftretens in Relation gesehen dieselbe: Chymotrypsin-ähnliche Aktivität > Caspase-ähnliche Aktivität ≥ Trypsin-ähnliche Aktivität.

3.3.3.3 Analyse verschiedener Proteasom-Chargen im in-vitro-Verdau von Surfactant-Protein A

Die zur Verfügung stehenden Proteasom-Chargen wurden aus verschiedenen Proben gepoolt, um eine ausreichende Materialmenge zu erzielen. Da die einzelnen Proben aus unterschiedlichen Probanden stammen, muss man davon ausgehen, dass diese teilweise unterschiedliche proteolytische Aktivitäten aufweisen. Mit Hilfe verschiedener Verdauansätze mit unterschiedlichen Proteasom-Proben sollte diese Annahme untersucht werden. Hierbei ist zu beachten, dass Proteasom-Charge 6 und 7 aus demselben Pool stammen.

Tabelle 23 gibt alle identifizierten Aminosäuresequenzen im SP-A wieder. Zusätzlich wurde untersucht, welche Verdauprodukte durch jeweils welche Proteasom-Charge entstanden und ob die unterschiedlichen Proteasom-Chargen auch gleiche Verdauprodukte generieren können (Tabelle 24).

Tabelle 24: Identifizierte Aminosäuresequenzen des Surfactant-Protein A in Zuordnung zu den jeweiligen Proteasom-Chargen (Charge 5 und Charge 6/7).

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäure- sequenz	Vorkommen Charge 5	Vorkommen Charge 6/7
426,25	2	851,50	134-141	✓	
441,24	2	881,48	242-248		✓
448,27	2	895,54	115-121	✓	✓
477,56	2	954,12	102-109	✓	
484,74	2	968,48	241-248		✓
513,82	2	1026,64	173-181	✓	✓
528,26	2	1055,52	140-149	✓	
533,30	2	1065,60	112-119	✓	✓
355,87	3	1065,61	112-119	✓	✓
573,32	2	1145,64	94-104	✓	✓
579,30	2	1157,60	113-121		✓
584,31	2	1167,62	165-174	✓	
613,30	2	1225,60	190-200	✓	
625,34	2	1249,68	122-133	✓	
635,36	2	1269,72	171-181	✓	✓
423,92	3	1269,76	171-181	✓	✓
637,42	2	1273,84	94-105	✓	✓
647,86	2	1294,72	112-121	✓	✓

432,25	3	1294,75	112-121	✓	✓
656,35	2	1311,70	128-139	✓	
661,27	2	1321,54	229-239	✓	
666,87	2	1332,75	122-134		✓
674,35	2	1347,70	122-134	✓	
715,36	2	1429,72	137-149	✓	
743,39	2	1485,78	128-141	✓	
503,30	3	1507,90	110-121	✓	✓
377,72	4	1507,90	110-121		✓
758,91	2	1516,82	94-107	✓	✓
506,28	3	1516,84	94-107	✓	✓
767,41	2	1533,82	122-136	✓	
786,91	2	1572,82	165-178	✓	✓
808,36	2	1615,72	227-239		✓
589,62	3	1766,86	154-170		✓
858,45	2	1715,90	94-109	✓	
572,31	3	1715,93	94-109	✓	
644,03	3	1930,09	94-111	✓	✓
664,35	3	1991,05	165-181	✓	✓
778,01	3	2332,03	128-149		✓
783,67	3	2349,01	227-242		✓
811,49	3	2432,47	219-238	✓	
812,01	3	2434,03	229-248		✓
802,14	4	3205,56	94-121		✓

Insgesamt konnten 16 der Verdauprodukte sowohl im *in-vitro*-Verdau mit der Charge 5, als auch mit der Charge 6/7 identifiziert werden. 15 Peptide entstanden nur in dem mit der Proteasom-Charge 5 durchgeführten Verdau und 11 Peptide traten nur unter der Proteasom-Charge 6/7 auf. Die Verteilung der Aktivitäten der einzelnen Chargen entsprach der gleichen Verteilung aller Verdauprodukte. Die atypische Aktivität war sowohl für die meisten Schnittstellen unter der Proteasom-Charge 5 als auch unter der Proteasom-Charge 6/7 verantwortlich. Tabelle 25 gibt die Häufigkeiten der enzymatischen Aktivitäten für die jeweiligen Chargen wider.

Tabelle 25: Verteilung der enzymatischen Aktivitäten der jeweiligen Proteasom-Chargen im Surfactant-Protein A *in-vitro*-Verdau.

Aktivität	Proteasom-Charge 5	Proteasom-Charge 6/7
Trypsin-ähnliche Aktivität	0	1
Caspase-ähnliche Aktivität	6	5
Chymotrypsin-ähnliche Aktivität	8	6
Atypische Aktivität	16	8

3.3.3.4 Auswirkungen des Verdaupuffers auf die Verdauprodukte im *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A

Der von Whittier *et al.* übernommene Puffer für die Oxidation von SP-A hat einen pH von 5,0. Der pH-Wert des menschlichen Blutes liegt bei 7,35-7,45. Der Grundversuch des SP-A *in-vitro*-Verdaus konnte zeigen, dass unter Verwendung des Homo-PIPES-Puffers Verdauprodukte entstanden. Im Folgenden wurde untersucht, ob mit einem TRIS-HCl-Puffer mit einem physiologischeren pH-Wert von 7,5 ebenfalls ein Verdau möglich ist oder sogar effizienter verläuft. Hierfür wurde SP-A parallel zum einen in einem Homo-PIPES-Oxidationspuffer mit pH 5,0 und zum anderen in einem TRIS-HCl-Puffer mit pH 7,5 oxidiert und anschließend verdaut. Beide Verdauansätze wurden mit derselben Proteasom Charge und unter denselben Bedingungen durchgeführt.

Bei der Beurteilung im Massenspektrometer wurden die Intensitäten der aufgetretenen Signale miteinander verglichen um rückzuschließen, welche Oxidationsbedingungen für den *in-vitro*-Verdau von SP-A besser geeignet waren.

Der Versuch zeigte, dass oxidiertes SP-A unabhängig vom verwendeten Oxidationspuffer durch das 20S Proteasom verdaut werden konnte. Für beide Versuchsansätze konnten Verdausignale identifiziert werden. Jedoch unterschieden sich die aufgetretenen Signale bei den verwendeten Puffern in ihrer Intensität. Alle nachgewiesenen Peptidfragmente waren nach Oxidation mittels TRIS-HCl-Puffer in höherer Intensität nachweisbar als nach Verwendung des Homo-PIPES-Puffers (beispielhaft für vier Verdauprodukte in Abb. 39).

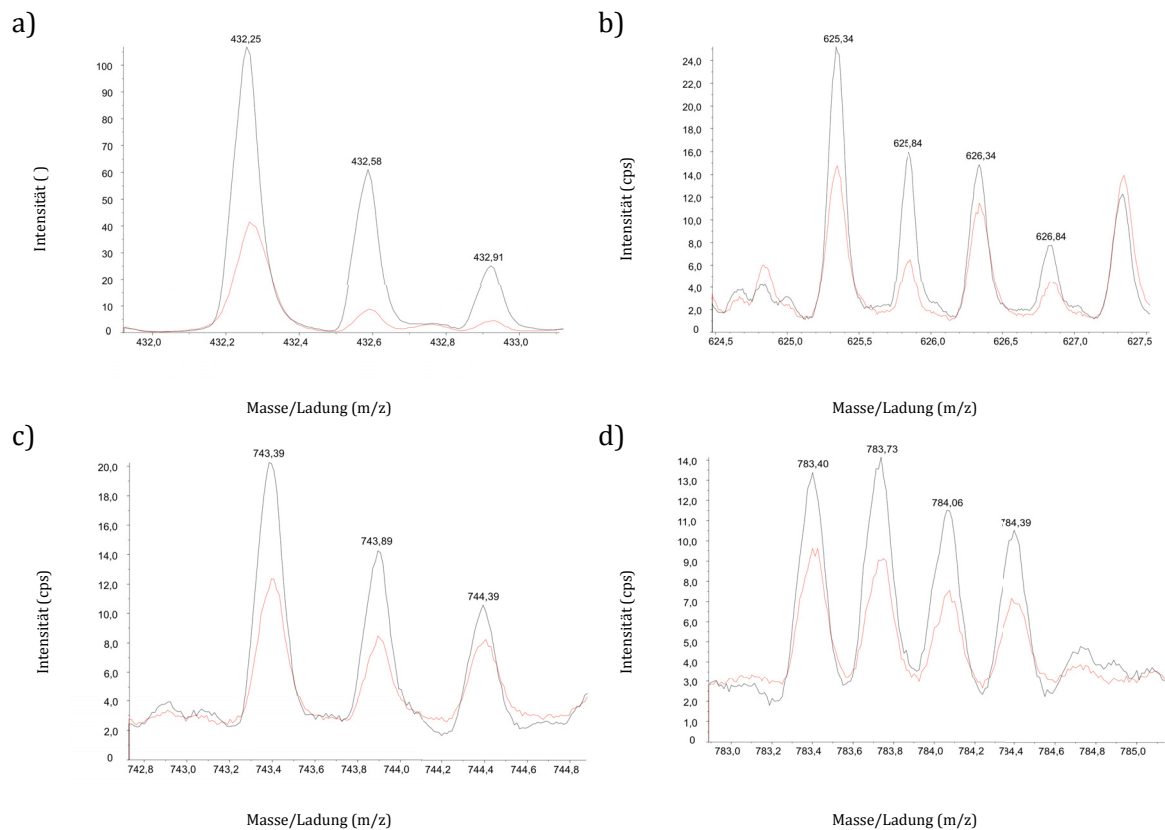


Abb. 39: Vergleich von vier Verdauprodukten nach Oxidation in Homo-PIPES-Puffer (rot) und TRIS-HCl-Puffer (schwarz). a) 2-fach geladenes Ion bei $m/z=432,35$. b) 2-fach geladenes Ion bei $m/z=625,34$. c) 2-fach geladenes Ion bei $m/z=743,39$. d) 3-fach geladenes Ion bei $m/z=783,40$. Das Signal bei $m/z=783,40$ zeigte sich in circa 1,5-fach größerer Intensität bei Oxidation im TRIS-HCl-Puffer. $m/z=625,34$ und $m/z=743,39$ waren unter Verwendung des TRIS-HCl-Puffer etwa doppelt so groß im Vergleich zu den Signalen nach Verdau unter der Verwendung des Homo-PIPES-Puffers. Eine sogar 3-fach höhere Intensität konnte beispielsweise bei $m/z=432,25$ bestimmt werden. cps = counts per seconds

Das Signal bei $m/z=783,40$ zeigte sich in circa 1,5-fach größerer Intensität bei Oxidation in TRIS-HCl-Puffer. $m/z=625,34$ und $m/z=743,39$ waren unter Verwendung des TRIS-HCl-Puffer etwa doppelt so groß im Vergleich zu den Signalen nach Verdau unter der Verwendung des Homo-PIPES-Puffers. Eine sogar 3-fach höhere Intensität wurde beispielsweise bei $m/z=432,25$ bestimmt. Ähnliche Werte wurden auch für die übrigen Verdauprodukte bestimmt. In jedem Fall lag die Intensität der aufgetretenen Signale nach Oxidation in TRIS-HCl-Puffer höher. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass ein Verdau von oxidiertem SP-A unabhängig vom Oxidationspuffer möglich war, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz. Es wurde nachgewiesen, dass TRIS-HCl-Puffer mit einem physiologischen pH-Wert von 7,5 einen deutlich effizienteren SP-A Verdau durch das 20S Proteasom ermöglicht als die Verwendung des Homo-PIPES-Puffers.

3.3.3.5 Kinetik des *in-vitro*-Verdaus von Surfactant-Protein A

Um das Verdauverhalten des 20S Proteasoms über die Zeit näher zu analysieren, wurde die Kinetik des oben beschriebenen SP-A-Verdau Versuches untersucht. Es wurde ein Verdau durchgeführt, in dem die Proben nach 30, 60, 120 min und 20 Stunden untersucht wurden. Ziel war es, zu identifizieren, welche Peptide zu welchem Zeitpunkt auftreten und zu untersuchen, ob kleinere Peptide aus bereits anderen, früher auftretenden Peptiden entstanden. Untersucht wurden alle identifizierten Verdausignale (Tabelle 26).

Tabelle 26: Zeitliches Auftreten der Verdausignale im Surfactant-Protein A *in-vitro*-Verdau durch Proteasom-Charge 5 und Proteasom-Charge 6/7.

Charge	Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	10 min	30 min	60 min	120 min	20 h
5	426,25	2	851,50		✓	✓	✓	✓
6/7	441,24	2	881,48		✓	✓	✓	✓
5	448,27	2	895,54		✓	✓	✓	✓
6/7	448,27	2	895,54				✓	✓
5	477,56	2	954,12		✓	✓	✓	✓
6/7	484,74	2	968,48				✓	✓
5	513,82	2	1026,64		✓	✓	✓	✓
6/7	513,82	2	1026,64				✓	✓
5	528,26	2	1055,52					✓
5	533,30	2	1065,60		✓	✓	✓	✓
6/7	533,30	2	1065,60				✓	✓
5	355,87	3	1065,61				✓	✓
6/7	355,87	3	1065,61					✓
5	573,32	2	1145,64		✓	✓	✓	✓
6/7	573,32	2	1145,64		✓	✓	✓	✓
6/7	579,30	2	1157,60					✓
5	584,31	2	1167,62	✓	✓	✓	✓	✓
5	613,30	2	1225,60		✓	✓	✓	✓
5	625,34	2	1249,68		✓	✓	✓	✓
5	635,36	2	1269,72		✓	✓	✓	✓
6/7	635,36	2	1269,72				✓	✓
5	423,92	3	1269,76		✓	✓	✓	✓
6/7	423,92	3	1269,76				✓	✓

5	637,42	2	1273,84				✓	✓
6/7	637,42	2	1273,84		✓	✓	✓	✓
5	647,86	2	1294,72	✓	✓	✓	✓	✓
6/7	647,86	2	1294,72					✓
5	432,25	3	1294,75	✓	✓	✓	✓	✓
6/7	432,25	3	1294,75		✓	✓	✓	✓
5	656,35	2	1311,70	✓	✓	✓	✓	✓
5	661,27	2	1321,54				✓	✓
6/7	666,87	2	1332,74		✓	✓	✓	✓
5	674,35	2	1347,70		✓	✓	✓	✓
5	715,36	2	1429,72		✓	✓	✓	✓
5	743,39	2	1485,78	✓	✓	✓	✓	✓
5	503,30	3	1507,90		✓	✓	✓	✓
6/7	503,30	3	1507,90		✓	✓	✓	✓
6/7	377,72	4	1508,88					✓
5	758,91	2	1516,82					✓
6/7	758,91	2	1516,82					✓
5	506,28	3	1516,84					✓
6/7	506,28	3	1516,84				✓	✓
5	767,41	2	1533,82		✓	✓	✓	✓
5	786,91	2	1572,82				✓	✓
6/7	786,91	2	1572,82				✓	✓
6/7	808,36	2	1615,72			✓	✓	✓
6/7	589,62	3	1766,86		✓	✓	✓	✓
5	858,45	2	1715,90		✓	✓	✓	✓
5	572,31	3	1714,93		✓	✓	✓	✓
5	644,03	3	1930,09		✓	✓	✓	
6/7	644,03	3	1930,09				✓	✓
5	664,35	3	1991,05		✓	✓	✓	✓
6/7	664,35	3	1991,05		✓	✓	✓	✓
6/7	778,01	3	2332,03		✓	✓	✓	✓
6/7	783,67	3	2349,01		✓	✓	✓	✓
5	811,49	3	2432,47		✓	✓	✓	✓
6/7	812,01	3	2434,03		✓	✓	✓	✓
6/7	802,14	4	3205,56		✓	✓	✓	✓

Die Kinetik des Verdauerverhaltens wurde an den Proteasom-Chargen 5, 6 und 7 untersucht. Proteasom-Charge 4 war bereits in vorherigen Versuchen aufgebraucht worden. In diesem Versuchsansatz sollte analysiert werden, ob sich durch Verwendung verschiedener Proteasom-Chargen zeitliche Unterschiede im Auftreten der Verdauprodukte ergeben.

Die Messungen wurden für alle Proteasom-Chargen nach 30, 60, 120 min und 24 Stunden durchgeführt. Nach 30 min konnten im Verdau mittels Proteasom-Charge 5 24 von 31 Signalen (77,4%) nachgewiesen werden. Hingegen wurden im Verdau mit den Proteasom-Chargen 6 und 7 nur 12 von 27 Verdauprodukten (44,4%) gemessen. Sieben Signale, welche nach 30 min im Verdau durch die Proteasom-Charge 5 messbar waren, wurden in dem Verdau mit den Proteasom-Chargen 6 und 7 nicht identifiziert ($m/z=448,27$, $m/z=513,82$, $m/z=533,30$, $m/z=635,36$, $m/z=423,92$, $m/z=647,86$, $m/z=644,30$). Das Signal bei $m/z=637,42$ wurde mit der Proteasom-Charge 6 und 7 nach 30 min, mit Proteasom-Charge 5 aber erst nach 2 Stunden bestimmt. Im Vergleich dazu konnten nach 1-stündigem Verdau mit Proteasom-Charge 5 keine weiteren Verdauprodukte im Vergleich zur Messung nach 30 min aufgezeichnet werden (24/31). Im Verdau mit Proteasom-Charge 6 und 7 zeigten sich nach 1 Stunde 13/27 Signale. Nach 2- und 20-stündiger Inkubation waren im Verdau durch Proteasom-Charge 5 jeweils 28/31 und 29/31 Signalen messbar. Interessanterweise waren die Signale bei $m/z=674,35$ und $m/z=644,03$ nach 30, 60 und 120 min nachweisbar, in der Messung nach 20 Stunden aber nicht zu identifizieren. Beim Verdau durch die Proteasom-Charge 6 und 7 zeigten sich nach 120 min 22 /27 Signale und nach 20 Stunden alle Verdauprodukte.

Da im Verdauversuch mit Proteasom-Charge 5 bereits nach 30 min insgesamt 77,4% aller Verdauprodukte identifizierbar waren, wurde für diese Charge auch eine Messung nach 10 min angefertigt, um zu überprüfen, ob bereits nach kürzerer Inkubationszeit Signale nachweisbar waren. Nach 10 min konnten bereits 5 der Signale aufgezeichnet werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Degradation der Proteine durch das 20S Proteasom unmittelbar nach Zugabe zum Substrat startete.

