

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

**Massenspektrometrische Untersuchungen  
zur Charakterisierung des Verdauverhaltens des  
20S Proteasoms bei Pulmonaler Alveolarproteinose**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Axel Märthesheimer  
2019

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: Prof. Dr. med. Ulrich K. Decking

*für meine Frau Sarah und für meine Eltern*

## Zusammenfassung

Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine sehr seltene Lungenerkrankung mit Beeinträchtigung des pulmonalen Gasaustauschs, die sich durch dysfunktionale Alveolarmakrophagen und intraalveoläre Akkumulation v. a. von Surfactantproteinen (SP) und humanem Serumalbumin (HSA) darstellt. Im Alveolarraum von PAP-Patienten befindet sich enzymatisch aktives extrazelluläres Proteasom in einer Konzentration, die 10-fach über der von Lungengesunden liegt.

Ziel war es, von einem PAP-Patienten gewonnene broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit (PAP-BALF) im Hinblick auf die Proteinzusammensetzung und die Proteasomaktivität zu charakterisieren. Weitere Ziele waren, die Aktivität und Spezifität von 20S Proteasom bei der Degradation alveolärer Proteine *in vitro* zu untersuchen, um seine potentielle Rolle bei PAP zu erforschen. Daraus leiteten sich als methodische Ziele die Entwicklung bzw. Anwendung zweier Testsysteme ab: Erstens die Anwendung eines Testsystems zur Quantifizierung von Enzymaktivitäten und zweitens die Entwicklung und Anwendung eines Testsystems zur proteasomalen Proteindegradation *in vitro* mit Charakterisierung der Produkte. Dazu erfolgte exemplarisch an einer PAP-BALF erstens die massenspektrometrische Identifikation der am häufigsten exprimierten Proteine mit Bestimmung des Oxidationsstatus und zweitens die Quantifizierung der drei klassischen Aktivitäten des enthaltenen Proteasoms durch Messung des Substratumsatzes fluorogener Peptide. *In vitro* wurden Insulin und HSA in nativer und denaturierter Form mit 20S Proteasom inkubiert und die entstandenen Degradationsprodukte massenspektrometrisch charakterisiert. Auch der Einfluss von Proteinoxidation und Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) auf die proteasomale Degradation wurde studiert.

Insulin und HSA in ihrer nativen Form wurden nicht durch 20S Proteasom verdaut. Erst das Aufbrechen von Sekundär- und Tertiärstrukturen machte sie zu Substraten des 20S Proteasoms bei HSA in gesteigertem Maß, wenn es zusätzlich oxidiert wurde. Das Schnittverhalten des 20S Proteasoms war substratabhängig und wurde durch Proteinoxidation bzw. Hsp90 moduliert. In bis zu 50 % der Fälle wurden *in vitro* atypische Schnittstellen beobachtet, die nicht mit den drei klassischen Proteasomaktivitäten in Einklang stehen. Die exemplarische Untersuchung einer PAP-BALF, bei der 9 prominente Proteine (darunter SP-A, SP-B, HSA) identifiziert wurden, lieferte Hinweise auf eine *in vivo* bereits bestehende Teiloxidation der alveolären Proteine als Indiz für gesteigerten oxidativen Stress bei PAP. Sie zeigte außerdem trypsin-, chymotrypsin- und caspaseartige Aktivität mit einem für Immuno 20S Proteasom (i20S) charakteristischen Profil. Verglichen mit Gesunden war die Aktivität vermindert, mutmaßlich verursacht durch einen endogenen Proteasominhibitor.

Die Ergebnisse deuten auf eine Coexistenz von enzymatisch aktivem i20S Proteasom und oxidierten Proteinen im Alveolarraum von PAP-Patienten hin und lassen eine aktive Rolle des Proteasoms im Krankheitsverlauf der PAP vermuten. Die vorliegende Arbeit erweitert die Erkenntnisse zur Funktion von 20S Proteasom, sowie speziell zum extrazellulären alveolären Proteasom bei PAP und liefert erste Anhaltspunkte für dessen potentielle Rolle. In weiteren Studien sollten diese Ergebnisse an repräsentativen Fallzahlen verifiziert und die potentiellen Aufgaben des (i)20S Proteasoms bei PAP detaillierter untersucht werden.

---

## Abstract

Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) is a very rare lung disease with impaired pulmonary gas exchange. Characteristics are dysfunctional alveolar macrophages and alveolar accumulation of proteins especially surfactant proteins (SP) and human serum albumin (HSA). The alveolar space in PAP-patients contains enzymatically active extracellular proteasomes in a 10-fold higher concentration compared to healthy subjects.

The aim was to investigate the protein content and the enzymatic activity of one bronchoalveolar lavage sample in PAP (PAP-BALF). Additionally, characteristics of proteasomal degradation of alveolar proteins *in vitro* should be examined to investigate its role in PAP. Two suitable techniques were required: one technique for measuring enzymatic activity was utilized and one technique for analysing proteasomal degradation *in vitro* and the products of this process was developed and established. One PAP-BALF sample was used exemplarily to identify the most abundant proteins and their degree of oxidation by mass spectrometry. Fluorimetric substrates were applied to quantify the proteasomal activity of this sample. The proteasomal degradation of native structured and denatured proteins (Insulin and HSA) was studied and the degradation products were identified by mass spectrometry. The effects of protein oxidation and heatshock protein 90 (Hsp 90) on proteasomal degradation were also explored.

The 20S proteasome was unable to degrade insulin and HSA as long as the proteins kept their native structure. Only after breaking their secondary and tertiary structures they got suitable substrates for the proteasome. Additionally oxidative modification of HAS increased the degradation rate. The degradation behaviour of the 20S proteasome depended on the substrate protein. Oxidation of proteins and the presence of Hsp90 generated different cleavage sites. Fifty percent of the proteasomal cuts took place on unexpected cleavage sites which are normally not chosen by proteasomes. The study on an exemplary PAP-BALF sample identified 9 proteins (e.g. SP-A, SP-B, HSA) that all showed oxidative modifications. These findings lead to the assumption that alveolar proteins are generally oxidized in case of PAP and that there is advanced oxidative stress in PAP. The sample also showed trypsin like, chymotrypsin like and caspase like activity comparable to immuno 20S proteasome (i20S). Activity was lower compared to healthy subjects maybe caused by an endogenous proteasom inhibitor.

These findings suggest a coexistence of enzymatic active i20S proteasome and oxidative modified proteins in the alveolar space in PAP. Alveolar proteasome in PAP may play a role in pathogenesis and progression of the disease. The data extends the knowledge of the function of 20S proteasome and gives first indications of its potential function in PAP. More research on a representative number of cases is needed to prove these findings.

## Abkürzungsverzeichnis

11S	regulatorische 11S Proteasomkappe	h-Ery	Kurzbezeichnung einer Proteasompräparation aus humanen Erythrozyten
19S	regulatorische 19S Proteasomkappe		
20S	20S Proteasom	HSA	humanes Serumalbumin
26S	26S Proteasom	Hsp90	Hitzeschockprotein 90
2D-GE	zweidimensionale Gelelektrophorese	i20S	Immuno 20S Proteasom
3D	dreidimensional	i26S	Immuno 26S Proteasom
Å	Ångström, Längeneinheit: 1 Å = 10 <sup>-10</sup> m	IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
ALS	Autophagie-Lysosomen-System	Ig $\gamma$	Immunglobulin $\gamma$
AMC	Aminomethylcoumarin	Ig $\kappa$	Immunglobulin $\kappa$
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> , Akutes Atemnotsyndrom	IGV	In-Gel-Verdau
AS	Aminosäure	K <sup>+</sup>	Kaliumion
ATP	Adenosintriphosphat	kat	Katal, katalytische Aktivität: 1 kat = 1 mol/s
BAL	broncho-alveoläre Lavage	K-Na-Tartrat	Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> · 4 H <sub>2</sub> O)
BALF	broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit	LPS	Lipopolysaccharid
BSA	bovines Serumalbumin	m/z	Masse/Ladung
Bz	Benzoyl	MeOH	Methanol
Ca <sup>++</sup>	Calciumion	Mg <sup>++</sup>	Magnesiumion
casp	caspaseartig	MgAc <sub>2</sub>	Magnesiumazid
ch-tr	chymotrypsinartig	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Cl <sup>-</sup>	Chloridion	MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung	MS	Massenspektrometrie / Massenspektrum
cps	<i>counts per second</i> , Zählimpulse pro Sekunde: 1 cps = 1 s <sup>-1</sup>	MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	Kupfersulfat	MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
Da	Dalton, atomare Masseneinheit: 1 Da = 1,66 · 10 <sup>-27</sup> kg	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , Ausschlussgrenze
DMSO	Dimethylsulfoxid	Na <sup>+</sup>	Natriumion
DTT	Dithiothreitol	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
e	Elementarladung: e = 1,602 · 10 <sup>-19</sup> C	NaCl	Natriumchlorid
ESI	Elektrospray-Ionisation	Na-EDTA	Natrium-Ethylen-Diamintetraacetat
F	Zentrifugalkraft	NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
g	Erdbeschleunigung	NaOH	Natronlauge
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor	Ox	Oxidation
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion, Proton	PAA	Polyacrylamid
H <sub>2</sub> O	Wasser	PAP	pulmonale Alveolarproteinose
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	PMF	<i>peptide mass fingerprint</i> , Peptidmassenfingerprint
H-COOH	Methansäure, Ameisensäure	S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
		SP-A /-B	Surfactantprotein A /-B
		S-S-Brücke	Disulfidbrücke