In den massenspektrometrischen Analysen wurden neben dem Auftreten der Verdauprodukte auch die Intensitäten der Signale zu den jeweiligen Zeitpunkten

analysiert. Die Massenspektren wurden übereinander gelegt, so dass die Intensitäten gleicher Signale zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen werden konnten. Parallel wurde das Massenspektrum des intakten SP-A aufgezeichnet, um zu untersuchen, ob die Intensität des unverdauten SP-A mit dem Auftreten der Verdauprodukte abnahm. Dieses war der Fall (Abb. 40).

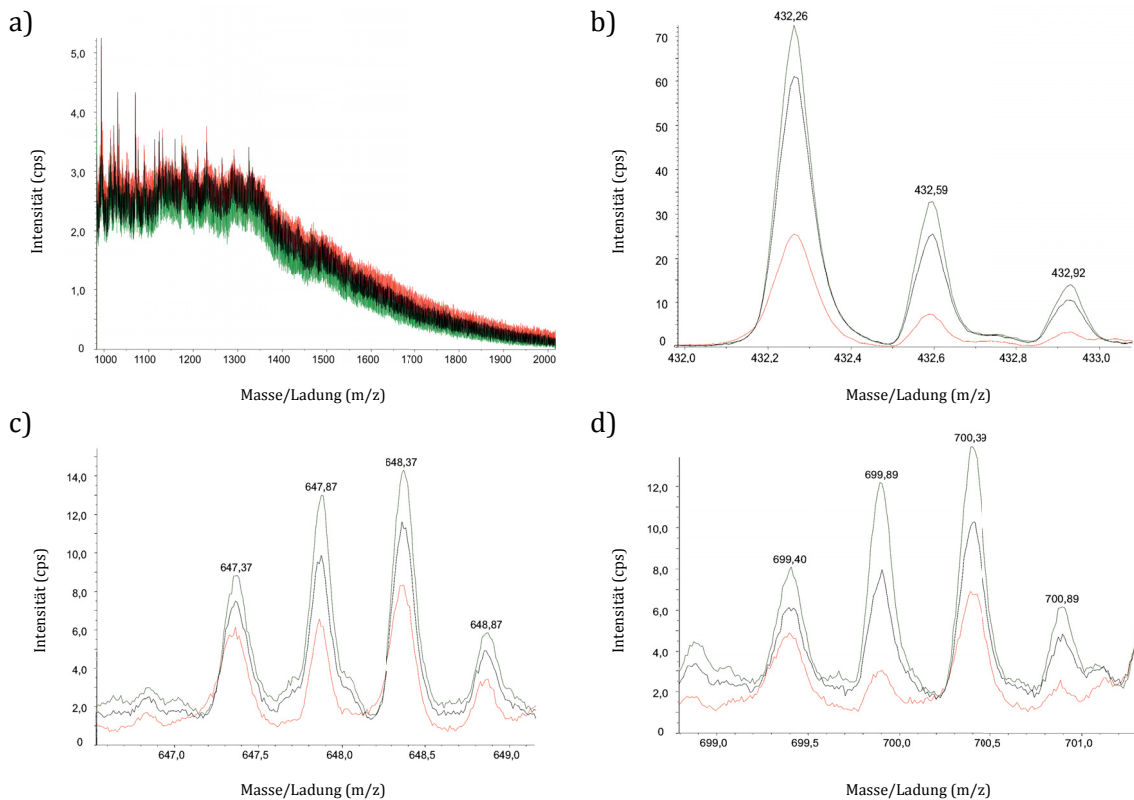


Abb. 40: Massenspektren zur Kinetik des Surfactant-Protein A (SP-A) *in-vitro*-Verdaus nach einer Inkubationszeit von 10 min (rot), 30 min (schwarz) und 60 min (grün). a) Übersichtsspektrum des unverdauten SP-A. Die Intensität des unverdauten SP-A nahm bei längerer Inkubation ab. b-d) Ausgewählte Verdausignale des SP-A-Verdaus bei $m/z = 432,26$, $m/z = 647,37$ und $m/z = 699,40$. Die Signalintensität nahm bei längerer Inkubation zu. cps = counts per seconds

3.3.3.6 Hemmung des *in-vitro*-Verdaus von Surfactant-Protein A durch Epoxomicin

In einem weiteren Versuchsansatz sollte gezeigt werden, dass die zuvor identifizierten Verdauprodukte auch tatsächlich Produkte aus dem *in-vitro*-Verdau durch das 20S Proteasom darstellten. Hierfür wurde der spezifische Proteasom-Inhibitor Epoxomicin verwendet. Zu erwarten war bei Verwendung von Epoxomicin eine Inhibition der katalytischen Untereinheiten des 20S Proteasoms und damit eine Abnahme oder das vollständige Fehlen von den zuvor identifizierten Verdauprodukten. Zunächst wurde 20S Proteasom der Proteasom-Charge 7 mit Epoxomicin für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, in der Annahme, dass das Epoxomicin an

die enzymatischen Untereinheiten des 20S Proteasoms bindet und diese irreversibel hemmt. Anschließend wurde oxidiertes SP-A hinzugegeben. Nach 2- und 20-stündiger Inkubation wurden die Proben mittels *Stage-Tip* entsalzt und massenspektrometrisch analysiert. Tabelle 27 zeigt die gemessenen Intensitäten der Verdausignale.

Tabelle 27: Vergleich der Intensitäten des Epoxomicin-Versuchs mit oxidiertem Surfactant-Protein A nach 2 und 20 Stunden.

(m/z)	Intensitäten nach 2 Stunden [cps]			Intensitäten nach 20 Stunden [cps]		
	ohne Epoxomicin	Epoxomicin [0,1mM]	Epoxomicin [1mM]	ohne Epoxomicin	Epoxomicin [0,1mM]	Epoxomicin [1mM]
441,24	240	70	30	335	135	10
448,27	10	--	--	30	10	--
484,74	50	20	--	150	230	--
513,82	10	--	--	25	10	--
533,30	10	8	--	20	--	--
355,87	--	--	--	100	--	--
573,32	35	50	--	55	100	--
579,30	--	--	--	30	--	--
635,36	20	10	--	50	15	--
423,92	40	--	--	150	20	--
637,42	20	10	--	40	25	--
647,86	--	--	--	50	10	--
432,25	150	15	--	550	30	--
666,87	35	--	--	115	7	--
503,30	50	35	--	60	35	--
377,72	--	--	--	50	--	--
506,28	8	--	--	13	6	--
786,91	10	--	--	20	--	--
808,36	10	--	--	20	--	--
589,62	60	50	--	100	200	--
644,03	--	10	--	60	--	--
664,35	--	50	--	20	--	--
778,01	15	10	--	30	15	--
783,67	25	20	--	15	30	--
812,01	30	20	10	70	60	20
802,14	8	--	--	30	--	--

cps = counts per seconds, m/z = Masse/Ladungs-Verhältnis

Nach 2-stündiger Inkubation waren in dem Grundversuch ohne Epoxomicin 20 der 26 Signale und nach 20 Stunden alle identifizierten Signale nachweisbar.

In Anwesenheit von Epoxomicin waren die Intensitäten der Signale in der Regel abnehmend oder überhaupt nicht identifizierbar. Ausnahmen bildeten die folgenden Verdausignale: $m/z=484,74$, $m/z=573,32$, $m/z=589,62$, $m/z=664,03$ und $m/z=783,68$. Das 2-fach geladene Ion bei $m/z=573,32$ war sowohl in der Messung nach 2 Stunden, als auch bei der Messung nach 20 Stunden nach Zugabe von 0,1 mM Epoxomicin gestiegen. Die Intensität des Signals bei $m/z=664,03$ stieg nur in der Messung nach 2 Stunden und die übrigen drei Signale nur in der Messung nach insgesamt 20 Stunden an. Epoxomicin in geringer Konzentration (0,1 mM) bewirkte jeweils eine Intensitätszunahme. Bei Zugabe von 1 mM Epoxomicin zeigten sich diese Verdauprodukte nicht mehr. Abb. 41 zeigt exemplarisch an einem der Verdauprodukte den Einfluss des Epoxomicins auf die Intensität des Signals in der Messung nach einer 20-stündigen Inkubation.

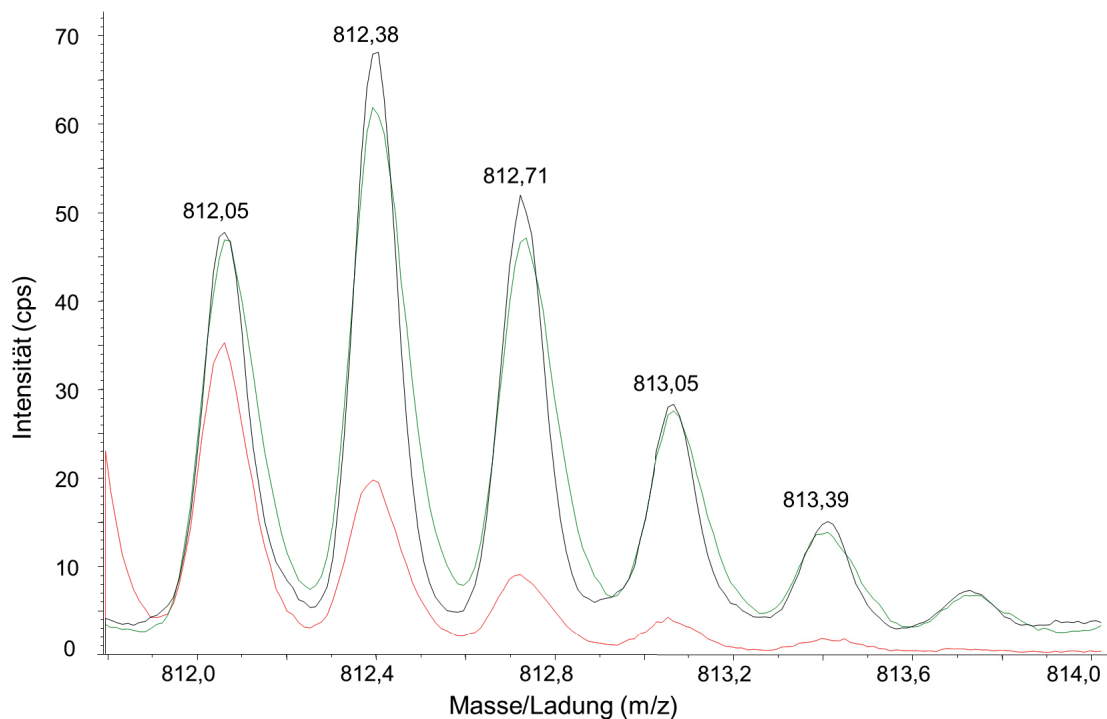
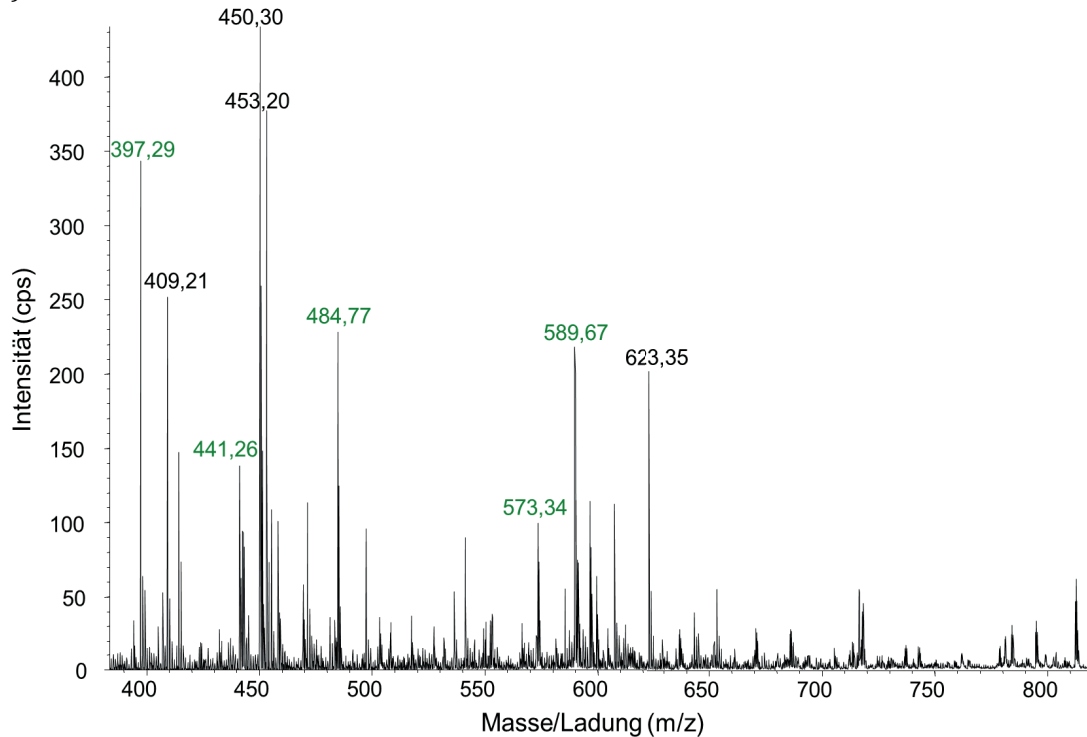


Abb. 41: Massenspektren ausgewählter Signale des Surfactant-Protein A (SP-A) *in-vitro*-Verdaus mit Epoxomicin. Schwarz: Verdau ohne Epoxomicin. Grün: Verdau mit 0,1 mM Epoxomicin. Rot: Verdau mit 1 mM Epoxomicin. 3-fach geladenes Ion bei $m/z=802,05$.

Ein Vergleich der Epoxomicin Signale bei Epoxomicin Konzentrationen von 0,1 mM und 1 mM zeigte, dass Epoxomicin erst ab einer Konzentration von 1 mM in der Probe massenspektrometrisch nachweisbar war (Abb. 42).

a)



b)

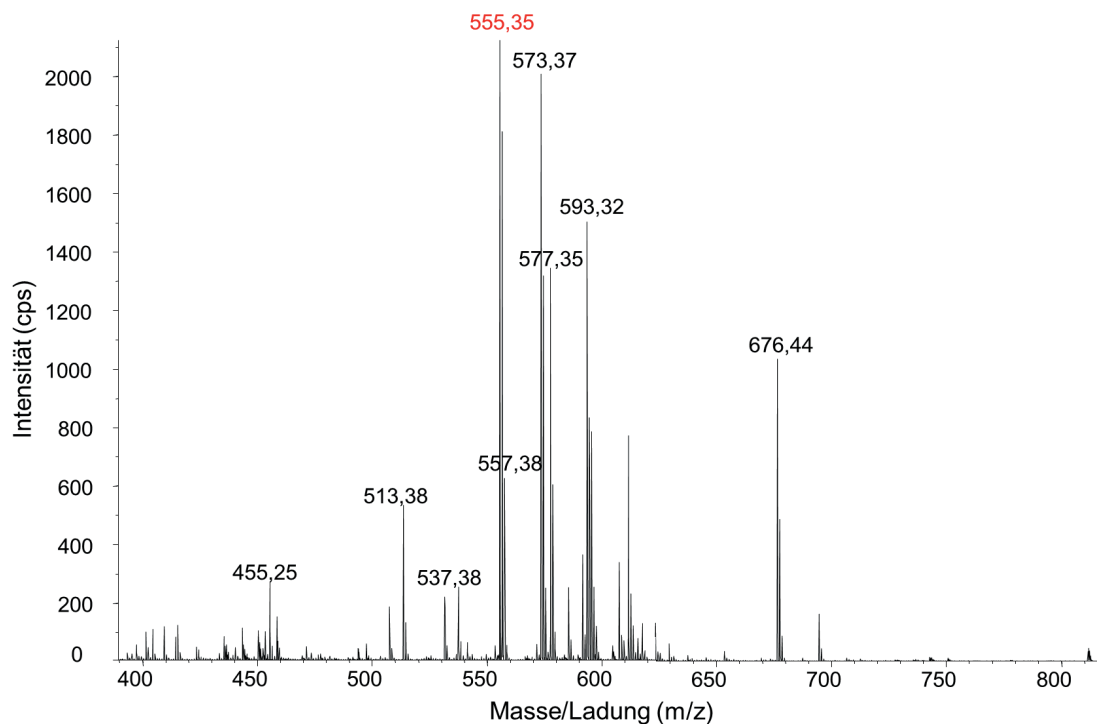


Abb. 42: Vergleich der massenspektrometrischen Signale des Epoxomicin bei unterschiedlichen Konzentrationen. a) Massenspektrum bei 0,1 mM Epoxomicin. Es ist kein Epoxomicin-Signal nachweisbar. Identifizierte Verdausignale sind grün markiert. b) Massenspektrum bei 1 mM Epoxomicin (Epoxomicin-Signal: rot). Es sind keine Verdausignale nachweisbar.

3.3.3.7 *Auswirkungen von Hitzeschockproteinen auf den in-vitro-Verdau von Surfactant-Protein A*

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Hsp 90 auf den Verdau von SP-A wurden zwei unterschiedliche Ansätze mit Hsp 90 gewählt. Außerdem wurde der Grundversuch ohne Hsp 90 durchgeführt, um eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu haben.

Hieraus ergaben sich die folgenden drei Ansätze:

- **Grundversuch:** SP-A, 20S Proteasom, kein Hsp 90
- **Hsp 1:** Vorinkubation von SP-A und Hsp 90
- **Hsp 2:** Vorinkubation 20S Proteasom und Hsp 90

Nach 1-, 5-, und 20-stündiger Inkubation wurden die jeweiligen Ansätze massenspektrometrisch untersucht.

Ein Vergleich der Messungen des Grundversuches ohne Hsp 90 zu den verschiedenen Zeitpunkten, bestätigte den oben beschriebenen Kinetik-Versuch. Die Intensität der Verdauprodukte ohne Zugabe von Hsp 90 nahm mit der Inkubationszeit zu.

Nachdem geprüft wurde, ob Verdausignale in diesem Versuchsansatz nachweisbar waren, wurden die Signalintensitäten nach 1, 5 und 24 Stunden betrachtet (Tabelle 27).

Zusammenfassend ergaben sich für die Vorbehandlung mit Hsp 90 heterogene Ergebnisse: Nach kurzer Inkubationszeit (1 und 5 Stunden) schien Hsp 90 eine deutliche Auswirkung auf die Intensität der identifizierten Verdauprodukte zu haben. Sowohl nach 1 Stunde, als auch nach 5 Stunden wiesen die meisten Signale eine deutlich höhere Intensität auf, wenn das oxidierte SP-A zunächst mittels Hsp 90 vorbehandelt wurde (Versuch Hsp 1). Nach 24-stündiger Inkubation war keine klare Systematik hinsichtlich der Intensitäten zu erkennen. Es gab sowohl Verdauprodukte, die im Grundversuch, als auch Verdauprodukte, die unter dem Ansatz Hsp 1 oder Hsp 2 die höchste Intensität zeigten (Tabelle 28).

Tabelle 28: Vergleich der Intensitäten der Verdauungsprodukte des oxidierten Surfactant-Protein A ohne bzw. mit Zugabe von Hsp nach den Zeitpunkten 1, 5 und 24 Stunden.

Masse/Ladung (m/z)	1 Stunde	5 Stunden	24 Stunden
441,24	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP Ø = HSP 2 > HSP 1
448,27	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 2 > HSP Ø = HSP 1
477,56	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø
484,74	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP Ø > HSP 2 > HSP 1
513,82	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	Keine Signale
533,30	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1	HSP 1 = HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 = HSP 2 = HSP Ø
573,32	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2
579,30	HSP 2 = HSP Ø > HSP 1	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP Ø > HSP 2 > HSP 1
613,30	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1
635,36	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2
637,42	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1	HSP 1 = HSP 2 = HSP Ø	HSP 2 > HSP 1 > HSP Ø
647,86	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2
432,25	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 2 > HSP 1 > HSP Ø
661,27	Keine Signale	HSP Ø > HSP 1 > HSP 2	HSP 1 = HSP 2 = HSP Ø
666,87	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1
503,30	HSP 2 > HSP 1 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 2 > HSP 1 > HSP Ø
786,91	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø
808,36	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2
589,62	nur HSP 1 Signal	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	nur HSP 1 Signal
572,31	HSP 2 > HSP Ø > HSP 1	HSP 1 > HSP 2 > HSP Ø	HSP 1 = HSP 2 = HSP Ø
644,03	nur HSP 1 Signal	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø
664,35	Keine Signale	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø	HSP 2 = HSP 1 > HSP Ø
778,01	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP 2 = HSP Ø
812,01	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP Ø > HSP 1 = HSP 2
802,14	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 > HSP Ø > HSP 2	HSP 1 = HSP 2 = HSP Ø

HSP 1: Vorinkubation mit SP-A und HSP 90 gefolgt von Zugabe von 20S Proteasom, HSP 2: Vorinkubation mit 20S Proteasom und HSP 90 gefolgt von Zugabe von SP-A. HSP Ø : SP-A, 20S Proteasom, kein HSP 90.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Proteinmustern in BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese und die anschließende massenspektrometrische Bestimmung von einzelnen, für lungengesunde Probanden und *ARDS*-Patienten markanten Proteinen. Für solche identifizierten Proteine, von denen eine pathophysiologische Bedeutung für das *ARDS* vermutet wurde, wurde anschließend der *in-vitro*-Verdau durch das 20S Proteasom näher analysiert und die Verdau-Produkte massenspektrometrisch bestimmt. Hierbei sollten insbesondere die Bedeutung von höheren Proteinstrukturen für den Verdau durch das 20S Proteasom als auch die unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms näher analysiert werden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Proteinkonzentrationen als auch die Proteinmuster in BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten unterscheiden. Massenspektrometrisch konnte insbesondere SP-A1 in den BAL-Proben von lungengesunden und zytoplasmatisches Aktin, HSA, Haptoglobin und die Gamma-Kette des humanen Fibrinogens in den BAL-Proben von *ARDS*-Patienten nachgewiesen werden. Zunächst wurde der Verdau von Insulin als einfaches und gut untersuchtes Modellprotein durchgeführt. Weiterhin wurde der Verdau von SP-A und HSA durch das humane 20S Proteasom näher untersucht. Der Verdau dieser Proteine durch das 20S Proteasom ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie einerseits die Verdaubedingungen (wie beispielsweise Inkubationszeit, Pufferzusammensetzung, pH-Wert und die Anwesenheit von „Hilfsproteinen“ wie Chaperone) und andererseits von den zu verdauenden Proteinen (wie Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur, Oxidationszustand). Dabei stellen einige Proteine, wie das Modellprotein Insulin oder SP-A1, geeignete Substrate für den Verdau durch das 20S Proteasom dar, andere Proteine, wie HSA, weniger geeignete Substrate. Ferner konnte gezeigt werden, dass das 20S Proteasom bei dem Verdau der identifizierten Proteine neben den bekannten Aktivitäten (Caspase-, Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) noch weitere atypische Aktivitäten aufweist.

4.1 Limitationen

Die Beurteilung der Versuchsergebnisse erfordert eine Bewertung der technischen Durchführung der hier durchgeführten Experimente und die Kenntnis der Stärken und Schwächen der angewendeten Verfahren:

4.1.1 Technische Limitationen der Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Messung der Proteinkonzentrationen in den gewonnenen BAL-Überständen und -Zellpellets erfolgte photometrisch nach der Methode von Lowry (128). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Messung der Absorption – wie bei allen photometrischen Messverfahren - durch zahlreiche Substanzen beeinflusst werden kann (131). Nichtsdestotrotz ist die Proteinbestimmung nach Lowry ein Standardverfahren zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen und ist hierzu eines der sensitivsten Verfahren (128).

4.1.2 Technische Limitationen der Bestimmung der Proteinzusammensetzung und -identifizierung

Die 1D-Gelelektrophorese und die Chromatografie sind Verfahren, welche die Separation von Proteinen anhand ihrer Größe ermöglichen: Die Proteinzusammensetzung der vorliegenden BAL wurde durch eine 1D-Gelelektrophorese näher untersucht. Vorteil dieses Verfahrens ist die direkte visuelle Darstellung der Proteinbanden durch eine Coomassie-Färbung nach Kang (129). Hierdurch können die erstellten 1D-Gele unmittelbar miteinander verglichen und ein qualitativer Eindruck über die Proteinzusammensetzung der jeweiligen Proben gewonnen werden.

Eine Limitation der 1D-Gelelektrophorese liegt darin, dass sie kein quantitatives Ergebnis sondern allenfalls ein semi-quantitatives Ergebnis liefert. Über die Größe und Intensität einer Proteinbande kann nur im Vergleich zu anderen Gelen (wenn jeweils mit der gleichen Gesamt-Proteinmenge gearbeitet wurde) und anderen Proteinbanden ein relativer Eindruck über die Konzentration dieses Proteins gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit waren insbesondere Unterschiede im Muster größerer Proteine von Interesse, da bei *ARDS*-Patienten gerade diesen Proteinen aufgrund der Größenselektivität der alveolären Barriere eine wichtige pathogenetische Bedeutung zukommt (132). Daher wurde die Gelkonzentration

(11%ig) entsprechend der zu erwartenden Unterschieden im Muster größerer Proteine gewählt. Es wurde bei der 1D-Gelelektrophorese jeweils eine Proteinmenge von 20 µg pro *Lane* aufgetragen. Bei der Betrachtung der 1D-Gele entsteht allerdings der Eindruck, dass nicht alle *Lanes* die gleiche Menge an Gesamtprotein enthalten. Eine unterschiedliche Gesamtkonzentration in den einzelnen *Lanes* wäre denkbar oder die Proteinkonzentration verteilt sich auf eine Vielzahl von Proteinen, so dass die einzelnen Proteine jeweils nur in sehr geringer Konzentration vorliegen und sie somit unter der Nachweisbarkeitsgrenze der Coomassie-Färbung liegen.

Für die weitere Analyse der Proteinbanden wurden ein tryptischer IGV und die MS durchgeführt. Obwohl insgesamt 17 Proteinbanden aus den 1D-Gelen ausgewählt, ausgeschnitten und untersucht wurden, konnten nur 5 von 17 Proteinen identifiziert werden. Hierfür können mehrere Gründe verantwortlich sein: Eventuell waren die Proben für einen Trypsin-Verdau zu hochmolekular. Mögliche Ursachen für einen unzureichenden Proteinverdau durch Trypsin können zum einen eine zu geringe Trypsin-Konzentration und zum anderen fehlende Schnittstellen für Trypsin in dem zu verdauenden Protein gewesen sein. Der proteolytische Schnitt des Trypsin liegt hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Bei eher sauren Proteinen mit wenigen Schnittstellen für Trypsin entstehen keine kurzen Aminosäuresequenzen durch einen tryptischen IGV. Der IGV bleibt dann unvollständig und die anschließende massenspektrometrische Untersuchung ist erschwert bzw. unmöglich.

4.1.3 Limitationen des Fluoreszenz-Enzym-Assays

Bevor Versuche mit dem aus humanen Erythrozyten gewonnenen 20S Proteasom durchgeführt wurden, erfolgte eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität der drei bekannten Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms mit Hilfe eines Fluoreszenz-Enzym-Assays. Für alle Substrate konnte eine enzymatische Aktivität für jede der verwendeten Proteasom-Chargen nachgewiesen werden - wenn auch in unterschiedlich hohem Maße. Die enzymatische Aktivität hängt bekanntermaßen von den Versuchsbedingungen, wie etwa der Temperatur ab, weshalb hier die üblichen Standards (z.B. 37 °C) eingehalten wurden.

Bei den untersuchten Substraten handelte es sich um kurze Aminosäuresequenzen, bestehend aus 4-5 einzelnen Aminosäuren. Im Vergleich zu den im Fluoreszenz-Test eingesetzten Substraten bestehen die in den *in-vitro*-Verdau Versuchen untersuchten

Proteine Insulin, HSA und SP-A aus längeren Aminosäureketten. Der Fluoreszenz-Assay bestätigt zwar, dass das 20S Proteasom in der Lage ist, einen enzymatischen Schnitt hinter bestimmten Aminosäuren zu setzen, allerdings könnten möglicherweise die spezifischen Aminosäureabfolgen der untersuchten Proteine vor und hinter der enzymatischen Schnittstelle Einfluss auf den Verdau an eben dieser Stelle haben. Dies bedeutet, dass in der vorliegenden Arbeit zwar die enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms bestimmt wurde, diese aber für einzelne, spezifische Proteine durchaus unterschiedlich ausfallen kann.

4.1.4 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten

Zur Durchführung der *in-vitro*-Verdau Versuche wurde enzymatisch aktives 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten verwendet. Die Isolierung von 20S Proteasom aus Erythrozyten ist gut etabliert und führt zu einer suffizienten Menge an 20S Proteasom (133). Im Gegensatz dazu ist die Gewinnung und Aufreinigung des 20S Proteasoms aus BAL bisher nicht ausreichend etabliert, obgleich es hier nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte das 20S Proteasom extrazellulär in weiteren Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Liquor oder Sperma, nachgewiesen werden (69,70). Ob sich die enzymatischen Eigenschaften und Substratspezifität des 20S Proteasom in den unterschiedlichen Körperflüssigkeiten unterscheiden, wurde bisher nicht untersucht. Somit lassen sich auch nur eingeschränkte Aussagen darüber treffen, ob das in dieser Arbeit untersuchte Verdauverhalten des h-Ery 20S Proteasoms in Bezug auf die bei ARDS-Patienten und lungengesunden Probanden identifizierten Proteine zu dem Verdauverhalten des 20S Proteasoms im Alveolarraum analog ist.

4.2 Analyse des Verdauverhalten des 20S Proteasoms

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Verdau-Verhalten des 20S Proteasoms anhand des *in-vitro*-Verdaus der identifizierten Proteine HSA und SP-A untersucht. Hierdurch sollten weitere Einblicke in das Verdauverhalten des 20S Proteasom gewonnen und ggf. auch Unterschiede im Verdau von Proteinen mit möglicher pathophysiologischer Bedeutung für das ARDS spezifiziert werden. Dabei wurde insbesondere evaluiert, welche Proteine geeignete Substrate für das 20S Proteasom sind, hinter welchen Aminosäuren das 20S Proteasom Proteine

verdaut, welche Rolle die Verdaubedingungen (verwendete Puffer, pH-Wert, Temperatur, Oxidationsstatus) für den Verdau spielen, welche Abbauprodukte entstehen und wie die kinetischen Abläufe des Verdaus sind.

4.2.1 Substratspezifika des 20S Proteasom Proteinverdaus

Die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen bedingt deren Funktion. Defekte und fehlgefaltete Proteine gelten als Substrate für das Proteasomsystem. Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. untersucht, welchen Einfluss die Sekundär- und Tertiärstruktur von für lungengesunde Probanden bzw. ARDS-Patienten spezifische Proteine für deren Verdau durch das 20S Proteasom hat.

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass Insulin als Modellprotein nur nach vorheriger Spaltung der Disulfidbrücken und der damit einhergehenden Auftrennung des Proteins in seine A- und B-Kette durch das 20S Proteasom verdaut werden kann. Das native Protein wurde hingegen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen durch das 20S Proteasom nicht verdaut (bisher unveröffentlichte Daten). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch SP-A erst nach Auflösung der höheren Proteinstrukturen, in diesem Fall nach Reduktion von Disulfidbrücken und Stabilisierung der aufgelösten Disulfidbrücken mittels Oxidation durch das 20S Proteasom, verdaut werden konnte. Im *in-vitro*-Verdau Versuch des HSA wurde ebenfalls versucht, die Proteinstruktur durch Reduktion und Oxidation zu modifizieren, dass es zu einem Substrat für das 20S Proteasom wird. Dieses gelang jedoch nur bedingt, da der Hauptanteil des HSA unverdaut blieb.

Die Beobachtung, dass die Tertiär- und Sekundärstrukturen eines Proteins eine entscheidende Rolle für einen potentiellen Verdau durch das 20S Proteasom darstellen, wird durch einige vorhergehende Studien unterstützt. Hierbei ist die Degradation eines Proteins durch das 20S Proteasom sowohl von der Aminosäuresequenz als auch von Modifikationen einzelner Aminosäuren abhängig. So ist bspw. der Oxidationsstatus von Calmodulin entscheidend für seine Degradation durch das 20S Proteasom. Oxidiertes – aber kaum natives - Calmodulin wird durch 20S Proteasom verdaut (86,134). Die Oxidation von Methioninresten des Calmodulins kann dabei zur Konformationsänderung des Proteins mit begrenzten unstrukturierten Regionen des Proteins führen, die wiederum Erkennungssequenzen für den Abbau durch das 20S Proteasom darstellen (135,136). Sogar die Oxidation

einzelner Methionin-Reste (z.B. von Met-145) kann zu Änderungen der Tertiärstruktur und zu einem Abbau durch das 20S Proteasom führen (137). Diese Arbeiten liefern einen Einblick in die molekularen Abläufe des Proteinabbaus durch das 20S Proteasom, obwohl schon seit längerer Zeit bekannt ist, dass oxidativ veränderte Proteine durch das 20S Proteasom abgebaut werden können (92,94,95). Oxidation, wie auch andere posttranslationale Proteinmodifikationen, führen zu kurzen ungeordneten Proteinstrukturen, sogenannten *degron*-Sequenzen. Diese Sequenzen werden durch das 20S Proteasom erkannt und als erstes abgebaut (135,138). *Degron*-Sequenzen können durch Adapterproteine, wie Hsp 90, erkannt werden. So kann oxidiertes Calmodulin nur in der Gegenwart von Hsp 90 vom 20S Proteasom abgebaut werden (86). Wahrscheinlich ist eine Proteindegradation durch das 20S Proteasom aber auch ohne solche Adapterproteine möglich (139).

Eine Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß des Verdaus der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine durch das 20S Proteasom können somit ihre unterschiedlichen Sekundär- und Tertiärstrukturen liefern: Insulin ist in seinem Aufbau ein vergleichsweise kurzes und einfach strukturiertes Protein. Aufgrund des einfachen Aufbaus und der Möglichkeit, die Disulfidbrücken mittels Reduktion aufzuspalten, konnte Insulin vollständig durch das 20S Proteasom verdaut werden.

Ein Verdaus von SP-A1 durch das 20S Proteasom ließ sich nur carboxyterminal von Arginin-94 nachweisen, obwohl sich anhand der Primärstruktur weitere aminoterminal gelegene potentielle Schnittstellen identifizieren ließen. Dies ist möglicherweise durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des SP-A1 bedingt: Die Aminosäuren 28 – 100 bilden die Kollagen-ähnliche Region, die Aminosäuren 101 – 133 die sogenannte „*neck*“-Region und die Aminosäuren 133 – 248 die sogenannte CRD-Region. Die nachgewiesenen Schnittstellen des 20S Proteasoms projizieren sich also auf das Ende der Kollagen-ähnlichen Region, die „*neck*“- und die CRD-Region. Die Besonderheit der Kollagen-ähnlichen Region liegt in dem komplexen Aufbau der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen. Die Primärstruktur des Kollagens zeichnet sich durch repetitive Sequenzen von Glycin-X-Y aus (140). Somit ist jede dritte Aminosäure ein Glycin. An Position X ist häufig Prolin zu finden und an Position Y ist hauptsächlich Hydroxyprolin lokalisiert. Zum einen stellt keine dieser drei Aminosäuren eine potentielle Schnittstelle für die bekannten Proteasom-Aktivitäten dar. Zum anderen ist eine solche Besetzung der einzelnen Positionen entscheidend

für die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Bei der Sekundärstruktur handelt es um eine Helix, welche sich für die Tertiärstruktur zu einer Tripelhelix zusammenschließt (141,142). Da Glycin die kleinste Aminosäure darstellt, passt sie sich gut den Windungen der einzelnen Helices ein. Prolin fungiert an Position X aufgrund seiner starren Ringstruktur hier als „Ecke“ in der Polypeptidkette und unterstützt die Ausbildung von engen Windungen innerhalb der Tripelhelix. Das Hydroxyprolin stabilisiert die Tripelhelix über Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polypeptidketten. Durch die Verwendung von Glycin, Prolin und Hydroxyprolin wird die Rotation der Polypeptidkette begrenzt und somit stabilisiert. Hierdurch wird eine extreme Festigkeit gegeben, welche von außen schwer zu durchbrechen ist. Somit ist nachvollziehbar, dass die eingesetzten Reduktions- und Oxidationsmaßnahmen in der Kollagen-ähnlichen Region des SP-A eventuell unzureichend waren, um die Polypeptidkette genügend aufzubrechen und eventuell sogar die oben beschriebenen *degron*-Sequenzen zu generieren, welche einen Verdau durch das 20S Proteasom hätten einleiten können. Insbesondere bleibt es hier fraglich, ob ein solches Protein unter physiologischen Bedingungen dem Verdau durch das 20S Proteasom überhaupt zugänglich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wären weitere Untersuchungen notwendig. Durch die Generierung von rekombinantem SP-A, bei dem einzelne Aminosäuren durch andere so ausgetauscht werden, dass hierdurch die Struktur des SP-A gezielt verändert wird, und einem anschließenden proteasomalen Verdau könnte die Frage geklärt werden, welche Rolle die Struktur von SP-A für den proteasomalen Verdau spielt.