---

Suc	Succinyl
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeitmassenspektrometer
tr	trypsinartig
TRIS-HCl	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3- Propanediol-Hydrochlorid
UE	Unterheit
UV	ultraviolett
WLL	<i>whole lung lavage</i> , Ganzlungenlavage
WLL4	Kurzbezeichnung einer Patientenprobe ( <i>whole lung lavage</i> Nr. 4)
WLL48	Kurzbezeichnung einer Patientenprobe ( <i>whole lung lavage</i> Nr. 48)
Z	Benzyloxycarbonyl
z	Ladung
$\lambda$	Wellenlänge

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Pulmonale Alveolarproteinose .....	1
1.1.1	<i>Epidemiologie, Pathogenese und Klassifikation .....</i>	1
1.1.2	<i>Klinik, Diagnostik und Therapie der PAP .....</i>	2
1.1.3	<i>Bronchoalveoläre Lavage bei PAP .....</i>	3
1.1.4	<i>Alveoläres Proteasom bei PAP .....</i>	3
1.2	Das Proteasom .....	4
1.2.1	<i>Intrazelluläres Proteasom .....</i>	4
1.2.2	<i>Extrazelluläres Proteasom .....</i>	5
1.2.3	<i>Das 20S Proteasom .....</i>	5
1.2.4	<i>Vergleich 20S Proteasom versus 26S Proteasom .....</i>	7
1.2.5	<i>Das Immunoproteasom .....</i>	8
1.3	Die Rolle des 20S Proteasoms bei oxidativem Stress .....	9
1.3.1	<i>Oxidativer Stress .....</i>	9
1.3.2	<i>Proteasomfunktion bei oxidativem Stress .....</i>	11
1.3.3	<i>Chaperone als Assistenten beim Abbau oxidativ beschädigter Proteine .....</i>	12
1.4	Ziele der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien und Probenmaterial .....	14
2.1.1	<i>Chemikalien .....</i>	14
2.1.2	<i>Bronchoalveoläre Lavage bei PAP .....</i>	15
2.1.3	<i>Alveoläres Proteasom .....</i>	15
2.1.4	<i>Erythrozytäres 20S Proteasom .....</i>	15
2.2	Biochemische Trennverfahren .....	16
2.2.1	<i>Dialyse .....</i>	16
2.2.2	<i>Größenausschlusszentrifugation .....</i>	16
2.3	Proteinbestimmung nach Lowry .....	17
2.4	Messung der enzymatischen Aktivität von Proteasom .....	18
2.4.1	<i>Enzym-Assay zur Messung der Proteasom-Aktivität .....</i>	19
2.4.2	<i>Eichreihe mit AMC .....</i>	20
2.4.3	<i>Spezifische enzymatische Aktivität .....</i>	20
2.5	Eindimensionale Gelelektrophorese .....	21
2.6	In-Gel-Verdau .....	21
2.7	Massenspektrometrie .....	23
2.7.1	<i>Probenvorbereitung .....</i>	24
2.7.2	<i>Aufbau und Funktion des Tandem-Hybrid-Massenspektrometers .....</i>	24
2.7.3	<i>Identifikation von Peptiden und Proteinen .....</i>	27
2.7.3.1	<i>MS-Übersichtsspektrum und Peptide Mass Fingerprint .....</i>	27
2.7.3.2	<i>MS-MS-Fragmentspektren und Peptidsequenzierung .....</i>	29



<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
3.1	Charakterisierung bronchoalveolärer Lavage bei pulmonaler Alveolarproteinose .....	33
3.1.1	Quantitative Proteinbestimmung.....	33
3.1.2	Qualitative Proteinbestimmung.....	33
3.2	Aufbau und Anwendung eines Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität des 20S Proteasoms.....	38
3.2.1	Enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms aus Erythrozyten.....	38
3.2.1.1	Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses .....	39
3.2.1.2	Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten .....	40
3.2.2	Enzymatische Aktivität des alveolären 20S Proteasoms bei PAP .....	44
3.2.2.1	Einfluss von Inkubationszeit und Enzym-Substrat-Verhältnis .....	45
3.2.2.2	Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten .....	46
3.3	Entwicklung und Anwendung eines <i>in vitro</i> Testsystems zum Verdau von Proteinen durch 20S Proteasom und der massenspektrometrischen Charakterisierung der Produkte.....	47
3.3.1	Entwicklung des Testsystems und Anwendung an Insulin als Modellsubstrat.....	47
3.3.1.1	Versuchsaufbau.....	48
3.3.1.2	Untersuchungen zum Einfluss der 3D-Struktur von Insulin.....	49
3.3.1.3	Schnittverhalten von 20S Proteasom beim Verdau von Insulin .....	51
3.3.2	Vorbehandlung von Albumin .....	56
3.3.2.1	Untersuchung zur Stabilität von HSA in Lösung .....	57
3.3.2.2	Untersuchung zum Einfluss von Dithiothreitol und Hitze auf HSA .....	59
3.3.2.3	Untersuchung zum Einfluss von Wasserstoffperoxid auf HSA.....	61
3.3.3	Degradation von Albumin durch 20S Proteasom.....	63
3.3.3.1	Untersuchungen zum Einfluss denaturierender Umgebungsbedingungen	63
3.3.3.2	Untersuchungen zum Einfluss von Proteinoxidation und Hsp90.....	65
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
4.1	Methodenkritik .....	76
4.1.1	Testsystem zur Proteom-Analyse von BALF-Proben .....	76
4.1.2	Testsystem zur Untersuchung der proteasomalen Aktivität.....	77
4.1.3	Testsystem zur Untersuchung des proteasomalen Verdauverhaltens.....	78
4.2	Proteinvorkommen im Alveolarraum bei PAP .....	81
4.2.1	Quantitative Untersuchung .....	81
4.2.2	Qualitative Untersuchung .....	82
4.3	Enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms .....	84
4.3.1	Aktivität von 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten.....	84
4.3.2	Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP.....	86
4.3.3	Vergleich der Aktivitäten von erythrozytärem und alveolärem Proteasom.....	89
4.4	Schnittverhalten des 20S Proteasoms .....	91
4.4.1	Schnittverhalten beim Verdau von Insulin und HSA .....	92
4.4.2	Substratabhängigkeit des Schnittverhaltens.....	93

---

4.5	Substratspezifität des 20S Proteasoms.....	94
4.5.1	<i>Einflüsse von Umgebungsbedingungen und Probenvorbehandlung</i> .....	94
4.5.2	<i>Einfluss der räumlichen Struktur des Substrats</i> .....	97
4.5.3	<i>Einfluss von oxidativem Stress</i> .....	99
4.5.4	<i>Einfluss von Chaperonen</i> .....	103
4.6	Potentielle Rolle des alveolären Proteasoms bei der Pathophysiologie der PAP .....	105
4.7	Synthese und Ausblick .....	109
<b>5</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>112</b>
5.1	Literaturverzeichnis.....	112
5.2	Abbildungsverzeichnis .....	125
5.3	Tabellenverzeichnis .....	127
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

Das Proteasom ist ein elementarer Regulator der intrazellulären Proteinhomöostase eukaryoter Lebewesen [1]. Es wurde auch extrazellulär im Alveolarraum nachgewiesen [2]. Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine sehr seltene Lungenerkrankung, bei der im Alveolarraum stark erhöhte Proteinkonzentrationen [3, 4], aber auch stark erhöhte Proteasomkonzentrationen vorliegen [5]. Die potentielle Rolle des 20S Proteasoms als Abbaueinheit für alveoläre Proteine im Rahmen der Krankheit PAP ist unklar. Die vorliegende Arbeit soll Hinweise auf eine mögliche Rolle des 20S Proteasoms bei PAP liefern.

## 1.1 Pulmonale Alveolarproteinose

Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine sehr seltene Lungenerkrankung, die 1958 von Rosen und Castelman [6] erstbeschrieben wurde. Die PAP geht mit einer Störung des alveolären Proteinhaushalts einher, die sich durch Akkumulation von Phospholipiden und Lipoproteinen in den Alveolen darstellt [6, 7] und zur Behinderung des pulmonalen Gasaustauschs führt.

### 1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Klassifikation

Die PAP tritt mit einer Prävalenz von nur etwa 1:1.000.000 [8, 9] auf. Am häufigsten sind Erwachsene im 3.-5. Lebensjahrzehnt betroffen [10] mit einer Häufung bei Männern und bei Rauchern [11]. Folgende drei Formen der PAP werden aufgrund ihrer pathogenetischen Entstehungsmechanismen unterschieden [12]:

**Primäre PAP:** Bei der primären Form ist die Surfactant-Clearance, die physiologisch durch Alveolarmakrophagen realisiert wird, gestört. Dies liegt an einer verminderten Stimulation der Makrophagenaktivität aufgrund einer Defizienz von Makrophagenwachstumsfaktor (*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, GM-CSF). Bei der seltenen hereditären Variante der primären PAP liegt die Ursache in Mutationen der GM-CSF-Rezeptoren. Die weitaus häufigere autoimmune Form der primären PAP ist durch GM-CSF-neutralisierende Antikörper verursacht. Die autoimmune Form hat eine insgesamt sehr gute Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 92 % [10].

**Sekundäre PAP:** Die sekundäre Form der PAP tritt nach Exposition inhalativer Noxen (z. B. Metaldämpfe), bei hämatologischen Neoplasien (z. B. chronisch myeloische Leukämie) und bei Immundefiziten auf [13–16]. In der Folge kommt es zu einem relativen Mangel und zur Dysfunktion der Alveolarmakrophagen. In jüngster Zeit wird darüber hinaus diskutiert, dass inhalative Noxen auch indirekt, nämlich über die Auslösung autoimmuner Prozesse, eine sekundäre PAP verursachen können [17]. Im Fall bestimmter inhalativer Noxen wird der pulmonale Eisenstoffwechsel negativ beeinflusst, wodurch die Konzentration von Antioxidanzien reduziert wird [18]. Dadurch entsteht in den Alveolen ein sog. „metall-katalysierter“ oxidativer Stress.

**PAP-ähnliche Syndrome:** Hierunter fallen seltene Syndrome, die mit einem gestörten Surfactant-Metabolismus einhergehen. Hierbei sind entweder die Produktion oder der Transport gestört [12].

Allen Formen gemeinsam ist eine Störung der Surfactanthomöostase sowie gleichzeitig oder konsekutiv auch eine gestörte Homöostase im Stoffwechsel anderer alveolärer Proteine.

### 1.1.2 Klinik, Diagnostik und Therapie der PAP

**Klinik:** Die klinische Symptomatik ist unspezifisch. Die Patienten leiden unter Fatigue, Belastungsdyspnoe und wenig-produktivem Husten. Bei der Lungenauskultation kann Knisterrasseln wahrgenommen werden [19].

**Diagnostik:** Die Diagnostik umfasst [20, 21]: 1. Bildgebung: (Röntgen bzw. geeigneter Computertomographie des Thorax), 2. die bronchoalveoläre Lavage (BAL) sowie als ergänzende Diagnostik 3. die Lungenfunktionsdiagnostik und 4. der laborchemische Nachweis von GM-CSF-Autoantikörpern im Blut im Falle der autoimmunen Form [22]. Die Kombination aus klinisch-radiologischer Diagnostik zusammen mit einer Lungenlavage ist wegweisend und macht eine chirurgische Lungenbiopsie i. d. R. überflüssig [23, 24]. In der BAL wird eine milchig-trübe Flüssigkeit gewonnen, die protein- und phospholipidreiches, *Periodic-acid-Schiff-reaction*-positives Material enthält [20], sowie aus schaumigen Makrophagen und reichlich Zelldetritus besteht. Häufig zeigt sich außerdem eine erhöhte Lymphozytenzahl in der BAL [25].

**Therapie:** Die BAL ist nicht nur das wichtigste diagnostische Werkzeug, sondern auch das entscheidende therapeutische Verfahren, denn eine kausale Therapie existiert derzeit noch nicht. Die Standardtherapie ist die Durchführung einer BAL (auch Ganzlungenla-

vage, *whole lung lavage*, WLL) unter Vollnarkose in regelmäßigen Abständen. Um die Alveolen suffizient zu reinigen, sind bis zu 30 Liter Lavageflüssigkeit notwendig [26]. Weitere Therapieansätze im Rahmen von Studien sind: 1. Die Substitution von GM-CSF [27–30], 2. immunmodulatorische Therapie mit Antikörpern (Rituximab zur B-Lymphozytendepletion) [31] und 3. die Transplantation von Makrophagen [32].

### 1.1.3 Bronchoalveoläre Lavage bei PAP

Die bei der BAL gewonnene Flüssigkeit wird bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit genannt (BALF). Wie bei Gesunden besteht sie auch bei PAP aus zellulären und löslichen Bestandteilen [6]. Ende der 1970er Jahre wurde erstmals die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) eingesetzt, um das Proteom von BALF-Proben sichtbar zu machen [33, 34]. Es zeigte sich in der BALF von PAP-Patienten ein verändertes Proteinprofil im Vergleich zur BALF von Gesunden [33]. Onodera et al. zeigten 1983, dass in BALF-Proben von PAP-Patienten eine erheblich höhere Konzentration an Protein enthalten ist als in denen von Gesunden [3]. In der Literatur sind Gesamtproteinkonzentrationen von PAP-BALF von 0,8 bis 5,2 mg/ml genannt [3, 4, 35, 36]. Diese liegen um mehr als das zehnfache über denen von lungengesunden Kontrollen, die lediglich 0,06 bis 0,17 mg/ml betragen [4, 35–39]. Am löslichen Anteil der BALF von Gesunden und von PAP-Patienten wurden in den Folgejahren zahlreiche Proteom-Studien durchgeführt und zahlreiche Proteine identifiziert [3, 33, 40–49]. Bei PAP und bei Gesunden stellen Plasmaproteine, die vermutlich per Diffusion über die Blut-Luft-Schranke in die Alveole gelangen, den Hauptanteil dar [44]. Daneben werden auch lungenspezifische Proteine detektiert, bei denen von einer lokalen Synthese in der Lunge ausgegangen wird, so z. B. die vermehrt exprimierten Surfactantproteine. Honda et al. beschrieben 1993 für PAP-BALF eine etwa zehnfach erhöhte Konzentration von Surfactantprotein A im Vergleich zu Gesunden [36]. Für viele der identifizierten Proteine wurden posttranslationale Modifikationen identifiziert. Es treten Glykosylierungen, Acetylierungen, Sulfatierungen, Hydroxylierungen und Palmitoylierungen auf. [45–48, 50]. Starosta konnte 2004 zeigen, dass viele der identifizierten Proteine bei PAP in oxidiertem Zustand vorliegen [49], was ein Hinweis darauf ist, dass in der Lunge von PAP-Patienten verstärkter oxidativer Stress herrscht.

### 1.1.4 Alveoläres Proteasom bei PAP

In der BALF von Gesunden wie auch von PAP-Patienten befindet sich Proteasom. Bei Gesunden liegt dessen mittlere Konzentration im Bereich von etwa 60 ng/ml BALF [5,

51, 52]. Bei PAP-BALF werden mittlere Konzentrationen von 1800 ng/ml (Messwert mitgeteilt von PD Dr. Stephan Sixt), bzw. 566 ng/ml [5] gemessen. Proteasom ist somit bei PAP um Faktor 10 bis 30 stärker exprimiert. Bonella et al. konnten 2015 zeigen, dass das Proteasom in der BALF von PAP-Patienten enzymatisch aktiv ist und kurze Peptide verdaut [5]. Ob es auch in der Lage ist, komplexe und u. U. auch oxidierte Proteine zu degradieren und dadurch möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese der PAP spielt, ist unklar. Proteasom tritt in verschiedenen Subtypen mit unterschiedlicher Struktur und Funktion auf. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die verschiedenen Proteasomtypen gegeben.

## 1.2 Das Proteasom

Proteasomen sind oligomere Multienzymkomplexe, die eine eigene Klasse von Proteasen darstellen. Sie treten extrazellulär und intrazellulär (z. B. im Alveolarraum) auf.