HSA besteht posttranslational aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 609 Aminosäuren. Es liegen 17 Disulfidbrücken und ein freier Cysteinrest im gesamten Molekül vor (143). Die Sekundärstruktur des HSA wird durch 35 α -Helices, elf β -Faltblätter und vier Schleifen bestimmt. Die vorherrschende Sekundärstruktur mit einem Anteil von über 67% ist dabei die α -Helix (144). Bedingt durch diese Strukturen ist Albumin nach außen hin ein stabiles, komplexes Molekül. Im Inneren des HSA stehen freie hydrophobe Taschen zur Bindung verschiedenster Moleküle zur Verfügung. Hierdurch hat HSA eine gute Bindungskapazität für zum Beispiel H_2O , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fettsäuren, Hormone, Bilirubin und Medikamente. Die komplexe Struktur lässt jedoch vermuten, dass HSA möglicherweise einem proteolytischen Abbau nur schwer zugänglich ist. Die durchgeführten *in-vitro*-Verdau Versuche mit

20S Proteasom konnten trotz nachgewiesener Reduktion der Disulfidbrücken und einem hohen Oxidierungsgrad des Moleküls nur eine geringe Anzahl an Verdauprodukten hervorbringen. Gleicht man die nachgewiesenen Verdauprodukte mit der Aminosäuresequenz und den Sekundärstrukturen ab, fällt auf, dass fünf der sechs Verdauprodukte entweder aus Bereichen des HSA stammen, in denen ein Wechsel von Sekundärstrukturen stattfindet oder keine Sekundärstrukturen ausgebildet sind (Abb. 43).



Abb. 43: Relation zwischen den Sekundärstrukturen im HSA-Molekül und den nachgewiesenen Schnittstellen im *in-vitro*-Verdau Versuch. Regionen, in den α -Helices bestehen, sind blau hinterlegt, Regionen in denen β -Faltblätter ausgebildet sind, sind rot hinterlegt und Regionen, in welchen Schleifen liegen, sind gelb markiert.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche zeigen, dass eine vorhergehende Spaltung und Auftrennung von Disulfidbrücken, sowie zumindest eine partielle Degradation von Proteinstrukturen die Voraussetzungen für einen erfolgreichen Verdau durch das 20S Proteasom sind. Ferner legt die genaue Analyse der Schnittstellen und deren Korrelation mit der Proteinstruktur nahe, dass die sekundäre Proteinstruktur auch einen Einfluss auf die Lokalisation der Schnittstellen hat bzw. ein Verdau durch das 20S Proteasom nur in bestimmten Bereichen möglich ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Degradation der untersuchten Proteine durch das 20S Proteasom sind Unterschiede in der Primärstruktur von Proteinen in der Umgebung von potentiellen Schnittstellen. Zwar dient die Schnittstelle dem Proteasom als Erkennungssequenz, jedoch kann die Umgebung der Schnittstelle einen hemmenden oder stimulierenden Einfluss auf 20S Proteasomen haben, das Protein an dieser Schnittstelle zu verdauen (145–148). Möglicherweise

wird die Degradation durch die Zugabe von ATP, Ubiquitin oder eines Adapterproteins, wie etwa eines Hsp begünstigt. Insofern bleibt hier die Frage offen, ob die untersuchten Proteine *in-vivo* durch ATP, Ubiquitin oder Adapterproteine im Umgebungsmilieu ebenfalls unterschiedlich oder ggf. deutlich besser degradiert werden.

4.2.2 Analyse der Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms

Zum Nachweis der Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms eignen sich Peptide, welche an den Aminosäuren, hinter denen die jeweiligen enzymatischen Aktivitäten schneiden, an einen Fluoreszenz-Farbstoff gebunden sind. Solche Fluoreszenz-Farbstoffe wurden in dem Fluoreszenz-Enzym-Assay dieser Arbeit verwendet.

Des Weiteren konnte in den *in-vitro*-Verdau Versuchen sowohl für Insulin, als auch für HSA und SP-A gezeigt werden, dass diese drei Aktivitäten für mindestens je eine Schnittstelle in den jeweiligen Versuchen verantwortlich waren. Somit konnte bestätigt werden, dass alle drei bekannten Enzymaktivitäten nicht nur in einem theoretischen Modell des Fluoreszenz-Enzym-Assays Aktivität aufweisen, sondern am Abbau komplexer Proteine zu Peptiden beteiligt sind. Dies erfolgte jeweils ohne die Zugabe von ATP, Ubiquitin oder eines Adapterproteins, wie etwa eines Hsp. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteindegradation durch das 20S Proteasom über einen Ubiquitin- und Adapterprotein-unabhängigen Mechanismus ohne zusätzliche Energiezufuhr, z.B. durch ATP, zumindest *in-vitro* möglich ist. Verschiedene Studien konnten bereits belegen, dass das 20S Proteasom in der Lage ist, Ubiquitin-unabhängig Proteine abzubauen (89,149–151). Baugh *et al.* konnten nachweisen, dass circa 20% aller intrazellulären Proteine Ubiquitin-unabhängig durch das 20S Proteasom verdaut werden. Im Gegensatz zum UPS arbeitet dieses System frei von Substrat-modifizierenden Proteinen und ohne ATP als Energiequelle. Vielmehr sind sogenannte ungeordnete, zerstörte Proteinregionen zur Substraterkennung durch das 20S Proteasom erforderlich. Aus diesem Grund wurden solche Substrate, welche auch unabhängig von Ubiquitin und ATP als Substrat für das 20S Proteasom erkannt wurden, auch als *intrinsic proteasome substrates* (IPSS) bezeichnet (149).

Interessanterweise traten bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Verdau Experimenten an Insulin, HSA und SP-A zusätzliche Schnittstellen auf, welche nicht durch die Chymotrypsin-, Trypsin- oder Caspase-ähnliche Aktivität erklärt werden

konnten. Da diese Schnittstellen keiner der typischen Enzymaktivität zuzuordnen waren, wurden sie als atypische Schnittstellen bezeichnet und einer sogenannten atypischen Aktivität zugeteilt. Solche atypischen Schnittstellen traten nach den Aminosäuren Alanin und Valin (jeweils für Insulin, SP-A und HSA), Cystein, Glycin, Isoleucin, Threonin (jeweils für Insulin und SP-A), und Serin (jeweils für SP-A und HSA), sowie Glutamin (für Insulin) und Asparagin und Histidin (für SP-A) auf. Interessanterweise traten diese atypischen Verdau-Schnittstellen nicht vereinzelt auf, sondern machten einen signifikanten Anteil der massenspektrometrisch detektierten Schnittstellen aus. Für Insulin waren 16 von 30 Schnittstellen (53,3%), für HSA 3 von 12 Schnittstellen (25%) und für SP-A 27 von 67 Schnittstellen (40,3%) nicht durch die Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche oder Caspase-ähnliche Aktivität erklärbar.

Für diese als atypisch bezeichneten Schnittstellen sind prinzipiell mehrere Erklärungsansätze denkbar: Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel die Verunreinigung der während des Versuches verwendeten Lösungen und Agenzien mit Proteasen. Diese Erklärungsmöglichkeit kann aber nahezu ausgeschlossen werden: So konnten beispielsweise in der Negativkontrolle, die im Rahmen des Insulinversuches durchgeführt wurde, keine Verdauprodukte und somit auch keine atypische Schnittstelle nachgewiesen werden. Ferner traten die atypischen Schnittstellen ebenfalls nicht ohne vorherige Degradation der höheren Proteinstrukturen auf. Des Weiteren waren die Intensitäten der massenspektrometrischen Signale – und somit die Anzahl der Verdauprodukte im SP-A *in-vitro*-Verdau durch das 20S Proteasom – nach Gabe von Epoxomicin, welches als selektiver Inhibitor des 20S Proteasoms angesehen wird, mit Ausnahme von fünf Signalen, deutlich herabgesetzt. Diese fünf Verdauprodukte, die nicht oder nur wenig durch Epoxomicin beeinflusst wurden, stammen unsystematisch verteilt aus der SP-A-Kette und nahezu jede der Schnittstellen kann einer der typischen Aktivitäten zugeordnet werden (Tabelle 29). Interessanterweise war bei fünf der neun proteolytischen Schnittstellen die Caspase-ähnliche Aktivität für die Proteolyse verantwortlich. Untersuchungen mit Epoxomicin als Proteasom-Inhibitor konnten zeigen, dass die Caspase-ähnliche Aktivität eben die ist, die am schwächsten durch diesen Inhibitor gehemmt wird (97). Hingegen wurden alle Schnittstellen bis auf eine, die der atypischen Aktivität zugeordnet wurden, durch Epoxomicin deutlich inhibiert.

Tabelle 29: Identifizierte Aminosäuresequenzen im *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A mit 20S Proteasom, welche nicht durch Epoxomicin inhibiert werden konnten.

Masse/Ladung (m/z)	Ladung (z)	Masse (m)	Aminosäure- sequenz	Enzymatische Aktivitäten
484,74	2	968,48	241-248	Chymotrypsin/-
573,32	2	1145,64	94-104	Caspase/Caspase
589,62	3	1766,86	154-170	Caspase/Caspase
664,35	3	1991,05	165-181	*/Chymotrypsin
783,67	3	2349,01	227-242	Caspase/Trypsin

Zusammengefasst legen diese Beobachtungen nahe, dass die atypischen Schnittstellen nicht durch eine Kontamination mit anderen Proteasen verursacht werden, sondern an die Auflösung der Proteinstrukturen gebunden sind, durch Epoxomicin inhibiert werden und somit wahrscheinlich durch proteolytische Aktivitäten des 20S Proteasom bedingt sind.

Weitere Aktivitäten neben den klassischen wurden bereits seit den frühen 90er Jahren diskutiert: Neben der Trypsin-ähnlichen, Chymotrypsin-ähnlichen und der Caspase-ähnlichen Aktivität wurden hier noch zwei weitere Aktivitäten vermutet. Nach Inaktivierung der klassischen Enzymaktivitäten durch den Serin-Protease-Inhibitor 3,4-dichloroisocoumarin (DCI) spaltet das 20S Proteasom *in-vitro* noch synthetische Modellpeptide (152). Der Abbau bestimmter Proteine scheint sogar beschleunigt zu sein (153,154). Hierfür verantwortlich sind zwei weitere Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms:

Eine wurde als *branched chain amino acid preferring (BrAAP)*, also verzweigt-kettige Aminosäuren bevorzugende Aktivität bezeichnet (152). Diese Aktivität wird für die Spaltung von Leucin-Glycin- und Leucin-Alanin-Bindungen in Modellsubstraten im Rahmen von *in-vitro*-Verdau Versuchen verantwortlich gemacht. Diese Aktivität ist – wie Orlowski und Mitarbeiter hinweisen – dieselbe, die bereits zuvor beschrieben wurde und am Verdau von Neurotensin, Proinsulin und β -Casein durch das Proteasom beteiligt ist (152–154). Insgesamt sind aber nur 10 der insgesamt 47 identifizierten atypischen Schnittstellen (21,3%) in Insulin, HSA und SP-A nach den verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin lokalisiert. Die verzweigt-kettige Aminosäure Leucin dient als Erkennungsmerkmal für die Chymotrypsin-ähnliche

Schnittstelle. Möglicherweise wird diese verzweigt-kettige Aminosäuren bevorzugende Aktivität teilweise von der Caspase-ähnlichen Aktivität vermittelt – wobei beide Aktivitäten konträr zueinander durch ein und denselben Stoff moduliert werden können (155). Neben der *BrAAP* Aktivität wurde auch die *small neutral amino acid preferring (SNAAP)* Aktivität beschrieben, die für Schnittstellen hinter kleinen neutralen Aminosäuren (Alanin und Glycin) verantwortlich ist (152). Diese Schnittstellen haben einen Anteil von 10 Schnittstellen von insgesamt 47 Schnittstellen (21,3%). Die zusätzlichen *BrAAP*- und *SNAAP*-Aktivitäten, neben den drei klassischen enzymatischen Aktivitäten des 20S Proteasoms erklären allerdings auch nur etwa die Hälfte aller identifizierten atypischen Aktivitäten. Auffallend hierbei ist, dass ein großer Anteil der atypischen Schnittstellen hinter den Aminosäuren Threonin (insgesamt 11 Schnittstellen in Insulin und SP-A) und Cystein (insgesamt 10 Schnittstellen in Insulin und SP-A) liegen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass neben den bisher beschriebenen typischen Aktivitäten des 20S Proteasom noch andere atypische Aktivitäten existieren oder dass alternativ atypische Schnittstellen durch den nicht-selektiven Verdau durch die typischen Aktivitäten entstehen. Interessant wären weitere Untersuchungen, bei denen das Verdaumuster des 20S Proteasoms in Abhängigkeit der eingesetzten Proteasomkonzentration untersucht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Enzymkonzentration des 20S Proteasoms bei den *in-vitro* Verdauprobungen nicht variiert. Welche Bedeutung diese atypischen Aktivitäten *in-vivo* unter physiologischen Bedingungen und für die Pathogenese z.B. des ARDS haben, müssen weitere Arbeiten klären.

4.2.3 Einfluss von Adapterproteinen auf den Verdau durch das 20S Proteasom

Der Einfluss des Hitzeschockproteins 90 (Hsp 90) auf den 20S Proteasom abhängigen Verdau von SP-A wurde in zwei Versuchsansätzen näher untersucht: Die Intensitäten der Verdauprodukte des SP-A's waren - verglichen zu einem Versuchsansatz ohne Hsp 90 - nach Vorbehandlung mit Hsp 90 nach 1 und 5 Stunden Verdau durch das 20S Proteasom deutlich höher, wie in der massenspektrometrischen Analyse zu erkennen. Nach 24 Stunden hingegen konnte keine Beeinflussung des Verdaus durch Hsp 90 mehr festgestellt werden.

Ein enges molekulares Zusammenspiel zwischen Hsp 90 und den Proteasomen ist seit Mitte der 90er Jahre bekannt. In einer Untersuchung zur Bedeutung des Proteasoms als Regulator für das Wachstum neuraler Fortsätze wurde Hsp 90 dabei als Inhibitor des Proteasoms identifiziert (156). Das molekulare Zusammenspiel zwischen beiden Proteinen ist allerdings mannigfaltig, komplex und teilweise gegensätzlich: Auf den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verdau von oxidiertem SP-A durch das 20S Proteasom hatte Hsp 90 einen deutlich aktivierenden Einfluss, so dass nach ein und fünf Stunden höhere Intensitäten an SP-A Verdauprodukten nachgewiesen werden konnten. Dieser aktivierende Einfluss von Hsp 90 war nach einer 24-stündigen Inkubationszeit hingegen nicht mehr nachweisbar – möglicherweise, da zu diesem Zeitpunkt bereits ein Großteil der Substrate durch das 20S Proteasom verdaut waren. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit zuvor publizierten Ergebnissen über den Abbau von Calmodulin: An das 20S Proteasom assoziierte Hsp 90 spielt eine entscheidende Rolle im Abbau von oxidiertem Calmodulin (86). Eine signifikante Degradation von oxidiertem Calmodulin ist nur durch an das 20S Proteasom assoziierte Hsp 90 möglich und wird durch Hsp 90 Antagonisten verhindert, wohingegen Hsp 90 nicht den Abbau von korrekt gefalteten Peptiden fördert. Das 20S Proteasom scheint - zumindest teilweise – unter zellulären Bedingungen eng mit Hsp 90 assoziiert zu sein (83,85,157,158). Neben einer direkten Erkennung durch an das 20S Proteasom assoziierte Hsp 90, ist Hsp 90 auch an der Erkennung von fehlgefalteten nicht-zytosolisch lokalisierten Proteinen beteiligt. So bewirkt Hsp 90 eine Dislokation von mutierten Insulinrezeptoren aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol (159). Einige Studien zeigten allerdings auch einen hemmenden Einfluss von Hsp 90 auf den Proteinabbau durch das Proteasom (84,160). Möglicherweise induziert Hsp 90 Konformitätsänderungen des 20S Proteasoms, die bestimmte seiner Enzymaktivitäten betreffen und zu einer Hemmung des Enzyms führen (84). Untersucht wurden hier allerdings auch der Abbau von nicht fehlgefalteten oder speziell oxidierten Proteinen (160). Möglicherweise spielt das Hsp 90 eine wichtige Rolle in der Erkennung von fehlgefalteten oder oxidierten Proteinen bzw. *degron*-Sequenzen im Rahmen der Ubiquitin-unabhängigen Proteindegradation und führt diese dem 20S Proteasom zu. Diese *Degron*-Sequenzen werden in der Folge dann als erste erkannt und abgebaut (135,138,161).

4.3 Die Bedeutung des 20S Proteasom in Bezug auf das *ARDS*

4.3.1 Anstieg der alveolären Proteinkonzentration im *ARDS*

Die vergleichende Quantifizierung der Proteinkonzentrationen in den BAL-Proben der *ARDS*-Patienten und der lungengesunden Probanden ergab signifikante Unterschiede: Diese zeigten sich nach Zentrifugation sowohl in den Zellpellets mit einer 5-fach erhöhten Proteinkonzentration bei *ARDS*-Patienten als auch in den Überständen mit einer 16-fach höheren Proteinkonzentration. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung früherer Arbeiten: Das *ARDS* ist eine Lungenerkrankung, welche bekanntermaßen mit einer Störung der alveolär-kapillaren Membran einhergeht (162). Kommt es in Folge des *ARDS* zum Schaden der alveolären Barriere, können Proteine ungehindert in die Bronchialflüssigkeit gelangen. Folge sind sowohl ein alveoläres und interstitielles proteinreiches Ödem als auch der Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten (111,163). Verschiedene Studien zeigten generell eine deutlich erhöhte Proteinkonzentration (je nach Studie 12- bis zu 79-fach) in Bronchiallavagen von *ARDS*-Patienten (164,165).

Darüber hinaus zeigte sich in unseren Untersuchungen auch, dass die Proteinkonzentrationen der einzelnen *ARDS*-Patienten deutlich variierten und somit eine große interindividuelle Schwankungsbreite aufwiesen. Diese unterschiedlichen Proteinkonzentrationen sind möglicherweise mit einer jeweils unterschiedlichen Ätiologie und Pathophysiologie des *ARDS* als auch mit dessen variabler Ausprägung und Schweregrad assoziiert. Die Variabilität der Proteinkonzentrationen spiegelt dabei die Variabilität der Erkrankung wider.