### 1.2.1 Intrazelluläres Proteasom

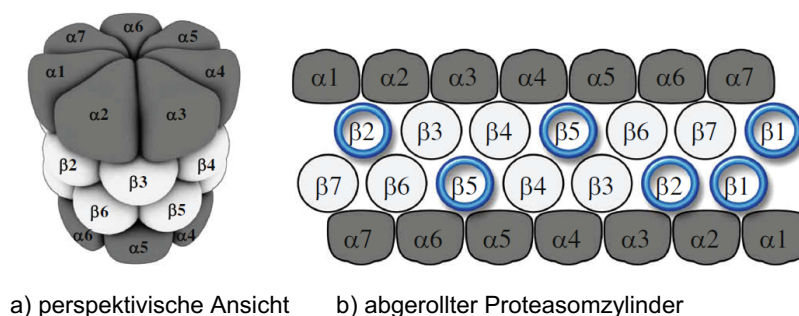
Erstmals wurde das Proteasom 1968 von Harris als Anhaftung an der Zellinnenmembran des humanen Erythrozyten entdeckt und „Cylindrin“ genannt [53, 54]. Später konnte gezeigt werden, dass Proteasom im Organismus aller eukaryoter Lebewesen vorkommt. Ein strukturell sehr ähnlicher Komplex wurde auch in einigen Prokaryonten beschrieben, was dafür spricht, dass es sich um eine phylogenetisch hochkonservierte Struktur handelt [55, 56]. Eine herausragende Rolle spielt das Proteasom-System beim intrazellulären Proteinabbau. Es baut etwa 80 % der intrazellulären Proteine ab [57, 58]. Zielstrukturen für den proteasomalen Abbau sind intakte und beschädigte intrazelluläre Proteine. Intakte Proteine werden vom Proteasom abgebaut, falls sie nicht länger benötigt werden [59]. Beschädigte und dadurch funktionslos gewordene Proteine sind ebenfalls Substrate für das Proteasom [60]. Zu Beschädigungen von Proteinen kommt es typischerweise durch Fehlfaltungen bei der Proteinbiosynthese oder beispielsweise durch oxidativen Stress [58]. Das Proteasom liegt in etwa 30.000 Kopien pro Zelle vor und macht bis zu 1 % der intrazellulären Gesamtproteinmenge aus [61–63]. Es besteht aus einem zylindrischen Hohlkörper, in den Proteine eingeschleust, enzymatisch degradiert und in Form kleinerer Peptide ausgeschleust werden.

## 1.2.2 Extrazelluläres Proteasom

Für viele Jahre galt die Annahme, dass Proteasom nur intrazellulär auftritt. Dass es auch extrazellulär vorkommt, wurde erstmals 1993 von Wada et al. [64] gezeigt, die Proteasom im Blutplasma nachweisen konnten. Später wurde es auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen, z. B. im Nebenhodensekret [65] und im *Liquor cerebrospinalis* [66]. Im Jahr 2007 konnten Sixt et al. 20S Proteasom erstmals im Alveolarraum der Lunge nachweisen [2]. Durch Studien an BALF konnte gezeigt werden, dass 20S Proteasom dort physiologisch auftritt und enzymatisch aktiv ist. [2, 39, 51, 52, 67]. Bei gesunden Individuen handelt es sich um 20S Proteasom [51]. Im Rahmen der Lungenerkrankung ARDS wurde eine Coexistenz von 20S Proteasom und Immunoproteasom beschrieben [51]. Im Jahr 2015 konnten Bonella et al. extrazelluläres alveoläres Proteasom auch im Rahmen der Lungenerkrankung PAP nachweisen und quantifizieren, jedoch ohne eine Differenzierung von Proteasomsubtypen vorzunehmen [5]. Bei PAP und anderen Lungenerkrankungen ist das alveoläre Proteasom im Gegensatz zu Lungengesunden etwa um Faktor zehn erhöht exprimiert [5, 51, 52, 68]. Neben der Frage seiner Herkunft ist insbesondere die Frage nach seiner Funktion im Rahmen der pulmonalen Alveolarproteinose Gegenstand der aktuellen Forschung.

## 1.2.3 Das 20S Proteasom

Extrazellulär wie intrazellulär lassen sich unterschiedliche Proteasomtypen unterscheiden. Für alle Subtypen gilt: Im Zentrum befindet sich stets das so genannte „Core-Partikel“, das die eigentliche katalytische Einheit darstellt und auch als eigenständige Funktionseinheit auftritt. (s. Abb. 1).

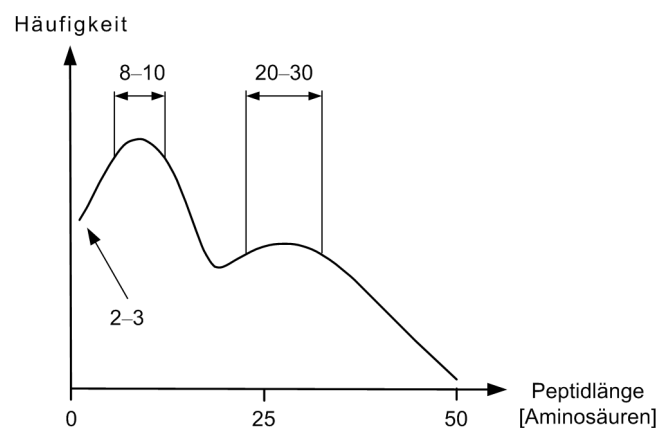


**Abb. 1: Ultrastruktur des 20S Proteasoms**

a) dreidimensionales Modell des 20S Proteasomzylinders (Core-Partikel), gebildet aus 2x7  $\alpha$ -Untereinheiten und 2x7  $\beta$ -Untereinheiten; b) planares Modell des abgerollten Proteasomzylinders: blau umrandet sind die drei proteolytisch aktiven Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , und  $\beta 5$ . Abb. entnommen aus Jung et al. [1].

An dessen Enden können ein bis zwei regulatorische Einheiten angelagert werden, die die Funktionalität stark beeinflussen. Das *Core*-Partikel hat die Form eines beidseits offenen Hohlzylinders mit den Außenabmessungen 160 x 100 Å und einem Innendurchmesser von 23 Å [69]. Es setzt sich aus 28 Untereinheiten (UE) zusammen, die jeweils Molekulargewichte von 20 bis 30 kDa besitzen [56, 70], was ein Gesamtmolekulargewicht von etwa 700 kDa ergibt. Beim Zentrifugieren des *Core*-Partikels ergibt sich ein Sedimentationskoeffizient von 20 Svedberg (20S). Tritt das *Core*-Partikel als eigenständige Funktionseinheit auf, wird es deshalb auch „20S Proteasom“ genannt. Die 28 UE des *Core*-Partikels bestehen aus zweimal sieben  $\alpha$ -UE und zweimal sieben  $\beta$ -UE, die ringförmig angeordnet sind. Die  $\beta$ -UE bilden eine Hauptkammer, in der der enzymatische Verdau stattfindet [56]. Die  $\alpha$ -UE bilden zwei Vorkammern.

**Enzymatische Aktivitäten als Funktion der  $\beta$ -Untereinheiten:** Von den insgesamt 14 strukturell unterschiedlichen UE sind drei UE ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$ ) enzymatisch aktiv [71–73]. Untersuchungen mit kurzen fluorogenen Peptidsubstraten ergaben, dass die Untereinheit  $\beta_1$  Peptidbindungen C-terminal von sauren Aminosäuren spaltet. Diese Enzymaktivität wird als „caspaseartig“ oder als PGPH-Aktivität (PGPH= *post-glutamyl-peptide-hydrolytic activity*) bezeichnet [74]. Die Untereinheit  $\beta_2$  spaltet Peptide C-terminal von basischen Aminosäuren und wird „trypsinartig“ genannt. Die dritte enzymatische Aktivität geht von der  $\beta_5$  Untereinheit aus und schneidet C-terminal von hydrophoben Aminosäuren und wird als „chymotrypsinartige“ Aktivität bezeichnet. Diese drei Aktivitäten werden als „klassische Aktivitäten“ bezeichnet [75]. Beim Verdau größerer Proteine entstehen Peptide mit einer Länge von 2 bis 35 Aminosäuren [76]. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich dabei eine dreigipflige Verteilung mit Maxima im Bereich von 2 bis 3, 8 bis 10 und 20 bis 30 Aminosäuren [77] (vgl. Abb. 2):



**Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Peptidlänge proteasomaler Verdauungsprodukte**

Beim Verdau von Proteinen durch das Proteasom zeigt die Häufigkeitsverteilung der entstehenden Peptide drei Maxima. Abbildung modifiziert in Anlehnung an Köhler et al. [77].