Die Proben von *ARDS*-Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden nicht zu vorher definierten Zeitpunkten im Krankheitsverlauf gewonnen. Ferner wurden nicht serielle Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf des *ARDS* entnommen. So lassen die Ergebnisse auch keine Rückschlüsse auf die intraindividuelle Schwankungsbreite im Krankheitsverlauf zu. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Proteinkonzentration in der Alveolar-Flüssigkeit bei *ARDS*-Patienten allerdings im zeitlichen Verlauf auch in verschiedenen Phasen der Erkrankung unterschiedlich stark erhöht ist (166).

4.3.2 Vergleichende Analyse der Proteinmuster bei lungengesunden Probanden und ARDS-Patienten

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob sich neben der Proteinkonzentration auch die Proteinzusammensetzung zwischen lungengesunden Probanden und ARDS-Patienten unterscheidet. Eine Proteinauftrennung mit Hilfe einer 1D-Gelelektrophorese zeigte deutliche Unterschiede im Proteinmuster zwischen beiden Gruppen: Zwar zeigten sich in den Zellpellets lungengesunder Probanden deutlich mehr Proteinbanden als in den jeweiligen Überständen, insgesamt war aber das Proteinmuster in den einzelnen Proben sehr homogen, ohne dass sich für einzelne Proben bzw. Patienten spezifische Banden nachweisen ließen. Im Gegensatz dazu konnten in den BAL-Proben von ARDS-Patienten deutlich mehr verschiedene Proteinbanden nachgewiesen werden. Dabei waren nicht nur mehr Proteinbanden nachweisbar, sondern auch im Vergleich zu den Proben lungengesunder Probanden die Variabilität der Proteinmuster zwischen den einzelnen Proben einerseits und zwischen dem Überstand und dem Zellpellet andererseits deutlich größer.

Diese Beobachtung deckt sich mit unserem bisherigen Verständnis der Pathogenese des ARDS: Der Schaden an der alveolären Schranke führt zu einem – wie oben dargestellt – zu einem ungehinderten Übertritt von Proteinen in die Bronchialflüssigkeit. Die Alveolarmembran ist nicht nur eine Schranke für Proteine sondern auch ein größenselektiver Filter für Moleküle. Bei einer Störung der Alveolarmembran treten daher nicht nur mehr Proteine in die Alveolen über, sondern der natürliche Filtermechanismus wird auch empfindlich gestört: In BAL-Proben von lungengesunden Probanden bewirkt der Filtermechanismus, dass nur Moleküle mit geringen Molekülmassen in die Alveolen übertreten (164). In Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass die BAL von ARDS-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Probanden vor allem hochmolekulare Proteine von >200 kDa aufweist (8). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Verlust der Größenselektivität der Alveolarmembran vermutet. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher spezifisch mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese untersucht, ob hochmolekulare Proteine in den BAL von ARDS-Patienten nachweisbar waren: Dabei konnten zahlreiche Proteinbanden im hochmolekularen Bereich in den entsprechenden 1D-Gelen von ARDS-Patienten – nicht aber bei lungengesunden Probanden – nachgewiesen werden.

4.3.3 Identifikation für lungengesunde Probanden und für ARDS-Patienten spezifischer Proteine und deren Verdau durch das 20S Proteasom

In einem weiteren Schritt sollten aus den 1D-Gelen von lungengesunden Probanden und ARDS-Patienten spezifische Proteine identifiziert werden. Dazu wurden für eine Untersuchungsgruppe spezifische Banden aus den Elektrophorese-Gelen ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie näher analysiert. Auf diese Weise konnte SP-A in den BAL-Proben lungengesunder Probanden und HSA, humanes zytoplasmatisches Aktin, die γ -Kette des humanen Fibrinogens und humanes Haptoglobin in den BAL-Proben von ARDS-Patienten nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt wurde der proteasomale Verdau der Proteine SP-A und HSA in *in-vitro*-Verdau Versuchen näher untersucht, um hier etwaige Unterschiede zu identifizieren und ggf. Rückschlüsse auf die dem ARDS-Syndrom typischen Pathomechanismen zu erhalten. Proteine mit einem Molekulargewicht größer 75 kDa konnten keinem *in-vitro* Gelverdau unterzogen werden – obwohl diese Proteine mit eine Molekulargewicht über 200 kDa möglicherweise in der Pathophysiologie des ARDS eine wichtige Rolle spielen (8). Ein *in-vitro* Verdau höhermolekularer Proteine war, wie oben bereits diskutiert, nicht möglich. Die Ursachen für den fehlenden Verdau von höhermolekularen Proteinen in unserem Versuchsaufbau bleibt letztlich nicht abschließend geklärt. Im Grundsatz sind die oben diskutierten Gründe möglich, denkbar wäre aber auch eine Inhibition des Verdaus höhermolekularer Proteine durch einen bisher noch nicht identifizierten Inhibitor in den BAL von ARDS-Patienten. Es konnten bereits verschiedene Inhibitoren von Trypsin, wie α -1-Antitrypsin 1, oder das fibrilläre amyloid Betaprotein nachgewiesen werden (167,168). Nachfolgende Arbeiten könnten zum einen evaluieren, warum höhermolekulare Proteine in unserem Versuchsaufbau nicht verdaut wurden und zum anderen die höhermolekularen Banden in der 1D-Gelelektrophorese von ARDS-Patienten durch andere Verfahren näher charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Verdau-Versuche dieser beiden Proteine SP-A und HSA diskutiert.

4.3.3.1 Humanes Surfactant Protein-A

SP-A konnte als Protein aus den 1D-Gelen der lungengesunden Probanden identifiziert werden. Ein Vergleich mit den 1D-Gelen der ARDS-Patienten zeigte bei der gleichen molekularen Masse keine vergleichbare Bande, so dass hieraus der

Rückschluss erfolgte, dass im *ARDS* wahrscheinlich die Menge an SP-A zumindest deutlich reduziert ist. Dieser Befund ist im Einklang mit Hinweisen darauf, dass ein reduzierter alveolärer SP-A Spiegel eine wichtige Rolle in der Pathogenese des *ARDS* spielt. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die BAL von *ARDS*-Patienten eine reduzierte SP-A-Konzentration aufweist und die Reduktion dieser Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (169–172).

Es existieren mehrere Gründe, welche für Veränderungen des alveolären Surfactant-Systems im Rahmen des *ARDS* verantwortlich sind (173): Die Gesamtkonzentrationen an Phospholipiden, insbesondere an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) und an SP, insbesondere SP-A sind vermindert (169,170). Ein Grund hierfür ist die Ausbildung von hyalinen Membranen beim *ARDS*. Dabei polymerisieren die Phospholipide des Surfactantsystems und werden teilweise in die gebildeten Membranen eingebaut. Die Konzentration an löslichen Phospholipiden, welche die Reduktion der Oberflächenspannung mit bewirken, sinkt (174). Darüber hinaus führen die für das *ARDS* charakteristischen inflammatorischen Mediatoren zu einer Inaktivierung und Zerstörung der Komponenten des Surfactant-Systems. Hieran sind insbesondere Phospholipasen, Proteasen, freie Fettsäuren, aktivierte Granulozyten und freie Radikale beteiligt (175–181). Ferner gelangen durch den Verlust der Größenselektivität der alveolären Barriere Plasmaproteine in den Alveolarraum. Für bestimmte Proteine, wie Albumin, Fibrinogen oder Fibrinmonomere konnten inhibitorische Effekte auf die Funktionen des Surfactantsystems nachgewiesen werden (182–186). Wie bereits oben beschrieben hat SP-A auch die Funktion, die Inaktivierung des Surfactantsystems durch bestimmte Proteine zu mindern (187,188). Darüber hinaus bewirkt SP-A eine Hemmung der LPS-induzierten TNF- α - und Il-1-Produktion in pulmonalen Makrophagen (189). Somit wurde SP-A auch eine wesentliche Rolle in der Limitation einer exzessiven proinflammatorischen Zytokin-Ausschüttung während des *ARDS* zugeschrieben.

Hier stellt sich die Frage, ob das extrazelluläre Proteasom ebenfalls in diesen Pathomechanismus involviert ist. 2009 konnte erstmals extrazellulär, biologisch aktives 20S Proteasom in den Alveolen von *ARDS*-Patienten nachgewiesen werden (72). Über die pathogenetische Relation zwischen dem Proteasomsystem und SP-A beim *ARDS* ist kaum etwas bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane SP-A prinzipiell ein geeignetes Substrat für den Verdau durch das

20S Proteasom darstellt. Hier zeigte sich insbesondere, dass ein *in-vitro*-Verdau nur nach vorheriger Reduktion und Oxidation möglich ist. Interessanterweise ist das ARDS eine Lungenerkrankung, welche mit einer vermehrten Oxidation der alveolären Proteine einhergeht. Dies bedeutet, dass durch das vermehrt oxidative Milieu im ARDS die proteolytischen Eigenschaften des extrazellulären 20S Proteasoms direkt beeinflusst bzw. verändert werden.

Möglicherweise hat aber das Zusammenspiel beider Proteine auf einer anderen Ebene eine weitere Bedeutung in der Pathogenese des ARDS: In Lungenepithelzellen wurde nachgewiesen, dass eine Störung von proteasomalen Signalwegen zu einer reduzierten Thyroidalen Transkriptionsfaktor-1 (TTF-1) Proteinproduktion und zu einer geringeren Proteinexpression von SP führt (190). Ob die Dysfunktion des extrazellulären Proteasoms beim ARDS – zumindest teilweise – auch ursächlich für die niedrigen SP-A Konzentrationen ist, muss noch evaluiert werden.

4.3.3.2 *Humanes Serum Albumin*

Die Banden des HSA konnten in der 1D-Gelelektrophese sowohl bei lungengesunden Probanden als auch in weitaus höherer Quantität bei ARDS-Patienten nachgewiesen werden und das HSA massenspektrometrisch in diesen Banden auch identifiziert werden.

Die – soweit in der 1D-Gelelektrophorese abschätzbar – deutlich höheren Albuminkonzentrationen in den BAL von ARDS-Patienten erscheinen erwartungsgemäß: Durch die funktionelle Schädigung der Blut-/Alveolenschranke mit der alveolär-kapillaren Membran kommt es bekanntermaßen zu einem Übertritt auch hochmolekularer Proteine – wie HSA – vom Blut in die Alveolen. Hier scheint die alveoläre Albuminkonzentration eine besondere Bedeutung, insbesondere zur Abschätzung des alveolär-kapillären Schadens und der damit verbundenen erhöhten alveolär-kapillären Permeabilität, zu haben. Entsprechend viele Arbeiten haben sich damit beschäftigt, zum einen das pulmonal kapilläre Albuminleck zu detektieren und quantifizieren und zum anderen mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren (191–198). Dabei scheint die alveoläre Albuminkonzentration sowohl mit dem alveolär-kapillären Schaden als auch mit dem Schweregrad des ARDS und dem klinischen Ergebnis zu korrelieren (194,195,199,200).

Inwieweit Albumin nicht nur ein diagnostischer Marker für das *ARDS*, sondern auch selbst von pathogenetischer Bedeutung ist, ist hingegen noch nicht geklärt: Das Surfactantsystem der Lunge scheint sensibel auch auf geringe Konzentrationen von HSA zu reagieren, und die strukturelle Surfactant-Lipid-Organisation durch Albumin nachhaltig gestört zu sein (173,182,185,186,201–204). Demnach würde die erhöhte Albuminkonzentration zu einer nachhaltigen Störung der strukturellen Organisation des Lipid-Surfactantsystems und damit zu einer verstärkten pulmonalen Dysfunktion führen.

Die erhöhte Albuminkonzentration wird wahrscheinlich hauptsächlich durch die Störung der alveolär-kapillären Membran und dem damit verbundenen ungehinderten Einfluten von Albumin in die Alveolen verursacht. Möglicherweise spielt hier aber auch die Dysfunktion des extrazellulären Proteasomsystems in den Alveolen eine verstärkende Rolle – auch wenn hier ebenfalls Daten fehlen: Zwar konnten verschiedene Formen des extrazellulären Proteasoms auch in den BAL von *ARDS*-Patienten nachgewiesen werden – und dies im Vergleich zu lungengesunden Probanden in deutlich höheren Konzentrationen, jedoch ist die biologische Aktivität dieser Proteasomen im Vergleich zu lungengesunden Probanden vermindert (72,99). Ferner zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Verdau Versuche, dass HSA im Vergleich zu anderen Proteinen durch das 20S Proteasom kaum proteolytisch verdaut wird – trotz verschiedenster Variationen der Verdaubedingungen. Entsprechend konnten nach dem Verdau von HSA auch nur vergleichsweise wenige Schnittstellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Ergebnissen: Methyliertes und radioaktiv-markiertes I¹²⁵-Albumin wird durch das in BAL Überständen von *ARDS*-Patienten enthaltene Proteasom degradiert (72). Diese Degradation kann durch Epoxomicin inhibiert werden und ist weder Ubiquitin- noch ATP-abhängig. Diese Unterschiede in den Versuchsergebnissen können mehrere Gründe haben: Im Rahmen der Studie von Sixt und *et al.* wurden BAL-Überstände von *ARDS*-Patienten, in dieser Arbeit hingegen aufgereinigtes 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten verwendet (72). Bei *ARDS* können aber in den Alveolen neben dem Standard 20S Proteasom auch Immunoproteasomen nachgewiesen werden, so dass hier ein Gemisch aus verschiedenen Proteasomformen vorliegt (99). Möglicherweise kann HSA durch das Immunoproteasom oder durch *intermediate-type* Proteasom besser

als durch das Standard 20S Proteasom verdaut werden. In der Tat weisen die verschiedenen Proteasomen unterschiedliche Schnittmuster auf (205,206). Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen liegen: Das radioaktiv-markierte I¹²⁵-Albumin in der Studie von Sixt und Mitarbeitern wurde zuvor methyliert. Es wurde somit möglicherweise eher als „defektes“ Protein erkannt und in der Folge degradiert. Dies würde auch die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung unterstreichen, dass die Umgebungsbedingungen (wie pH-Wert, Oxidationsstatus, Adaptarmoleküle etc.) die Proteindegradation durch das 20S Proteasom entscheidend beeinflussen.

Des Weiteren ist unbekannt, wie stark die proteolytische Funktion des 20S Proteasoms im *ARDS* durch die massive inflammatorische Reaktion und den damit einhergehenden Veränderungen wie beispielsweise des pH-Wertes, der freien Ionenkonzentration, der veränderten Konzentration an Botenstoffen ect. beeinflusst wird. Auch hierdurch ist eine verstärkte Dysfunktion des Proteasomsystems wahrscheinlich. Dass veränderte Versuchsbedingungen einen Einfluss auf den Verdau von HSA durch das Proteasom haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Variation des Verdau-Puffers, der Salzkonzentration und des Oxidationsstatus gezeigt werden. Ob die Dysfunktion des extrazellulären Proteasoms und daraus resultierend ein verminderter Abbau von HSA eine pathophysiologische Relevanz im *ARDS* hat, muss in zukünftigen Studien allerdings noch gezeigt werden.

4.3.3.3 Übertragbarkeit des Modells des *in-vitro*-Verdaus durch das 20S Proteasom

Zu überlegen ist, ob und in wie weit die vorliegenden Ergebnisse aus dem *in-vitro*-Verdau auf die *in-vivo*-Bedingungen übertragbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Rahmen des *in-vitro*-Verdaus zu untersuchenden Proteine oxidativ oder reduktiv vorbehandelt, bevor sie einem Verdau durch das 20S Proteasom unterzogen wurden. Im Folgenden wird dargestellt, inwieweit die Versuchsbedingungen das pathophysiologische Milieu in der Alveole widerspiegeln:

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt die Veränderung des alveolären Milieus einen integralen Bestandteil der Pathophysiologie des *ARDS* dar. Die vergleichende Analyse von BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten zeigte, dass durch die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und damit

verbundenem erhöhten oxidativen Stress die Proteine in BAL-Proben oxidativ beschädigt werden (207,208). Eine überschießende Produktion von Oxidantien und eine Verminderung der antioxidativen Kapazitäten – u.a. aufgrund der Inflammation – sind pathognomonisch für das *ARDS* und durch die Studienlage gut belegt (209). Insofern spiegelt das oxidative Milieu in den Versuchsansätzen dieser Arbeit im Grundsatz das oxidative Milieu der Alveole im *ARDS* wider. Allerdings stellt sich die Frage, ob das *in-vitro*-Modell und die Alveole „den gleichen oxidativen Status besitzen“: Diese Frage läßt sich letztlich aber kaum beantworten, da die meisten das *ARDS* untersuchenden Studien zwar ein oxidatives Milieu beschrieben und wichtige Komponenten, wie NOx, reaktive Sauerstoffspezies, biologische Oxidantien wie H₂O₂ oder ONOO⁻, identifiziert aber nicht quantifiziert haben. Verschiedene Marker für eine oxidative Proteinschädigung wurden beschrieben, wie die Bestimmung von Carbonylgruppen, oxidierte Thiol-Gruppen oder Tyrosindimere (210). Aber auch hier ist eine Quantifizierung des oxidativen Stresses schwierig – insbesondere da diese Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden. Somit kann die Frage der Übertragbarkeit unseres Modells auf die pathophysiologischen Bedingungen in der Alveole im *ARDS* nicht abschließend geklärt werden.

4.3.3.4 *ARDS – eine Erkrankung des Proteasomssystems?*

Die genaue Rolle des Proteasomssystems in der Pathogenese des *ARDS* wurde bisher kaum erforscht. Es konnte extrazellulär, biologisch aktives 20S Proteasom in den Alveolen von *ARDS*-Patienten nachgewiesen werden – und zwar in deutlich höher Konzentrationen als bei lungengesunden Probanden oder Patienten mit einer akuten Lungenschädigung (72). Darüber hinaus sind im Extrazellulärraum von *ARDS*-Patienten auch andere Subtypen der Proteasomen bzw. Proteine der Immunoproteasomen nachweisbar, die bei gesunden Probanden nicht detektiert werden können (99): Die Immunoproteasom Untereinheiten β_{1i} und β_{5i} (LMP2 und LMP 7 Protein) konnten sowohl in den Überständen als auch den Zellpellets über verschiedene Nachweismethoden in den BAL von *ARDS*-Patienten – nicht aber bei lungengesunden Probanden – nachgewiesen werden (99). Ob diese im *ARDS* detektierten Untereinheiten den Immunoproteasomen oder den Mischformen aus Standard 20S Proteasom und Immunoproteasom („*intermediate-type*“ Proteasom) zugeordnet werden können, konnte nicht abschließend geklärt werden. Neben den

Immunoproteasom Untereinheiten β_{1i} und β_{5i} wurden allerdings auch in den gleichen Proben die β_1 und β_5 des Standard 20S Proteasoms detektiert (99).