**Selektive Substrateinschleusung als Funktion der  $\alpha$ -Untereinheiten:** Die Hauptaufgaben der  $\alpha$ -UE sind die Erkennung von Substraten und deren selektive Einschleusung ins Proteasom [78]. Dadurch werden zum einen Proteine vor spontaner Degradation bewahrt, die nicht zum Abbau bestimmt sind, und zum anderen kann die Einstromrate von Substraten reguliert werden [58]. Dieser streng regulierte Mechanismus des kontrollierten Öffnens und Schließens des Proteasomzylinders wird als „*Gating*“ bezeichnet. Kristallographische Analysen zeigen, dass der *Gating*-Mechanismus durch Konformationsänderungen der  $\alpha$ -UE realisiert wird [78]. Im inaktiven, geschlossenen Zustand (Normalzustand) beträgt der Durchmesser an der Eintrittsstelle nur 9 Å [69]. Zum Öffnen des *Gates* sind geeignete Aktivatoren notwendig, z. B. die Anwesenheit bestimmter Ionen [1], hydrophobe Strukturen fehlgefalteter oder (oxidativ) beschädigter Substrate [79] oder das Anlagern von regulatorischen Kappen [80]. Im geöffneten Zustand erweitert sich der Durchmesser der Eintrittsstelle auf 13 bis 20 Å [69, 81, 82]. Bei inaktiviertem *Gate* kann 20S Proteasom nur dann als Protease fungieren, wenn der Durchmesser potentieller Substrate den Durchmesser des *Gates* nicht überschreitet. Für die Funktion als Peptidase, bei der die Substrate sehr viel kleiner sind, ist der Öffnungszustand des *Gates* unerheblich und behindert den Verdau in keinem Fall [1].

#### 1.2.4 Vergleich 20S Proteasom versus 26S Proteasom

Die beiden wichtigsten Erscheinungsformen des Proteasoms sind das 20S Proteasom und das 26S Proteasom. Beide Formen kommen gleichzeitig in derselben Zelle vor und führen eine Koexistenz. Vom Gesamtanteil des intrazellulären Proteasoms entfallen zwei Drittel auf das 20S Proteasom und ein Drittel auf Proteasomformen mit regulatorischen Kappen [83].

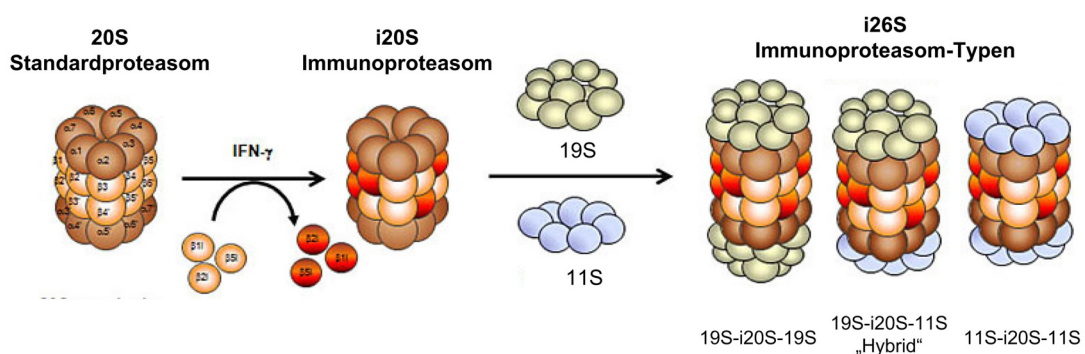
**20S Proteasom:** Das 20S Proteasom, als eigenständig funktionsfähiges *Core*-Partikel, degradiert vor allem (oxidativ) beschädigte intrazelluläre Proteine. Proteasomale Degradation über das 20S System geschieht ATP-unabhängig.

**26S Proteasom:** Das komplexer aufgebaute 26S Proteasom dagegen besteht aus einem 20S *Core*-Partikel mit zwei aufgesetzten 19S Kappen, die als regulatorische Einheiten dienen und besitzt ein Gesamtmolekulargewicht von 2.100 kDa [84]. Die 19S Kappen vermitteln die spezifische Erkennung ubiquitinerter Proteine und translozieren diese unter ATP-Verbrauch ins *Core*-Partikel [82, 85]. Die primären Aufgaben des 26S Ubiquitin-Proteasom-Systems sind der Abbau fehlgefalteter Proteine im Rahmen der Proteinbiosynthese [86] sowie der Abbau unbeschädigter Proteine, z. B. kurzlebige regulatorische Proteine der Signaltransduktionskaskade [87]. Die vorherige Ubiquitinierung

regulatorischer Proteine ist essenziell, da die Proteine unbeschädigt sind und deshalb bei fehlendem Ubiquitinsignal nicht als Substrate für das Proteasom dienen können. Proteasomale Degradation über das 26S System geschieht ATP-abhängig.

### 1.2.5 Das Immunoproteasom

Im Rahmen der Immunabwehr können unter dem induzierenden Einfluss von Zytokinen strukturell und funktionell abweichende Proteasomen synthetisiert werden, die als „Immunoproteasom“ bezeichnet werden. Die Existenz des Immunoproteasoms wurde erstmals 1994 gezeigt [88–90]. Als Induktoren für die Produktion von Immunoproteasomen werden die Zytokine Interferon gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), Tumornekrosefaktor alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ) und der Bakterienzellmembranbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben [91, 92]. Der Unterschied zum Standardproteasom besteht darin, dass bei der Neusynthese von Immunoproteasom statt der bekannten enzymatisch aktiven Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$  die Untereinheiten  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  und  $\beta_{5i}$  eingesetzt werden. Der Index „i“ steht für „induzierbar“. [88]. Es entsteht ein Immuno-20S-Proteasom (i20S). Sind nur eine oder zwei der drei enzymatisch aktiven UE ausgetauscht, wird es als „Intermediat-Typ-Proteasom“ bezeichnet. Zusätzlich zu den strukturellen Veränderungen im 20S Core-Partikel wird auch die Anlagerung regulatorischer Kappen, z. B. der 11S Kappe bzw. der 19S Kappe beobachtet. Trägt das i20S-Proteasom regulatorische Kappen, wird es ebenfalls Immunoproteasom oder i26S genannt. Handelt es sich um zwei unterschiedliche Kappen, dann wird die Bezeichnung Hybrid-Proteasom gewählt. Die Abb. 3 veranschaulicht die Verhältnisse:



**Abb. 3: Formen des Immunoproteasoms**

Unter dem Einfluss von Zytokinen (z. B. Interferon  $\gamma$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ) synthetisiertes i20S Immunoproteasom enthält im Gegensatz zum 20S Standard Proteasom die sog. induzierbaren Untereinheiten  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$ , und  $\beta_{5i}$ . Durch Anlagerung von regulatorischen 19S oder 11S Kappen ist die Bildung von drei verschiedenen i26S Formen möglich. Abbildung entnommen aus Angeles et al. [93].

Das Immunoproteasom degradiert z. B. Antigene innerhalb krebs- oder virusbefallener Zellen [94]. Es arbeitet im Vergleich zum 26S-Proteasom mit einer höheren Degradationsrate und produziert kürzere Peptide mit einer Länge von nur 8 bis 10 Aminosäuren [95]. Diese werden an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) der Klasse I gebunden und zur Antigenpräsentation benutzt [88]. Auch das Schnittverhalten unterscheidet sich beim Immunoproteasom von dem des Standardproteasoms. Es zeigt verstärkte Aktivität für trypsinartiges Schnittverhalten und reduzierte Aktivität für caspaseartiges Schnittverhalten [96, 97]. Für die chymotrypsinartige Aktivität gibt es widersprüchliche Untersuchungen. Dahlmann et al. beschreiben eine reduzierte chymotrypsinartige Aktivität [96], während Gaczynska et al. eine Erhöhung berichten [97].

Neben den immunologischen Funktionen wurde gezeigt, dass auch oxidierte Proteine geeignete Substrate für das Immunoproteasom darstellen [98, 99]. Durch Anlagerung von zwei regulatorischen 11S Kappen an das 20S Proteasom wird die enzymatische Aktivität beim Verdau oxidierter Proteine gesteigert [100]. Aufgrund dieser und weiterer nicht-immunologischer Funktionen wird in jüngster Zeit für das Immunoproteasom die Bezeichnung „induzierbares Proteasom“ propagiert [101, 102].