Im Prinzip ist das in BAL-Proben von *ARDS*-Patienten nachgewiesene 20S Proteasom funktionell aktiv - wie Versuche mit spezifischen proteasomalen fluorogenen Substraten, I^{125} -markiertem Albumin und Inhibitionsversuche mit Epoxomicin gezeigt haben. Interessanterweise scheint trotz einer Erhöhung der extrazellulären pulmonalen Proteasomkonzentration die proteasomale Aktivität im Vergleich zu Gesunden deutlich herabgesetzt zu sein (72,99). Ferner ist das Verhältnis der einzelnen Enzymaktivitäten des pulmonalen extrazellulären Proteasoms zueinander bei *ARDS*-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Probanden verschoben (99). Einen Erklärungsansatz für die Verschiebung der Enzymaktivitäten bietet das unterschiedliche Expressionsmuster der Proteasomuntereinheiten im *ARDS* mit der vermehrten Expression von Immunoproteasomuntereinheiten. Verglichen mit dem Standard 20S Proteasom zeigt sowohl das Immunoproteasom als auch das „*intermediate-type*“ Proteasom ein anderes Verhältnis der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander (99,211–215).

Nichtsdestotrotz sind die Ursachen der Aktivitätsverminderung des alveolären Proteasoms im *ARDS* trotz der deutlichen Erhöhung seiner Konzentration nicht abschließend geklärt: Interessanterweise konnte eine effiziente Proteasomaktivität durch stufenweise Aufreinigung oder durch Hitzedenaturierung (90°C, 10 min) der Überstände aus den BAL-Proben von *ARDS*-Patienten wiederhergestellt werden (72). Eine unspezifische Protein-Protein-Interaktion als Ursache für die Aktivitätsverminderung des alveolären Proteasoms im *ARDS* erscheint unwahrscheinlich, da die Zugabe von BSA die proteasomale Aktivität in den Proben lungengesunder Probanden nicht beeinflusst (72). Aus diesem Grund wurde eine spezifische Inhibition der alveolären Proteasoms im *ARDS* durch einen bisher noch nicht identifizierten Inhibitor vermutet (72). Neben einem Inhibitor wäre eine Inaktivierung des Proteasoms durch das alveoläre Milieu im *ARDS* (pH, Oxidationsstatus, etc.) eine weitere Erklärungsmöglichkeit für dessen Dysfunktion.

Möglicherweise ist aber die Pathogenese der Aktivitätsminderung der Proteasomen im *ARDS* noch komplexer. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von zwei in der Pathogenese des *ARDS* wichtigen Proteinen gezeigt werden, dass diese Proteine in *in-*

vitro-Verdau Versuchen, unter den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen, in unterschiedlicher Weise durch das Proteasom degradiert werden: Während SP-A insbesondere nach vorheriger oxidativer Modifikation durch das proteosomale System abgebaut werden kann, ist HSA auch nach verschiedenster Modifikationen in den hier durchgeführten Versuchen kaum dem 20S Proteasom-vermittelten Abbau zugänglich. Dieses Ergebnis ist aus mehreren Gründen interessant und kann nicht alleine durch eine verminderte Aktivität des 20S Proteasoms durch einen unbestimmten, spezifischen Inhibitor in den BAL-Proben von *ARDS*-Patienten erklärt werden, weil eine unspezifische Inhibition des 20S Proteasoms den Abbau von SP-A und HSA gleichermaßen beeinträchtigen würde. Insofern müsste ein spezifischer Inhibitor in den Proben von *ARDS*-Patienten selektiv den Abbau von HSA, aber nicht den Abbau von SP-A blockieren. HSA erscheint als Inhibitor – z.B. im Rahmen einer Protein-Protein-Wechselwirkung – unwahrscheinlich, weil keine Inhibition des alveolären Proteasoms nach Zugabe von BSA zu BAL-Proben lungengesunder Probanden beobachtet werden konnte (72). Eine andere Erklärung für den unterschiedlichen Verdau von HSA und SP-A könnte die unterschiedliche Struktur beider Proteine sein: Eine unterschiedliche Modifikation und Konfiguration von HSA und SP-A im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche erscheint aufgrund der gleichen denaturierenden und oxidativen (Vor-) Behandlung zwar unwahrscheinlich. Allerdings zeigen beide Proteine deutliche Unterschiede in ihren Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen, die durchaus auch Auswirkungen auf die Degradation haben: Für die Degradation scheint dabei nicht nur die einzelne Schnittstelle als vielmehr auch die Aminosäureabfolge der Umgebung von Bedeutung zu sein (44,46,147,148).

Auch wenn die Ursache für den unterschiedlichen Verdau von SP-A und HSA durch das 20S Proteasom hier nicht abschließend geklärt werden kann, sind interessanterweise eine erniedrigte SP-A- und erhöhte HSA- Konzentrationen im *ARDS* pathognomonisch. Zwar ist eine Dysfunktion des proteasomalen Systems sicherlich nicht die hauptsächliche Ursache für diese Änderungen in den alveolären Proteinkonzentrationen, jedoch ist die veränderte Proteasomkonzentration und – Funktion möglicherweise aber sehr wohl eine wichtiger Baustein in der Pathogenese des *ARDS*. Weitere Studien könnten im Folgenden hier einen möglichen Zusammenhang im *ARDS* näher untersuchen.

4.3.3.5 *Schlussfolgerung und Ausblick*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden das humane SP-A1 in den BAL-Proben von lungengesunden Probanden, nicht aber in den BAL-Proben von *ARDS*-Patienten und HSA in den BAL-Proben von *ARDS*-Patienten, nicht aber in den Proben lungengesunder Probanden, identifiziert. Der Verdau dieser beiden Proteine und des Modellproteins Insulin durch das 20S Proteasom wurde in der Folge näher untersucht: Diese Proteine wurden in unterschiedlichem Ausmaß durch das 20S Proteasom unter den angewandten Versuchsbedingungen abgebaut: Insulin und SP-A1 konnten effektiv durch das Proteasom, HSA hingegen kaum degradiert werden. In einem weiteren Schritt wurde exemplarisch die Degradation des Modellproteins Insulin und im Folgenden von SP-A1 und HSA näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese Proteine unterschiedlich stark durch das 20S Proteasom abgebaut werden können: Insulin und SP-A1 konnten zu einem großen Anteil durch das Proteasom, HSA hingegen kaum degradiert werden. Für den Verdau spielten die Versuchsbedingungen, insbesondere die Ionenkonzentration, der Redoxzustand der Proteine, die Aufspaltung höherer Proteinstrukturen, wie beispielsweise auch die Aufspaltung von Disulfidbrücken, eine entscheidende Rolle. Auch Hilfsproteine wie Chaperone (Hsp 90) und das Substrat-Enzym-Verhältnis hatten einen großen Einfluss auf die Proteindegradation durch das 20S Proteasom. Ferner konnten neben den beschriebenen klassischen drei Enzymaktivitäten noch weitere atypische nachgewiesen werden.

Diese Einblicke in die Funktionsweise des 20S Proteasoms und die Pathogenese des *ARDS* werfen allerdings auch weitere Fragen auf, die zum einen die Funktionsweise des Proteasoms, zum anderen die Pathogenese des *ARDS* und die Verknüpfung beider Aspekte betreffen:

Trotz Fortschritten in den vergangenen Jahren bleibt die exakte Funktionsweise des 20S Proteasoms unklar: Weitere Studien könnten die Rolle der hier detektierten atypischen Aktivität und insbesondere die Frage evaluieren, ob sie sich unter anderen Versuchsbedingungen ebenfalls nachweisen lässt und welche Rolle sie *in-vivo* spielt. Ferner bleibt die Frage, warum die hier untersuchten Substrate trotz Optimierung der Versuchsbedingungen (pH, Ionenkonzentration, Redoxzustand) unterschiedlich durch das 20S Proteasom abgebaut werden. Eine mögliche Erklärung liegt hier in Unterschieden in den Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen der jeweiligen

Proteine. Möglicherweise spielen hier nicht nur die jeweiligen Erkennungssequenzen in der Primärstruktur sondern auch deren Umgebung eine wichtige Rolle. Weitere Studien könnten hier weitere Einblicke in die Funktionsweise des 20S Proteasoms geben: Diese potentiellen zukünftigen Studien könnten untersuchen, ob systematische Modifikationen der Primärstruktur in der Umgebung von gleichen Schnittstellen einen Einfluss auf den proteosomalen Verdau haben. Ferner könnte man die enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms in einem gegebenen Protein (z.B. HSA) an einer definierten Schnittstelle und in der Folge in unterschiedlichen Fragmenten dieses Proteins mit jener definierten Schnittstelle untersuchen.

Die Pathogenese des *ARDS* ist bis heute nicht abschließend verstanden: Möglicherweise geben diese Ergebnisse einen Einblick in die Funktionsweise des Proteasoms und in die Pathogenese: Wie bereits zuvor beschrieben, ist zwar die Konzentration des extrazellulären Proteasoms erhöht, aber seine Funktion gestört. Möglicherweise werden alveoläre Proteine unterschiedlich gut abgebaut, nämlich SP-A1 gut und HSA kaum. Dies führt u.a. zu einer Erhöhung der alveolären HSA Konzentration, die die strukturelle Surfactant-Lipid-Organisation nachhaltig stört und somit zu einer verstärkten pulmonalen Dysfunktion führt (173,182,185,186,201–204). Andererseits würde eine Erniedrigung von SP-A1 durch die gute proteasomale Degradation ebenfalls zu einer Inaktivierung des Surfactantsystems führen (187,188) und durch die fehlende Limitation einer inflammatorischen Antwort – z.B. im Rahmen einer SP-A-induzierten Hemmung der LPS-vermittelten TNF- α - und Il-1 Produktion – zu einer exzessiven proinflammatorischen Zytokinausschüttung im Rahmen des *ARDS*. Ob diese hypothetischen Mechanismen *in vivo* ablaufen, muss in weiteren Studien geklärt werden. Ferner konnte der von Sixt und Mitarbeitern postulierte alveoläre Inhibitor des Proteasoms bisher nicht identifiziert werden. Weitere Studien könnten hier die genauen Mechanismen im *ARDS* untersuchen. Ein Erklärungsansatz für die Dysfunktion des extrazellulären Proteasoms im *ARDS* ist dessen Inhibition durch das alveoläre Milieu. Dies könnte in kommenden Studien untersucht werden. Es bleibt auch unklar, ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Mechanismen des Proteinverdaus durch das 20S Proteasom auf das Immunoproteasom, welches extrazellulär im *ARDS* ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, übertragen werden kann. Einblicke in die molekularen und zellulären Mechanismen einer Erkrankung erweitern im optimalen Fall aber nicht nur unseren

Kenntnisstand, sondern bieten auch neue Therapieoptionen und verbessern somit die Prognose der Erkrankung – wie jüngst u.a. die Zulassung von Proteasom-Inhibitoren in der Krebstherapie zeigt. Eine Erhöhung der alveolären SP-A Konzentration im ARDS durch exogene Zufuhr wurde bereits in diversen Studien untersucht: Obwohl in unterschiedlichen kleineren Studien und in pädiatrischen Patientenkollektiven vorteilhaft, zeigten größere Phase III-Studien keinen Vorteil der Gabe von Surfactant im ARDS (216–218). Ein gezielter Abbau von HSA in den Alveolen erscheint schwierig und wurde bisher weder untersucht noch wurde eine entsprechende Studie in den Studienregistern clinicaltrials.gov bzw. clinicaltrialsregister.eu eingetragen (Stand: 15. Juli 2015). Eine weitere „*from bench to bedside*“ Option wäre die Modifikation oder exogene Zufuhr von alveolären Proteasom im ARDS. Inzwischen sind die Proteasom-Inhibitoren Bortezomib und Carfilzomib zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen. Eine Inhibition des Proteasoms ist wahrscheinlich aber gerade im ARDS nicht erwünscht. Andererseits führt eine Störung von proteasomalen Signalwegen zu einer reduzierten TTF-1 Proteinproduktion und zu einer geringeren Proteinexpression von SP (190). Eine weitere Möglichkeit wäre die exogene Zufuhr von Proteasom – in Analogie zur Gabe von alveolären Surfactant. Die alveoläre Gabe von Surfactant wurde aber weder klinisch noch experimentell erprobt. Neben den Problemen der Herstellung und möglicherweise immunologischen Reaktionen würde exogenes Surfactant durch einen möglichen Inhibitor oder das alveoläre Milieu im ARDS ebenfalls inaktiviert.

5 Zusammenfassung

Das *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)* ist eine Erkrankung mit einer signifikanten Mortalität. Jüngste Arbeiten konnten extrazelluläres 20S Proteasom im *ARDS* nachweisen und zeigen, dass es wahrscheinlich an der Pathogenese des *ARDS* beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung des 20S Proteasoms für das *ARDS* untersucht werden. Dazu wurde analysiert, ob spezifische Proteine des Alveolarraums durch das 20S Proteasom in *in-vitro*-Verdau Versuchen degradiert werden. Hierfür wurden die Proteinkonzentrationen und -muster in Bronchoalveolären Lavage (BAL)-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten bestimmt und jeweils spezifische Proteine massenspektrometrisch identifiziert. Diese Proteine wurden einem *in-vitro*-Verdau durch das 20S Proteasom unterzogen, die Verdauprodukte massenspektrometrisch analysiert und so das Verdauverhalten des 20S Proteasoms als auch der Einfluss der Versuchsbedingungen untersucht.

Die Proteinkonzentrationen und -muster in BAL-Proben von lungengesunden Probanden und *ARDS*-Patienten unterschieden sich signifikant. Es konnten u.a. das humane Surfactant-Protein A1 (SP-A1) als ein für lungengesunde Probanden und das humane Serum Albumin (HSA) als ein für *ARDS*-Patienten vermehrt auftretendes Protein nachgewiesen werden. SP-A1 konnte im *in-vitro*-Verdau stark degradiert, HSA hingegen kaum durch das 20S Proteasom verdaut werden. Insgesamt hing die Effektivität des Verdaus aber auch von den Verdaubedingungen (wie bspw. Inkubationszeit, Puffer, pH und Chaperone) und von der Struktur der Substrate, insbesondere des Oxidationszustandes, ab. Weiter konnte gezeigt werden, dass das 20S Proteasom neben den bekannten Aktivitäten (Caspase-, Chymotrypsin und Trypsin-ähnliche Aktivität) noch weitere atypische Enzymaktivitäten aufweist.

Eine Erniedrigung der alveolären SP-A1- und eine Erhöhung der HSA-Konzentrationen sind pathognomonisch für das *ARDS*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SP-A1 *in-vitro* effektiv, HSA hingegen kaum durch das 20S Proteasom degradiert wird. Somit ist eine Dysfunktion des extrazellulären proteasomalen Systems möglicherweise eine wichtige pathophysiologische Komponente im *ARDS*. Diese Dysfunktion wird auch durch eine Veränderung des alveolären Milieus begünstigt, welches im *ARDS* im Vergleich zum Lungengesunden stark verändert ist. Ferner konnten neben den drei bekannten enzymatischen Aktivitäten des 20S Proteasoms weitere atypische Aktivitäten charakterisiert werden. Somit liefert die vorliegende Arbeit einen neuen, vertieften Einblick in die Funktionsweise des 20S Proteasoms und in den Pathomechanismus des *ARDS*. Ob eine gezielte Beeinflussung der Konzentration bestimmter alveolärer Proteine einen neuen Therapieansatz für das *ARDS* darstellt, müssen künftige Studien zeigen.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Struktur des 20S Proteasoms
- Abb. 2: Struktur des 26S Proteasoms
- Abb. 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System
- Abb. 4: Abbau defekter Proteine durch das Proteasomsystem
- Abb. 5: Morpholin Ringbildung zwischen dem 20S Proteasom und Epoxomicin
- Abb. 6: Intakte und beeinträchtigte Lungen-Alveole in der akuten Phase der Entzündungsreaktion
- Abb. 7: Aufbau von humanem Surfactant-Protein A
- Abb. 8: Prinzip des Fluoreszenz-Assay
- Abb. 9: Prinzip der Elektrospray-Ionisation
- Abb. 10: Schematischer Aufbau eines Quadrupols
- Abb. 11: Erzeugung von Fragment-Ionen im Massenspektrometer
- Abb. 12: Schematische Darstellung des Ablaufs des *in-vitro*-Verdau Versuch von humanem Serum Albumin
- Abb. 13: Schematische Darstellung des Ablaufs des *in-vitro*-Verdau Versuch von Surfactant-Protein A
- Abb. 14: Vergleichende Proteinkonzentrationen bei ARDS-Patienten und lungengesunden Probanden
- Abb. 15: 1D-Gelelektrophorese von sechs BAL-Proben lungengesunder Probanden
- Abb. 16: 1D-Gelelektrophorese von sechs BAL-Proben von ARDS-Patienten
- Abb. 17: Massenspektrum einer Proteinbande bei circa 40 kDa
- Abb. 18: Massenspektrum des selektierten Ions bei $m/z=566,81$ Da
- Abb. 19: AMC-Eichreihe
- Abb. 20: Ergebnisse der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay
- Abb. 21: Ergebnisse der Trypsin-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay
- Abb. 22: Ergebnisse der Caspase-ähnlichen Aktivität im Fluoreszenz-Enzym-Assay
- Abb. 23: Struktur des Insulins
- Abb. 24: Übersichtsspektren der Insulin-Versuchsansätze A2 und B2
- Abb. 25: Übersichtsspektrum des Insulin-Versuchsansatz B1
- Abb. 26: Übersichtsspektrum des Insulin-Versuchsansatz A1
- Abb. 27: MS-MS-Analyse des 2-fach geladenen Ions 379,19 Da
- Abb. 28: Schnittkarte des Insulin im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom
- Abb. 29: Massenspektrum von nativem humanem Serum Albumin
- Abb. 30: Massenspektrum von humanem Serum Albumin nach Reduktion (DTT) und Oxidation (H_2O_2)
- Abb. 31: Schnittkarte des humanem Serum Albumin im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom
- Abb. 32: Auswirkung unterschiedlicher Oxidationspuffer im *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin
- Abb. 33: Oxidationszustand des humanen Serum Albumin unter TEAD-Puffer
- Abb. 34: 1D-Gel einer BAL eines lungengesunden Probanden. Darstellung der Proteinbande bei ca. 30 kDa im Zellpellet
- Abb. 35: Massenspektrum von nativen Surfactant-Protein A
- Abb. 36: Massenspektrum von Surfactant-Protein A nach Zugabe von DTT