### 1.3 Die Rolle des 20S Proteasoms bei oxidativem Stress

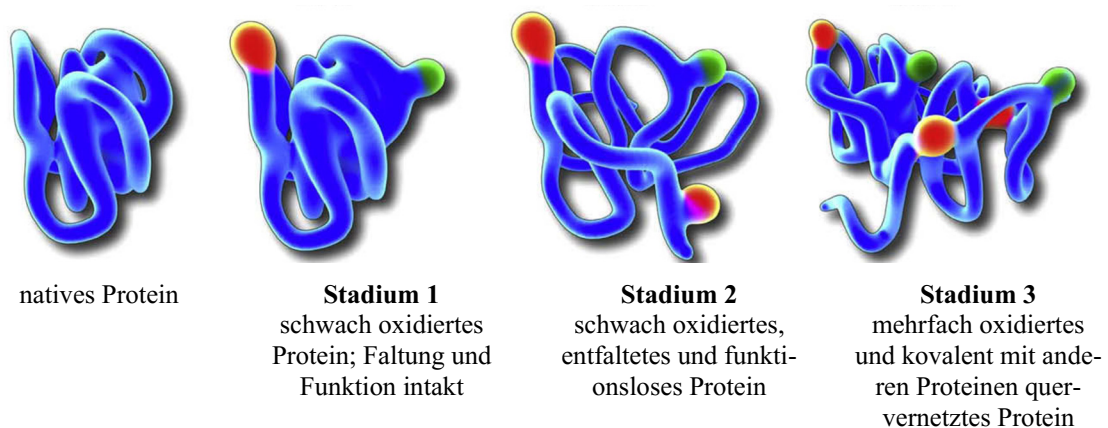
Die zentrale Aufgabe des 20S Proteasoms ist die Degradation oxidativ beschädigter Proteine [102–108]. Chaperone, insbesondere das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), können beim Verdau oxidierter Proteine durch das 20S Proteasom assistieren [109].

#### 1.3.1 Oxidativer Stress

Eine Stoffwechsellage wird dann als oxidativer Stress bezeichnet, wenn ein Missverhältnis zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien mit Überwiegen der Oxidanzien vorliegt, das in der Lage ist Schaden anzurichten [110]. Oxidativer Stress entsteht zum einen als physiologisch auftretendes Nebenprodukt aus der oxidativen Phosphorylierung und aus dem Stoffwechsel der Oxidoreduktasen [111] sowie durch Makrophagen, die reaktive Sauerstoffspezies zur Vernichtung von Mikroorganismen abgeben [103]. Außerdem führen zahlreiche exogene Noxen (wie UV-Strahlung, Ozon, Stickoxide, Stäube, sowie bestimmte Medikamente und Industriechemikalien) zur Entstehung von oxidativem Stress [111]. Oxidative Beschädigungen von Proteinen werden durch freie Ra-

dikale (z. B. radikale Sauerstoff- oder Stickstoffspezies) oder durch nicht-radikalische Oxidanzien (z. B. Wasserstoffperoxid) hervorgerufen. Wasserstoffperoxid spielt eine physiologische Rolle bei der Proteindegradation in Makrophagen und entsteht außerdem als Nebenprodukt verschiedener Enzymreaktionen.

Bereits in den 1990er Jahren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress Aminosäuren modifizieren kann [112] und darüber hinaus sogar das Kohlenstoffgerüst eines Proteins zerstören kann. Je nachdem, wie stark der oxidative Stress ausgeprägt ist, treten drei verschiedene Stadien der Proteinoxidation ein [105], die in Abb. 4 dargestellt sind.



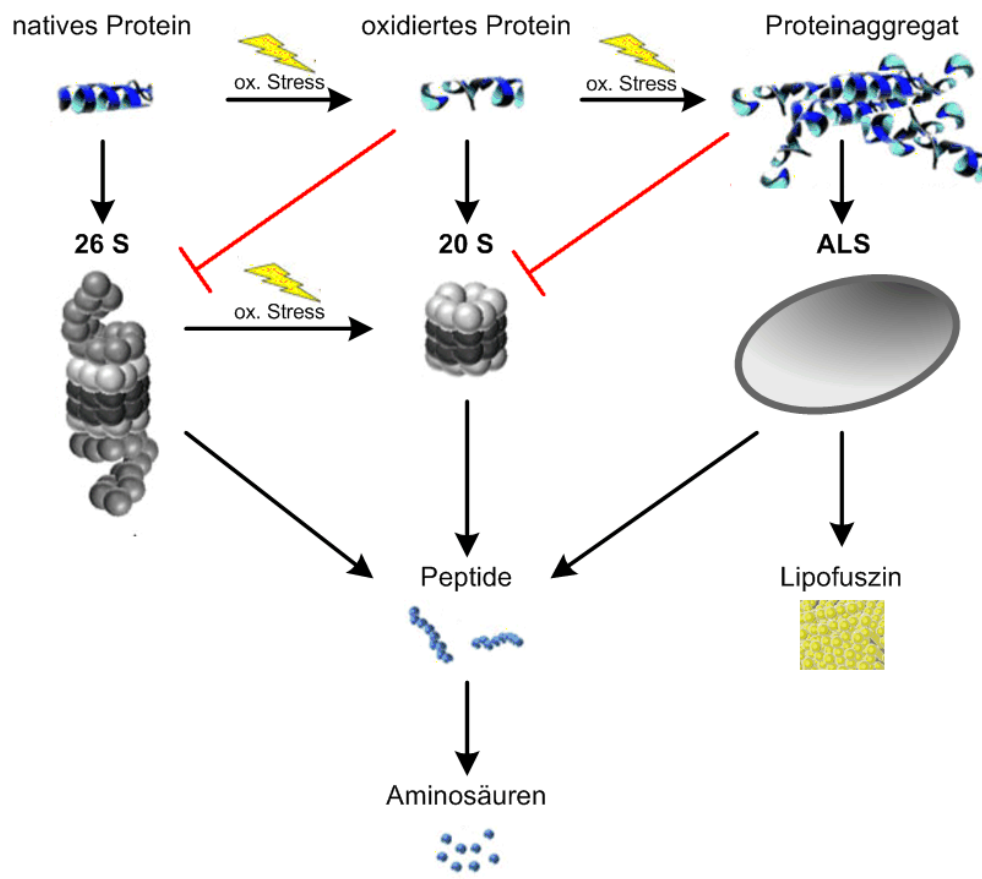
**Abb. 4: Stadieneinteilung der Proteinoxidation**

Native Proteine zeigen bei oxidativem Stress, abhängig von dessen Stärke, strukturelle und funktionelle Veränderungen, die nach Jung et al. [105] in drei Stadien eingeteilt werden. Abb. entnommen aus [105].

Das native Protein stellt die in der Natur vorkommende aktive und unbeschädigte Form des Proteins dar. Oxidationen kommen lediglich in Form intramolekularer Disulfidbrücken zwischen Cysteinen vor. Ansonsten besitzen native unbeschädigte Proteine keine weiteren Oxidationen an anderen Aminosäuren und befinden sich in ihrem korrekten Faltungszustand. Unter dem Einfluss mäßigen oxidativen Stresses bildet sich das Stadium 1 aus, in dem es zur Oxidation einzelner Aminosäuren kommt. Am empfänglichsten dafür sind Cystein und Methionin [113]. Die korrekte Faltung des Proteins bleibt dabei zunächst erhalten. Es resultiert aber eine verminderte Aktivität des Proteins [105]. Bei stärkerem oxidativem Stress geht das Protein in Stadium 2 über, in dem es neben der Oxidation einzelner Aminosäuren auch seine korrekte Faltung verliert und dadurch inaktiv wird. Unter dem Einfluss starker Oxidation häufen sich die Oxidationen von Aminosäuren und es kommt zusätzlich zur Ausbildung von kovalenten Querverbindungen zwischen beschädigten Proteinen. Dies führt zur Bildung von Proteinaggregaten (Stadium 3) [114]. Im Rahmen der Krankheit PAP ist eine besondere Belastung der Lunge durch oxidativen Stress gegeben, die an der *in vivo* vorhandenen Oxidation des lungen-spezifischen Proteins Surfactant A nachweisbar ist [49].

### 1.3.2 Proteasomfunktion bei oxidativem Stress

**Abbau oxidativ veränderter Proteine:** Unbeschädigte sowie durch Fehlfaltung funktionell gestörte Proteine werden mit Ubiquitin markiert und über das 26S Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut [86, 87]. Schwach oxidierte aber strukturell noch intakte Proteine (Stadium 1) werden von Reparaturenzymen wiederhergestellt [115, 116]. Stark oxidierte Proteine dagegen, die bereits Proteinaggregate gebildet haben (Stadium 3), sind irreparabel geschädigt und werden über das Autophagie-Lysosom-System (ALS) abgebaut [117]. Der Abbau irreparabel oxidativ beschädigter Proteine ohne Aggregatbildung (Stadium 2) ist das Aufgabengebiet des 20S Proteasoms [103–108]. Die Abb. 5 gibt einen Überblick über die genannten Abbauwege.



**Abb. 5: Schematische Übersicht der intrazellulären Abbauwege von Proteinen**

Oxidativer Stress (ox. Stress) modifiziert die Proteinstruktur und kann zur Bildung von Proteinaggregaten führen. Native Proteine werden nach Ubiquitinierung vom 26S Proteasom abgebaut, schwach oxidierte Proteine vom 20S Proteasom, Proteinaggregate vom Autophagie-Lysosom-System (ALS). Oxidierte Proteine hemmen die Funktion des 26S Proteasoms, und Proteinaggregate hemmen die Funktion des 20S Proteasoms (rote Linien). Unter oxidativem Stress disassembliert 26S Proteasom zu 20S Proteasom. Abbildung modifiziert in Anlehnung an Grimm et al. [58].