- Abb. 37: Massenspektrum von Surfactant-Protein A nach Reduktion und Oxidation
- Abb. 38: Schnittkarte des Surfactant-Protein A im *in-vitro*-Verdau mit 20S Proteasom
- Abb. 39: Vergleich von vier Verdauprodukten im *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A je nach Oxidation in Homo-PIPES und TRIS-HCl-Puffer
- Abb. 40: Massenspektren zur Kinetik des *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A
- Abb. 41: Massenspektren des *in-vitro*-Verdau von Surfactant-Protein A mit Epoxomicin
- Abb. 42: Vergleich der Massenspektren des Epoxomicin bei unterschiedlichen Konzentrationen
- Abb. 43: Verdauprodukte aus dem *in-vitro*-Verdau von humanem Serum Albumin in Relation zu den Sekundärstrukturen im humanen HSA-Molekül

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Systematik der Untereinheiten im 20S Proteasom
Tabelle 2:	Proteasom-Inhibitoren
Tabelle 3:	Surfactant-Proteine
Tabelle 4:	Zusammensetzung des TEAD-Puffers
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Stopp-Lösung
Tabelle 6:	Zusammensetzung des Lowry-Reganz
Tabelle 7:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels
Tabelle 8:	Zusammensetzung des HEPES-Puffers
Tabelle 9:	Pipettierschema zum <i>in-vitro</i> -Verdau Versuch von humanem Insulin
Tabelle 10:	Zusammensetzung des TRIS-HCl-Puffers
Tabelle 11:	Zusammensetzung des Oxidation-Puffers nach Whittier
Tabelle 12:	Zusammensetzung des Verdau-Puffers nach Whittier
Tabelle 13:	Aufbau des Versuches zur Untersuchung der Auswirkung von unterschiedlichen Epoxomicin Konzentrationen auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A
Tabelle 14:	Aufbau des Versuches zur Untersuchung der Auswirkung von Hitzeschockprotein 90 auf den <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A
Tabelle 15:	Identifizierte Aminosäuresequenzen für humanes zytoplasmatisches Aktin
Tabelle 16:	Ausgewählte Proteinbanden zur Identifizierung im tryptischen In-Gel-Verdau
Tabelle 17:	Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität
Tabelle 18:	Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Trypsin-ähnliche Aktivität
Tabelle 19:	Gemessene Fluoreszenz-Werte der Proteasomchargen 4, 5, 6, 7, 8 und 9 bezogen auf das jeweilige Enzym-Substrat-Verhältnis mit Angabe des arithmetischen Mittelwertes (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Caspase-ähnliche Aktivität
Tabelle 20:	Identifizierte Aminosäuresequenzen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Insulin mit 20S Proteasom.
Tabelle 21:	Identifizierte Schnittstellen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Insulin mit 20S Proteasom
Tabelle 22:	Identifizierte Aminosäuresequenzen im <i>in-vitro</i> -Verdau von humanem Serum Albumin mit 20S Proteasom
Tabelle 23:	Identifizierte Aminosäuresequenzen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A mit 20S Proteasom
Tabelle 24:	Identifizierte Aminosäuresequenzen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A in Zuordnung zu den jeweiligen Proteasom-Chargen
Tabelle 25:	Verteilung der enzymatischen Aktivitäten der jeweiligen Proteasom-Chargen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A
Tabelle 26:	Zeitliches Auftreten der Verdausignale im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A durch Proteasom-Charge 5 und Proteasom-Charge 6/7
Tabelle 27:	Vergleich der Intensitäten des Epoxomicin-Versuchs mit oxidiertem Surfactant-Protein A
Tabelle 28:	Vergleich der Intensitäten des Hsp 90-Versuchs mit oxidiertem Surfactant-Protein A
Tabelle 29:	Identifizierte Aminosäuresequenzen im <i>in-vitro</i> -Verdau von Surfactant-Protein A mit 20S Proteasom, welche nicht durch Epoxomicin inhibiert werden konnten

Literaturverzeichnis

1. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:801–47.
2. Hilt W, Wolf DH. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci.* März 1996;21(3):96–102.
3. Rivett AJ. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J.* 1. April 1993;291 (Pt 1):1–10.
4. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* August 2009;30(4):191–296.
5. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 18. Dezember 2003;426(6968):895–9.
6. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* Februar 2007;35(Pt 1):12–7.
7. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 15. Dezember 1998;17(24):7151–60.
8. Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:555–90.
9. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, u. a. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 9. September 1994;78(5):761–71.
10. Dice J. Lysosomal Degradation of Proteins. ELS John Wiley Sons Ltd 2007 [Http://www.welsnet.com/doi/10.1002/9780470015902a0000646pub2](http://www.welsnet.com/doi/10.1002/9780470015902a0000646pub2).
11. Rivett AJ. High molecular mass intracellular proteases. *Biochem J.* 1. November 1989;263(3):625–33.
12. Sixt SU, Peters J. Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. *Proc Am Thorac Soc.* Februar 2010;7(1):91–6.
13. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 29. November 2004;1695(1–3):19–31.
14. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. *Cell Death Differ.* 2005;12(9):1178–90.
15. Kloetzel PM, Soza A, Stohwasser R. The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol Chem.* März 1999;380(3):293–7.
16. Zimmermann J, Lamerant N, Grossenbacher R, Furst P. Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J Biol Chem.* 6. April 2001;276(14):10759–66.
17. Takeuchi J, Toh-e A. [Regulation of cell cycle by proteasome in yeast]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* Oktober 1997;42(14 Suppl):2247–54.
18. Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K, Ichihara A. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J Lab Clin Med.* Februar 1993;121(2):215–23.
19. Clawson GA. Protease inhibitors and carcinogenesis: a review. *Cancer Invest.* 1996;14(6):597–608.
20. Asher G, Reuven N, Shaul Y. 20S proteasomes and protein degradation „by default“. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* August 2006;28(8):844–9.
21. DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Chu-Ping M, Afendis SJ, u. a. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem.* 19. August 1994;269(33):20878–84.
22. Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J.* 1. Januar 2000;345 Pt 1:1–15.
23. Kopp F, Hendil KB, Dahlmann B, Kristensen P, Sobek A, Uerkevitz W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. April 1997;94(7):2939–44.
24. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, u. a. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Mol Biol.* November 2000;7(11):1062–7.
25. Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frommel C, Lowe J, u. a. Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* 16. Dezember 1996;15(24):6887–98.

26. Petit F, Jarrousse AS, Dahlmann B, Sobek A, Hendil KB, Buri J, u. a. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem J.* 15. August 1997;326 (Pt 1):93–8.
27. Tokunaga F, Aruga R, Iwanaga S, Tanaka K, Ichihara A, Takao T, u. a. The NH₂-terminal residues of rat liver proteasome (multicatalytic proteinase complex) subunits, C₂, C₃ and C₈, are N alpha-acetylated. *FEBS Lett.* 24. April 1990;263(2):373–5.
28. Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, u. a. Proteasome alpha-type subunit C₉ is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1. Oktober 1996;184(4):1313–8.
29. Dong J, Chen W, Welford A, Wandinger-Ness A. The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes. *J Biol Chem.* 14. Mai 2004;279(20):21334–42.
30. Mayau V, Baron B, Buttin G, Debatisse M. Twelve genes, including the unassigned proteasome zeta subunit gene, ordered within the human 1p13 region. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* April 1998;9(4):331–3.
31. Kania MA, Demartino GN, Baumeister W, Goldberg AL. The proteasome subunit, C₂, contains an important site for binding of the PA28 (uS) activator. *Eur J Biochem FEBS.* 1. März 1996;236(2):510–6.
32. Bose S, Stratford FLL, Broadfoot KI, Mason GGF, Rivett AJ. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C₈ (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J.* 15. Februar 2004;378(Pt 1):177–84.
33. Chung PA, Johnson J, Khramtsov NV, Upton SJ. Cloning and molecular characterization of a gene encoding a *Cryptosporidium parvum* putative 20S proteasome beta1-type subunit. *DNA Seq J DNA Seq Mapp.* 2000;11(3-4):309–14.
34. Dissemond J, Goette P, Moers J, Lindeke A, Goos M, Ferrone S, u. a. Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res.* August 2003;13(4):371–7.
35. Schweisguth F. Dominant-negative mutation in the beta2 and beta6 proteasome subunit genes affect alternative cell fate decisions in the *Drosophila* sense organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28. September 1999;96(20):11382–6.
36. Scheffler S, Kuckelkorn U, Egerer K, Dörner T, Reiter K, Soza A, u. a. Autoimmune reactivity against the 20S-proteasome includes immunosubunits LMP2 (beta1), MECL1 (beta2) and LMP7 (beta5). *Rheumatol Oxf Engl.* Mai 2008;47(5):622–6.
37. Nishimura C, Tamura T, Akioka H, Tokunaga F, Tanaka K, Ichihara A. cDNA cloning of rat proteasome subunit RC10-II, assumed to be responsible for trypsin-like catalytic activity. *FEBS Lett.* 28. Dezember 1993;336(3):462–6.
38. Nishimura C, Tamura T, Tokunaga F, Tanaka K, Ichihara A. cDNA cloning of rat proteasome subunit RC7-I, a homologue of yeast PRE1 essential for chymotrypsin-like activity. *FEBS Lett.* 11. Oktober 1993;332(1-2):52–6.
39. Reidlinger J, Pike AM, Savory PJ, Murray RZ, Rivett AJ. Catalytic properties of 26 S and 20 S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J Biol Chem.* 3. Oktober 1997;272(40):24899–905.
40. Trachtulec Z, Hamvas RM, Forejt J, Lehrach HR, Vincek V, Klein J. Linkage of TATA-binding protein and proteasome subunit C5 genes in mice and humans reveals synteny conserved between mammals and invertebrates. *Genomics.* 15. August 1997;44(1):1–7.
41. Nothwang HG, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A. Sequence analyses and inter-species comparisons of three novel human proteasomal subunits, HsN3, HsC7-I and HsC10-II, confine potential proteolytic active-site residues. *Biochim Biophys Acta.* 18. Oktober 1994;1219(2):361–8.
42. Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys.* 1. November 2000;383(1):1–16.
43. Liu C-W, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ. Endoproteolytic Activity of the Proteasome. *Science.* 17. Januar 2003;299(5605):408–11.
44. Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanović S, Dietz K, u. a. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome β subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13. Oktober 1998;95(21):12504–9.
45. Cardozo C. Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein.* 1993;47(4-6):296–305.
46. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem.* 3. Oktober 1997;272(40):25200–9.

47. Jäger S, Groll M, Huber R, Wolf DH, Heinemeyer W. Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol.* 27. August 1999;291(4):997–1013.
48. Luciani F, Keşmir C, Mishto M, Or-Guil M, de Boer RJ. A mathematical model of protein degradation by the proteasome. *Biophys J.* April 2005;88(4):2422–32.
49. Köhler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell.* Juni 2001;7(6):1143–52.
50. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol.* 10. November 2000;303(5):643–53.
51. Nelson JE, Loukissa A, Altschuller-Felberg C, Monaco JJ, Fallon JT, Cardozo C. Up-regulation of the proteasome subunit LMP7 in tissues of endotoxemic rats. *J Lab Clin Med.* April 2000;135(4):324–31.
52. Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Sessions R, Textoris-Taube K, Dal Piaz F, u. a. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localisation and insight into the regulatory mechanisms. *Biol Chem.* April 2006;387(4):417–29.
53. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med.* 3. Januar 1994;179(3):901–9.
54. Beninga J, Rock KL, Goldberg AL. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem.* 24. Juli 1998;273(30):18734–42.
55. Sijts EJAM, Kloetzel P-M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci.* Mai 2011;68(9):1491–502.
56. Yewdell JW. Immunoproteasomes: Regulating the regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28. Juni 2005;102(26):9089–90.
57. Deol P, Zaiss DMW, Monaco JJ, Sijts AJAM. Rates of Processing Determine the Immunogenicity of Immunoproteasome-Generated Epitopes. *J Immunol.* 15. Juni 2007;178(12):7557–62.
58. Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol.* 1. April 2001;13(2):147–53.
59. Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, u. a. Destructive Cleavage of Antigenic Peptides Either by the Immunoproteasome or by the Standard Proteasome Results in Differential Antigen Presentation. *J Immunol.* 15. Januar 2006;176(2):1053–61.
60. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68(1):1015–68.
61. Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur J Biochem FEBS.* 1. Juli 1995;231(1):1–30.
62. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 4. Januar 2000;19(1):94–102.
63. Lin S-Y, Chen W-Y, Lee F-Y, Huang C-J, Sheu WH-H. Activation of ubiquitin-proteasome pathway is involved in skeletal muscle wasting in a rat model with biliary cirrhosis: potential role of TNF-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* März 2005;288(3):E493–501.
64. Sun Y. Targeting E3 Ubiquitin Ligases for Cancer Therapy. *Cancer Biol Ther.* 1. November 2003;2:621–7.
65. Rivett AJ. The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* Januar 1989;268(1):1–8.
66. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* 11. März 1994;269(10):7709–18.
67. Fricke B, Heink S, Steffen J, Kloetzel P-M, Krüger E. The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* Dezember 2007;8(12):1170–5.
68. Rivett AJ, Knecht E. Protein turnover: proteasome location. *Curr Biol CB.* Februar 1993;3(2):127–9.
69. Mueller O, Anlasik T, Wiedemann J, Thomassen J, Wohlschlaeger J, Hagel V, u. a. Circulating Extracellular Proteasome in the Cerebrospinal Fluid: A Study on Concentration and Proteolytic

- Activity. *J Mol Neurosci* MN [Internet]. 1. September 2011 [zitiert 2. September 2011]; Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881828>
70. Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev*. Mai 2004;68(1):115–24.
 71. Sixt SU, Beiderlinden M, Jennissen HP, Peters J. Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Mai 2007;292(5):L1280–8.
 72. Sixt SU, Adamzik M, Spyrka D, Saul B, Hakenbeck J, Wohlschlaeger J, u. a. Alveolar extracellular 20S proteasome in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Juni 2009;179(12):1098–106.
 73. Sixt SU, Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta*. Dezember 2008;1782(12):817–23.
 74. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Rückert JC, Dörner T, Burmester G-R, u. a. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol*. Oktober 2002;29(10):2045–52.
 75. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. Februar 2009;19(2):43–51.
 76. Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic Cph Den*. August 2005;6(8):607–14.
 77. Bochmann I, Ebstein F, Lehmann A, Wohlschlaeger J, Sixt SU, Kloetzel P-M, u. a. T lymphocytes export proteasomes by way of microparticles: a possible mechanism for generation of extracellular proteasomes. *J Cell Mol Med*. Januar 2014;18(1):59–68.
 78. Vaithilingam IS, McDonald W, Malott DW, Del Maestro RF. An extracellular proteasome-like structure from C6 astrocytoma cells with serine collagenase IV activity and metallo-dependent activity on alpha-casein and beta-insulin. *J Biol Chem*. 3. März 1995;270(9):4588–93.
 79. Ito WD, Lund N, Zhang Z, Buck F, Lellek H, Horst A, u. a. Activation of Cell Surface Bound 20S Proteasome Inhibits Vascular Cell Growth and Arteriogenesis. *BioMed Res Int*. 2015;2015:719316.
 80. Kurepa J, Smalle JA. To misfold or to lose structure?: Detection and degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Plant Signal Behav*. Juni 2008;3(6):386–8.
 81. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oktober 2013;14(10):630–42.
 82. Squier TC. Redox Modulation of Cellular Metabolism Through Targeted Degradation of Signaling Proteins by the Proteasome. *Antioxid Redox Signal*. 1. Januar 2006;8(1-2):217–28.
 83. Conconi M, Petropoulos I, Emod I, Turlin E, Biville F, Friguet B. Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochem J*. 15. Juli 1998;333 (Pt 2):407–15.
 84. Lu X, Michaud C, Orlowski M. Heat shock protein-90 and the catalytic activities of the 20 S proteasome (multicatalytic proteinase complex). *Arch Biochem Biophys*. 1. März 2001;387(1):163–71.
 85. Eleuteri AM, Cuccioloni M, Bellesi J, Lupidi G, Fioretti E, Angeletti M. Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: thermodynamic and kinetic characterization. *Proteins*. 1. August 2002;48(2):169–77.
 86. Whittier JE, Xiong Y, Rechsteiner MC, Squier TC. Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem*. 29. Oktober 2004;279(44):46135–42.
 87. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 3. Januar 2003;278(1):311–8.
 88. Shringarpure R, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci CMLS*. September 2001;58(10):1442–50.
 89. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 6. Juni 2003;305(3):709–18.
 90. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Juni 1997;11(7):526–34.
 91. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem*. 28. Juni 1996;271(26):15504–9.
 92. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 15. Juli 1987;262(20):9895–901.
 93. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem*. 15. Juli 1987;262(20):9902–7.

94. Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem.* 15. Juli 1987;262(20):9908–13.
95. Davies KJ, Lin SW, Pacifici RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem.* 15. Juli 1987;262(20):9914–20.
96. Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* April 2001;83(3-4):301–10.
97. Meng L, Mohan R, Kwok BHB, Eloffsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31. August 1999;96(18):10403–8.
98. Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, u. a. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo).* November 1992;45(11):1746–52.
99. Sixt SU, Alami R, Hakenbeck J, Adamzik M, Kloß, A, u. a. Distinct Proteasome Subpopulations in the Alveolar Space of Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Mediators Inflamm* [Internet]. 29. Januar 2012 [zitiert 16. August 2013];2012. Verfügbar unter: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/204250/abs/>
100. Welsch U. Atmungsorgane-Alveolarraum. In: *Histologie.* 3. Auflage Aufl. München: Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2010. S. 263–83.
101. Walters DV. Lung Lining Liquid – The Hidden Depths. *Biol Neonate.* 2002;81(Suppl. 1):2–5.
102. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 4. Mai 2000;342(18):1334–49.
103. Wauer RR. Das Surfactant-System. In: *Surfactantherapie.* 2. Auflage Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1997. S. 7–10.
104. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, u. a. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* März 2006;43(9):1293–315.
105. Herold G. Akutes Lungenversagen. In: *Innere Medizin 2010.* Köln: Gerd Herold; 2010. S. 324–6.
106. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet Lond Engl.* 5. Mai 2007;369(9572):1553–64.
107. Modrykamien AM, Gupta P. The acute respiratory distress syndrome. *Proc Bayl Univ Med Cent.* April 2015;28(2):163–71.
108. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, u. a. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* März 1994;149(3 Pt 1):818–24.
109. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, u. a. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 20. Juni 2012;307(23):2526–33.
110. ARDS and Diffuse Alveolar Damage: A Pathologist's Perspective - Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery [Internet]. [zitiert 16. Juli 2015]. Verfügbar unter: [http://www.semthorcardiovascsurg.com/article/S1043-0679\(06\)00010-4/abstract](http://www.semthorcardiovascsurg.com/article/S1043-0679(06)00010-4/abstract)
111. Bellingan G. The pulmonary physician in critical care • 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax.* Juni 2002;57(6):540–6.
112. Sixt S, Adamzik M, Peters J. Das akute Lungenversagen – Pulmonale Reparatur und therapeutische Optionen. *AINS - Anästhesiol · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerzther.* April 2009;44(04):258–66.
113. Simpson DL, Goodman M, Spector SL, Petty TL. Long-Term Follow-Up and Bronchial Reactivity Testing in Survivors of the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1. März 1978;117(3):449–54.
114. Klein JJ, van Haeringen JR, Sluiter HJ, Holloway R, Peset R. Pulmonary function after recovery from the adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 1. März 1976;69(3):350–5.
115. Castro CY. ARDS and Diffuse Alveolar Damage: A Pathologist's Perspective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1. März 2006;18(1):13–9.
116. Torii K, Iida K, Miyazaki Y, Saga S, Kondoh Y, Taniguchi H, u. a. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* Januar 1997;155(1):43–6.
117. Meduri GU. Late adult respiratory distress syndrome. *New Horiz Baltim Md.* November 1993;1(4):563–77.
118. Kuwano K, Hagimoto N, Nakanishi Y. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol.* Juli 2004;19(3):867–81.

119. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, u. a. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Dev Camb Engl*. Dezember 2001;128(24):5181-8.
120. Elkington PTG, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*. März 2006;61(3):259-66.
121. Hashimoto S, Okayama Y, Shime N, Kimura A, Funakoshi Y, Kawabata K, u. a. Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Respirol Carlton Vic*. Juni 2008;13(4):581-4.
122. Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MA. Injury and repair in lung and airways. *Crit Care Med*. August 2003;31(8 Suppl):S524-31.
123. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest*. Februar 1986;77(2):645-8.
124. Portnoy J, Pan T, Dinarello CA, Shannon JM, Westcott JY, Zhang L, u. a. Alveolar type II cells inhibit fibroblast proliferation: role of IL-1 α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Februar 2006;290(2):L307-16.
125. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J*. Juni 1989;2(6):561-85.
126. Haslam PL, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J*. August 1999;14(2):245-8.
127. Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, u. a. Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 12. Januar 1989;257(6):L421-9.
128. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1. November 1951;193(1):265-75.
129. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*. 2002;23(11):1511-2.
130. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 6. Oktober 1989;246(4926):64-71.
131. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. Januar 1976;70(1):241-50.
132. Holter JF, Weiland JE, Pacht ER, Gadek JE, Davis WB. Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest*. Dezember 1986;78(6):1513-22.
133. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel P-M. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol*. 10. November 2000;303(5):643-53.
134. Ferrington DA, Sun H, Murray KK, Costa J, Williams TD, Bigelow DJ, u. a. Selective Degradation of Oxidized Calmodulin by the 20 S Proteasome. *J Biol Chem*. 1. Dezember 2001;276(2):937-43.
135. Balog EM, Lockamy EL, Thomas DD, Ferrington DA. Site-Specific Methionine Oxidation Initiates Calmodulin Degradation by the 20S Proteasome†. *Biochemistry (Mosc)*. 7. April 2009;48(13):3005-16.
136. Strosova M, Voss P, Engels M, Horakova L, Grune T. Limited degradation of oxidized calmodulin by proteasome: Formation of peptides. *Arch Biochem Biophys*. 1. Juli 2008;475(1):50-4.
137. Sacksteder CA, Whittier JE, Xiong Y, Li J, Galeva NA, Jacoby ME, u. a. Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionine₁₄₅ in calmodulin promotes targeted proteasomal degradation. *Biophys J*. 15. August 2006;91(4):1480-93.
138. Prakash S, Inobe T, Hatch AJ, Matouschek A. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat Chem Biol*. Januar 2009;5(1):29-36.
139. Liu C-W, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ. Endoproteolytic Activity of the Proteasome. *Science*. 17. Januar 2003;299(5605):408-11.
140. Cowan PM, McGAVIN S, North ACT. The Polypeptide Chain Configuration of Collagen. *Nature*. 3. Dezember 1955;176(4492):1062-4.
141. Shoulders MD, Raines RT. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58.
142. Rich A, Crick FHC. The molecular structure of collagen. *J Mol Biol*. Oktober 1961;3(5):483-IN4.

143. Dugaiczak A, Law SW, Dennison OE. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Januar 1982;79(1):71-5.
144. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 6. Januar 1999;12(6):439-46.
145. Shimbara N, Ogawa K, Hidaka Y, Nakajima H, Yamasaki N, Niwa S, u. a. Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes. *J Biol Chem.* 4. September 1998;273(36):23062-71.
146. Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanović S, Dietz K, u. a. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. Oktober 1998;95(21):12504-9.
147. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol.* 5. Mai 2000;298(3):417-29.
148. Miconnet I, Servis C, Cerottini JC, Romero P, Lévy F. Amino acid identity and/or position determines the proteasomal cleavage of the HLA-A*0201-restricted peptide tumor antigen MAGE-3271-279. *J Biol Chem.* 1. September 2000;275(35):26892-7.
149. Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 27. Februar 2009;386(3):814-27.
150. Hoyt MA, Coffino P. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:1596-600.
151. Orłowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 1. Juli 2003;415(1):1-5.
152. Orłowski M, Cardozo C, Michaud C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry (Mosc).* 1. Februar 1993;32(6):1563-72.
153. Pereira ME, Nguyen T, Wagner BJ, Margolis JW, Yu B, Wilk S. 3,4-dichloroisocoumarin-induced activation of the degradation of beta-casein by the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex. *J Biol Chem.* 15. April 1992;267(11):7949-55.
154. Cardozo C, Vinitsky A, Hidalgo MC, Michaud C, Orłowski M. A 3,4-dichloroisocoumarin-resistant component of the multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry (Mosc).* 1. August 1992;31(32):7373-80.
155. Cardozo C, Michaud C, Orłowski M. Components of the Bovine Pituitary Multicatalytic Proteinase Complex (Proteasome) Cleaving Bonds after Hydrophobic Residues†. *Biochemistry (Mosc).* 1. Juli 1999;38(30):9768-77.
156. Tsubuki S, Saito Y, Kawashima S. Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat-shock protein 90. *FEBS Lett.* 16. Mai 1994;344(2-3):229-33.
157. Conconi M, Djavadi-Ohanian L, Uerkevitz W, Hendil KB, Friguet B. Conformational changes in the 20S proteasome upon macromolecular ligand binding analyzed with monoclonal antibodies. *Arch Biochem Biophys.* 15. Februar 1999;362(2):325-8.
158. Montel V, Gardrat F, Azanza JL, Raymond J. 20S proteasome, hsp90, p97 fusion protein, PA28 activator copurifying oligomers and ATPase activities. *Biochem Mol Biol Int.* März 1999;47(3):465-72.
159. Imamura T, Haruta T, Takata Y, Usui I, Iwata M, Ishihara H, u. a. Involvement of heat shock protein 90 in the degradation of mutant insulin receptors by the proteasome. *J Biol Chem.* 1. Mai 1998;273(18):11183-8.
160. Busconi L, Guan J, Denker BM. Degradation of heterotrimeric Galpha(o) subunits via the proteasome pathway is induced by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem.* 21. Januar 2000;275(3):1565-9.
161. Kenniston JA, Sauer RT. Signaling degradation. *Nat Struct Mol Biol.* September 2004;11(9):800-2.
162. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis.* Oktober 1977;116(4):589-615.
163. Matthay MA, Song Y, Bai C, Jones KD. The acute respiratory distress syndrome in 2013. *Transl Respir Med.* 1. Dezember 2013;1(1):1-6.
164. Holter JF, Weiland JE, Pacht ER, Gadek JE, Davis WB. Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest.* Dezember 1986;78(6):1513-22.

165. Fowler AA. Characterization of Antiproteinase Activity in the Adult Respiratory Syndrome. *Chest*. 1982;81:50-1.
166. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. *Intensive Care Med*. 1. April 1998;24(4):296-303.
167. Dreon MS, Ituarte S, Heras H. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One*. 2010;5(12):e15059.
168. Chauhan V, Sheikh AM, Chauhan A, Spivack WD, Fenko MD, Malik MN. Fibrillar amyloid beta-protein inhibits the activity of high molecular weight brain protease and trypsin. *J Alzheimers Dis JAD*. Februar 2005;7(1):37-44.
169. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, u. a. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. Dezember 1991;88(6):1976-81.
170. Pison U, Obertacke U, Seeger W, Hawgood S. Surfactant protein A (SP-A) is decreased in acute parenchymal lung injury associated with polytrauma*. *Eur J Clin Invest*. 1992;22(11):712-8.
171. Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walrmath D, u. a. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res*. 12. Oktober 2001;2(6):353.
172. Mason RJ, Greene K, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 7. Januar 1998;275(1):L1-13.
173. Seeger W, Günther A, Walrmath HD, Grimminger F, Lasch HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Clin Invest*. 1. März 1993;71(3):177-90.
174. Seeger W, Elssner A, Günther A, Krämer H-J, Kalinowski HO. Lung Surfactant Phospholipids Associate with Polymerizing Fibrin: Loss of Surface Activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. August 1993;9(2):213-20.
175. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhörning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. Juli 1991;71(1):317-21.
176. Pison U, Tam EK, Caughey GH, Hawgood S. Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. *Biochim Biophys Acta*. 15. September 1989;992(3):251-7.
177. Ryan SF, Ghassibi Y, Liao DF. Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Januar 1991;4(1):33-41.
178. Seeger W, Lepper H, Wolf HR, Neuhof H. Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 14. Juni 1985;835(1):58-67.
179. Wispé JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman RB, u. a. Tumor necrosis factor- α inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest*. Dezember 1990;86(6):1954-60.
180. Cockshutt AM, Possmayer F. Lysophosphatidylcholine sensitizes lipid extracts of pulmonary surfactant to inhibition by serum proteins. *Biochim Biophys Acta*. 15. Oktober 1991;1086(1):63-71.
181. Schochett P, Mora R, Mark L, Butler M, Ingenito EP. Calcium-dependent degradation of surfactant protein A by activated neutrophils due to serine proteases. *Exp Lung Res*. November 1999;25(7):595-616.
182. Seeger W, Stöhr G, Wolf HR, Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. Februar 1985;58(2):326-38.
183. Seeger W, Grube C, Günther A, Schmidt R. Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J*. Juli 1993;6(7):971-7.
184. Warriner HE, Ding J, Waring AJ, Zasadzinski JA. A concentration-dependent mechanism by which serum albumin inactivates replacement lung surfactants. *Biophys J*. Februar 2002;82(2):835-42.
185. Keough KM, Parsons CS, Phang PT, Tweeddale MG. Interactions between plasma proteins and pulmonary surfactant: surface balance studies. *Can J Physiol Pharmacol*. September 1988;66(9):1166-73.
186. Holm BA, Enhörning G, Notter RH. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids*. November 1988;49(1-2):49-55.
187. Venkitaraman AR, Hall SB, Whitsett JA, Notter RH. Enhancement of biophysical activity of lung surfactant extracts and phospholipid-apoprotein mixtures by surfactant protein A. *Chem Phys Lipids*. Dezember 1990;56(2-3):185-94.

188. Venkitaraman AR, Hall SB, Notter RH. Hydrophobic homopolymeric peptides enhance the biophysical activity of synthetic lung phospholipids. *Chem Phys Lipids*. März 1990;53(2-3):157-64.
189. Arias-Diaz J, Garcia-Verdugo I, Casals C, Sanchez-Rico N, Vara E, Balibrea JL. Effect of surfactant protein A (SP-A) on the production of cytokines by human pulmonary macrophages. *Shock* Augusta Ga. September 2000;14(3):300-6.
190. Das A, Boggaram V. Proteasome dysfunction inhibits surfactant protein gene expression in lung epithelial cells: mechanism of inhibition of SP-B gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Januar 2007;292(1):L74-84.
191. Tatum JL, Strash AM, Sugerman HJ, Hirsch JI, Beachley MC, Greenfield LJ. Single isotope evaluation of pulmonary capillary protein leak (ARDS model) using computerized gamma scintigraphy. *Invest Radiol*. Dezember 1981;16(6):473-8.
192. Sugerman HJ, Strash AM, Hirsch JI, Glauser FL, Shirazi KK, Sharp DE, u. a. Sensitivity of scintigraphy for detection of pulmonary capillary albumin leak in canine oleic acid ARDS. *J Trauma*. Juli 1981;21(7):520-7.
193. Sugerman HJ, Blocher CR, Hirsch JI, Strash AM, Tatum JL. Failure of various agents to decrease oleic acid pulmonary albumin leak. *J Surg Res*. Mai 1983;34(5):456-62.
194. Pallister I, Gosling P, Alpar K, Bradley S. Prediction of posttraumatic adult respiratory distress syndrome by albumin excretion rate eight hours after admission. *J Trauma*. Juni 1997;42(6):1056-61.
195. Pallister I, Dent C, Wise CC, Alpar EK, Gosling P. Early post-traumatic acute respiratory distress syndrome and albumin excretion rate: a prospective evaluation of a „point-of care“ predictive test. *Injury*. April 2001;32(3):177-81; discussion 183.
196. Hoegerle S, Benzing A, Nitzsche EU, Moenting JS, Reinhardt MJ, Geiger K, u. a. Radioisotope albumin flux measurement of microvascular lung permeability: an independent parameter in acute respiratory failure? *Nukl Nucl Med*. April 2001;40(2):44-50.
197. Emmett M, Fowler AA, Hyers TM, Crowle AJ. Crossed immunoelectrophoretic analysis of ARDS lavage proteins. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. Januar 1987;184(1):83-91.
198. Byrne K, Tatum JL, Henry DA, Hirsch JI, Crossland M, Barnes T, u. a. Increased morbidity with increased pulmonary albumin flux in sepsis-related adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. Januar 1992;20(1):28-34.
199. Sibbald WJ, Anderson RR, Reid B, Holliday RL, Driedger AA. Alveolo-capillary permeability in human septic ARDS. Effect of high-dose corticosteroid therapy. *Chest*. Februar 1981;79(2):133-42.
200. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest*. November 1995;108(5):1303-14.
201. Warriner HE, Ding J, Waring AJ, Zasadzinski JA. A concentration-dependent mechanism by which serum albumin inactivates replacement lung surfactants. *Biophys J*. Februar 2002;82(2):835-42.
202. Nag K, Vidyashankar S, Devraj R, Fritzen Garcia M, Panda AK. Physicochemical studies on the interaction of serum albumin with pulmonary surfactant extract in films and bulk bilayer phase. *J Colloid Interface Sci*. 15. Dezember 2010;352(2):456-64.
203. Nag K, Hillier A, Parsons K, Garcia MF. Interactions of serum with lung surfactant extract in the bronchiolar and alveolar airway models. *Respir Physiol Neurobiol*. 1. August 2007;157(2-3):411-24.
204. Larsson M, Nylander T, Keough KMW, Nag K. An X-ray diffraction study of alterations in bovine lung surfactant bilayer structures induced by albumin. *Chem Phys Lipids*. Dezember 2006;144(2):137-45.
205. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, u. a. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*. 2. Juli 2001;194(1):1-12.
206. Kesmir C, van Noort V, de Boer RJ, Hogeweg P. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics*. Oktober 2003;55(7):437-49.
207. Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med*. September 1999;27(9):1738-44.

208. Lamb NJ, Quinlan GJ, Westerman ST, Gutteridge JM, Evans TW. Nitration of proteins in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome receiving inhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. September 1999;160(3):1031-4.
209. Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, Ishizaka A. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal*. April 2008;10(4):739-53.
210. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht - 23eiKL8i3a2sc.pdf [Internet]. [zitiert 27. Oktober 2015]. Verfügbar unter: http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67f1HRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf
211. Klare N, Seeger M, Janek K, Jungblut PR, Dahlmann B. Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: „asymmetric“ subunit composition, diversity and adaptation. *J Mol Biol*. 12. Oktober 2007;373(1):1-10.
212. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27. September 1994;91(20):9213-7.
213. Gaczynska M, Goldberg AL, Tanaka K, Hendil KB, Rock KL. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem*. 19. Juli 1996;271(29):17275-80.
214. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature*. 16. September 1993;365(6443):262-4.
215. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, u. a. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)*. Februar 1994;115(2):257-69.
216. Willson DF, Thomas NJ, Markovitz BP, Bauman LA, DiCarlo JV, Pon S, u. a. Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA*. 26. Januar 2005;293(4):470-6.
217. Spragg RG, Lewis JF, Walmrath H-D, Johannigman J, Bellingan G, Laterre P-F, u. a. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 26. August 2004;351(9):884-92.
218. Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventós AA, u. a. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 30. Mai 1996;334(22):1417-21.

Danksagung

Ein großer Dank geht an PD Dr. med. Stephan Sixt, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Trotz seines straffen Zeitplans war er stets bereit, meine Doktorarbeit thematisch zu begleiten und voranzubringen. Er war zu jeder Zeit ein felsenfester Ansprechpartner für mich und meine Fragen.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. Sabine Metzger. Unter ihrer Anleitung habe ich die Laborarbeiten durchführen dürfen. Sie hat mir dadurch den Einstieg in wissenschaftliches und experimentelles Arbeiten ermöglicht und mich in die Tiefen der Massenspektrometrie begleitet.

Ein ebenso großer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer. Mit hilfreichen Tipps und Anregungen unterstützte sie mich während der gesamten Erarbeitungszeit. Die Zusammenarbeit mit ihr hat mir zu jedem Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit viel Freude gemacht.

Ganz herzlich möchte ich darüber hinaus dem gesamten Laborteam des BMFZ und dem experimentellen Forschungslabor der Anästhesie für die Durchführung dieser Arbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen bisherigen Weg gelegt hat. Insbesondere meine Mama, meine beiden Schwestern Kerstin und Carolin, als auch meine Großeltern waren immer für mich da und gaben mir vor allem dann neuen Mut, wenn er besonders nötig war.

In besonderem Maße danke ich meinem Freund Marcel. Ich habe vieles unbewusst von ihm vorausgesetzt, was nicht immer selbstverständlich war. Vor allem in der Endphase hat er mir den Rücken freigehalten, meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und immer ein offenes Ohr für mich gehabt.

Danke auch an meine großartigen Freunde, die mich in den letzten Jahren begleitet haben und häufig dafür Verständnis aufbringen mussten, wenn die Zeit, die ich für sie hatte, eher knapp bemessen war.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

08.12.2015,

Carina Büren