**Einfluss von oxidativem Stress auf das Proteasom:** In Abwesenheit von oxidativem Stress ist das 26S Proteasom die bedeutendste Funktionseinheit zum Abbau von Proteinen [103]. Oxidativ beschädigte Proteine, Proteinaggregate und oxidierte Lipide inhibieren es jedoch in seiner Funktion [118]. Unter akuten Attacken von oxidativem Stress disassembliert 26S Proteasom sogar und zerfällt in sein 20S *Core*-Partikel und zwei freie 19S Kappen [119]. Das 20S Proteasom und das Immunoproteasom dagegen verhalten sich unter oxidativem Stress stabil [99, 118] und sind auch unter diesen Bedingungen hochpotent beim Abbau oxidativ beschädigter Proteine [120].

### 1.3.3 Chaperone als Assistenten beim Abbau oxidativ beschädigter Proteine

Chaperone können bei der Degradation oxidierter Proteine durch das 20S Proteasom assistieren [109, 121, 122]. Das Chaperon Hsp90 wird unter oxidativem Stress vermehrt synthetisiert [123, 124]. Co-Lokalisation von Hsp90 mit Proteasom wird häufig beobachtet [123, 125] und wurde auch im Alveolarraum nachgewiesen [2]. Unter physiologischen Bedingungen, in denen eine Zelle keinem oxidativen Stress ausgesetzt ist, wirkt Hsp90 als negativer Regulator der Proteasomfunktion [103, 126]. Wird die Zelle dagegen oxidativem Stress ausgesetzt, kehrt sich seine Rolle um, und Hsp90 schützt die proteasomale Funktion vor Inaktivierung [122, 127]. Für bestimmte oxidierte Substrate konnte sogar gezeigt werden, dass sie erst in Anwesenheit von Hsp90 zum Substrat für das 20S Proteasom werden [128].

## 1.4 Ziele der Arbeit

Das Proteasom ist ein elementarer Regulator der intrazellulären Proteinhomöostase. Enzymatisch aktives 20S Proteasom wurde auch extrazellulär im Alveolarraum nachgewiesen [2, 5, 39, 51]. Die pulmonale Alveolarproteinose (PAP) ist eine Lungenerkrankung, bei der (verglichen mit lungengesunden Individuen) im Alveolarraum stark erhöhte Proteinkonzentrationen und gleichzeitig stark erhöhte Proteasomkonzentrationen vorliegen [3, 5, 33]. Wie der Oxidationsstatus der alveolären Proteine bei PAP aussieht, wodurch die enzymatische Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP beeinflusst wird und ob die alveolären Proteine bei PAP geeignete Substrate für das Proteasom sind, ist unklar.

Es war das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit, Testsysteme zur Charakterisierung von Proteasomaktivitäten und zum Verdauverhalten des 20S Proteasoms zu entwi-

ckeln und an Modellpeptiden und -proteinen sowie exemplarisch an Probenmaterial aus PAP-Patienten anzuwenden. Im Einzelnen waren die Ziele:

1. Exemplarische quantitative und qualitative Analyse von Proteinen aus der BAL von PAP-Patienten.
2. Aufbau eines Testsystems zur Messung der enzymatischen Aktivität von 20S Proteasom und Anwendung des Testsystems an extrazellulärem alveolärem 20S Proteasom eines PAP-Patienten, sowie an intrazellulärem 20S Proteasom aus den Erythrozyten gesunder Probanden.
3. Entwicklung und Anwendung eines Testsystems zur Analyse des Verdauverhaltens des 20S Proteasoms, insbesondere im Hinblick auf:
  - den Einfluss der Umgebungsbedingungen (Puffer, Zeit, Temperatur, denaturierende Bedingungen),
  - den Einfluss der dreidimensionalen räumlichen Struktur eines Proteins,
  - den Einfluss von oxidativem Stress
  - und den Einfluss des Chaperons Hsp90.

Hierfür wurden anhand einer exemplarischen PAP-BALF das Gesamtprotein mit dem Verfahren nach Lowry quantifiziert und die prominentesten Proteine nach Auftrennung mittels 1D Gelelektrophorese und In-Gel-Verdau mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie identifiziert.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des alveolären Proteasoms wurde ein fluoreszenzoptischer Assay verwendet. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Aktivitäten verschiedener 20S Proteasomchargen, die aus humanen Erythrozyten gewonnen wurden. Weiterhin wurde mit Hilfe dieses Assays die Enzymaktivität von alveolärem Proteasom einer PAP-BALF quantifiziert und mit den erstgenannten Ergebnissen verglichen.

Um die Frage zu beantworten, ob die in der BALF von PAP Patienten identifizierten komplexen Proteine geeignete Substrate für das 20S Proteasom sind, wurden *in vitro* Versuche zum Verdauverhalten mit dem 20S Proteasom aus Erythrozyten durchgeführt. Insbesondere wurde hier der Einfluss von Proteindenaturierung (zum Aufbrechen nativer 3D-Strukturen), der Einfluss von Proteinoxidation (zur Simulation des alveolären oxidativen Stresses), der Einfluss des Chaperons Hsp90 und der Einfluss verschiedener Umgebungsbedingungen untersucht. Die Verdauprodukte wurden mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie charakterisiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Probenmaterial

#### 2.1.1 Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien folgender Hersteller verwendet: Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (München), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Enzo Life Sciences (Lörrach) bzw. Biozol Diagnostica (Eching). Außerdem kam Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage zum Einsatz. Lyophilisiertes humanes Serumalbumin (Molekulargewicht 66.478 Da, Produktnummer A3782) und lyophilisiertes rekombinantes Humaninsulin (Produktnummer I2643) wurden von Sigma Aldrich (München) bezogen. Folgende Puffer wurden verwendet.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des HEPES-Puffers**

Substanz		Konzentration [mM]	Molekulargewicht [g/mol]
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	20	238,31
MgAc <sub>2</sub>	Magnesiumazid	2	214,46
DTT	Dithiothreitol	1	154,25

pH = 7,8 eingestellt mit NaOH

**Tabelle 2: Zusammensetzung des TEAD-Puffers**

Substanz		Konzentration [mM]	Molekulargewicht [g/mol]
TRIS-HCl	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol-Hydrochlorid	20	157,60
Na-EDTA	Natrium-Ethylen-Diamintetraacetat	1	414,20
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid	1	65,01
DTT	Dithiothreitol	1	154,25

pH = 7,2 eingestellt mit NaOH

**Tabelle 3: Zusammensetzung des TRIS-Puffers**

Substanz		Konzentration [mM]	Molekulargewicht [g/mol]
TRIS-HCl	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol-Hydrochlorid	20	157,60
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	2	203,30
DTT	Dithiothreitol	1	154,25

pH = 7,8 eingestellt mit KOH



### 2.1.2 Bronchoalveoläre Lavage bei PAP

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BALF-Proben von zwei verschiedenen PAP-Patienten untersucht. Die beiden Proben (Probennamen WLL48 und WLL4) wurden von Prof. Dr. med. U. Costabel aus der Ruhrlandklinik, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen gGmbH, Abteilung Pneumologie-Allergologie dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung erfolgte dort im Rahmen einer therapeutischen BAL nach dem klassischen Verfahren von Ramirez et al. [129]. Es handelt sich bei beiden Proben um aliquotierte Teilvolumina aus dem ersten zurückgewonnenen Liter der instillierten NaCl 0,9 % Lösung. Für die Gewinnung, die Einlagerung und die Untersuchung der BALF-Proben liegt eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen vor (Ethikvotum 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“).

### 2.1.3 Alveoläres Proteasom

Alveoläres Proteasom lag als Bestandteil der o. g. beiden BALF-Proben (WLL4 und WLL48) zweier PAP-Patienten vor. Die Konzentration in den beiden Proben betrug (mitgeteilt von PD Dr. Stephan Sixt): 1.730 ng/ml (Probe WLL48) bzw. 1.996 ng/ml. (Probe WLL4). Eine Isolierung des Proteasoms aus der BALF ist in der praktischen Umsetzung sehr aufwändig und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

### 2.1.4 Erythrozytäres 20S Proteasom

Erythrozytäres 20S Proteasom (isoliert aus humanen Erythrozyten, h-Ery) wurde für einen Teil der Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Es kamen drei unterschiedliche Chargen der Proteasompräparation h-Ery (Ch 1, 2, 3) zum Einsatz, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Burkhardt Dahmann, Institut für Biochemie an der Charité in Berlin gewonnen und uns dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich dabei um gepoolte Proben, denn die in der jeweiligen Charge enthaltenen Proteasomen wurden aus gepoolten Blutproben mehrerer Spender isoliert. Das erythrozytäre Proteasom wurde in einer Trägerlösung aus 50 % Glycerin und 50 % TEAD-Puffer (20mM Tris/HCl, 1mM Natrium-Ethylen-Diamintetraacetat 1mM Natriumazid, 1mM DTT, pH 7,2) zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Biochemische Trennverfahren

### 2.2.1 Dialyse

Das Verfahren der Dialyse wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um die aus humanen Erythrozyten gewonnenen Proteasompräparationen sowie gelöstes Albumin aufzureinigen.

**Aufreinigung der h-Ery-Proteasompräparation:** Ziel war es, Glycerin (Molekulargewicht: ca. 92 Da) und Puffersubstanzen zu entfernen. Dafür kamen Dialysatoren des Typs „Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn) zum Einsatz. Die Porengröße der Dialysemembran (*Cut off*) betrug 10 kDa. Die Dialyse erfolgte in zwei Schritten jeweils gegen 2 l Reinstwasser für jeweils 30 min.

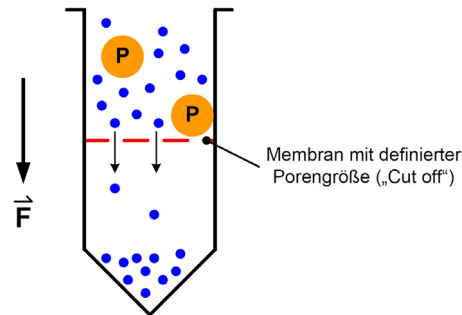
**Aufreinigung von Albumin-Lösung:** Ziel war es, mögliche kleinmolekulare Verunreinigungen und Albumin-Fragmente zu entfernen. Dafür kamen Dialysatoren des Typs „Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn) zum Einsatz. Die Porengröße der Dialysemembran (*Cut off*) betrug 10 kDa. Die Dialyse von 100 µl gelöstem humanem Serumalbumin erfolgte gegen 2 l Reinstwasser für 120 min.

### 2.2.2 Größenausschlusszentrifugation

Die Größenausschlusszentrifugation dient der Trennung von flüssigen Stoffgemischen nach einem definierten Molekulargewicht. Unter Einwirkung der Zentrifugalkraft erfolgt die Trennung innerhalb eines Zweikammergefäßes durch Einsatz einer Membran mit definierter Porengröße (*Cut off*, s. Abb. 6).

Das Verfahren wurde verwendet zum Entfernen von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und nicht-proteasomaler Degradationsprodukte aus einem Gemisch von 20S Proteasom und Albumin. Es kamen Zentrifugenfilter des Typs „Amicon“ (Amicon Ultra-0,5ml Centrifugal Filter for DNA and Protein Purification and Concentration, 50 MWCO, Fa. Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Ein *Cut off* von 50 kDa war geeignet, um Wasserstoffperoxid aus dem Gemisch zu entfernen und Protein zurückzuhalten. In die obere Kammer wurden bis zu 0,5 ml Probe eingefüllt und bei 14.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die Flüssigkeit in der unteren Kammer wurde danach verworfen. Um die Reinheit der Probe zu erhöhen, erfolgten zwei weitere Waschschr

gabe von Reinstwasser in die obere Kammer und nachfolgendem Abzentrifugieren. Das hochmolekulare Albumin wurde im „*Re-Spin*“-Verfahren durch umgedrehtes Einlegen des Amicon-Filters in die Zentrifuge aus dem Filter zurückgewonnen. Der *Re-Spin* erfolgte für 2 min bei 1.000 x g.



**Abb. 6: Funktionsprinzip der Größenausschlusszentrifugation**

Unter Einwirkung der Zentrifugalkraft (F) werden die Proteine (P) von einer Membran mit definierter Porengröße („*Cut off*“) zurückgehalten und dadurch von Lösungsmitteln und Molekülen getrennt, deren Größe unterhalb des *Cut offs* liegt.

### 2.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Der Assay nach Lowry ist ein etabliertes photometrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Lösung [130], der hier zur Ermittlung des Proteingehalts von BALF angewandt wurde. Zunächst erfolgte die Inkubation der Proben unbekanntem Proteingehalts mit den Reagenzien aus Tabelle 4 (im Verhältnis A:B:C = 100:1:1) für 10 min bei Raumtemperatur.

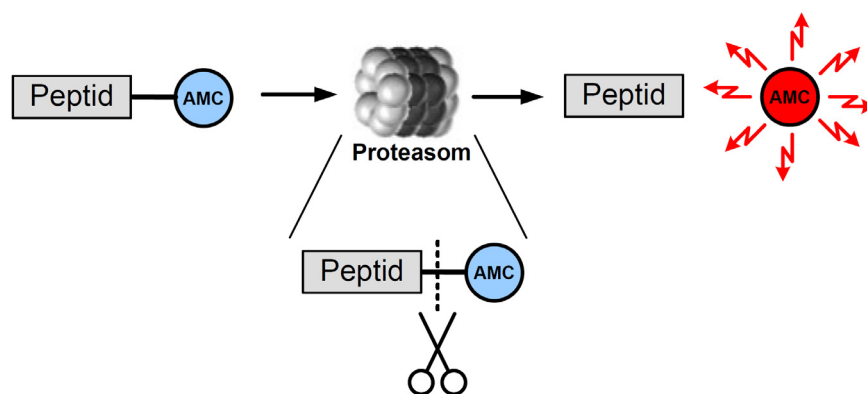
**Tabelle 4: Reagenzien für den Assay nach Lowry**

Reagenzien	Substanz	Dosierung
Reagenz A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 g in 500 ml NaOH (0,1 M)
Reagenz B	K-Na-Tartrat	2 g ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Reagenz C	CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	1 g ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Im zweiten Schritt wurde Folin-Reagenz zugegeben (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, s. [131], Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur), wodurch eine Blaufärbung erzeugt wurde. Aus der photometrisch gemessenen Intensität (Messgerät: Synergy 2 Multi-Mode Reader, BioTek<sup>®</sup> Instruments, Vermont, USA) der Blaufärbung wurde durch Abgleich mit einem Proteinstandard aus gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) der Proteingehalt der Probe quantifiziert.

## 2.4 Messung der enzymatischen Aktivität von Proteasom

Zur Bestimmung der drei klassischen proteolytischen Aktivitäten von Proteasomen (trypsinartige, chymotrypsinartige und caspaseartige Aktivität) wurde ein Assay angewandt, der auf einer Enzym-Substrat-Reaktion mit Proteasom als Enzym und fluorogenen Testpeptiden als Substrate basiert (s. Abb. 7). Der hier eingesetzte Assay basiert auf dem Verfahren von Dahlmann et al. [96]. Als Reaktionsprodukt entsteht das fluoreszierende 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC).



**Abb. 7: Funktionsprinzip des Enzymassays zur Messung der Proteasom-Aktivität**

Beim Verdau des Testpeptids löst das Proteasom die chemische Bindung zwischen der Peptidkette und der Fluoreszenzsonde (AMC) auf, wodurch freies AMC entsteht, das Fluoreszenzsignale emittiert.

Durch Messung der Fluoreszenz wird eine quantitative Aussage über die umgesetzte Substratmenge und damit über die enzymatische Aktivität des Proteasoms ermöglicht. Folgende Reagenzien wurden für den Assay verwendet:

**Fluorogene Testpeptide:** Zur Untersuchung der klassischen drei Aktivitäten wurden die drei fluorogenen Testsubstrate aus Tabelle 5 eingesetzt (Bachem, Bubendorf, Schweiz), die jeweils eine charakteristische Schnittstelle für die entsprechende Enzymaktivität besitzen. An die Testpeptide mit einer Länge von drei bis vier Aminosäuren ist an einem Ende eine Schutzgruppe (Succinyl = Suc, Benzoyl = BZ, bzw. Benzyloxycarbonyl- = Z) gebunden, die einen proteolytischen Angriff auf dieser Seite verhindert, sowie am anderen Ende ein AMC-Molekül. Die Stammlösungen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel (10 mM Suc-LLVY-AMC, 4 mM BZ-VGR-AMC sowie 4 mM Z-LLE-AMC) wurden in TEAD-Puffer auf die benötigten Endkonzentrationen verdünnt: 200  $\mu$ M Suc-LLVY-AMC, 400  $\mu$ M, BZ-VGR-AMC sowie 400  $\mu$ M Z-LLE-AMC.

**Tabelle 5: Fluorogene Testsubstrate zur Messung der enzymatischen Aktivität von Proteasom**

Testpeptid	charakteristische Schnittstelle	Enzymaktivität
<i>BZ</i> – VGR – AMC	C-terminal von Arginin	trypsinartig
<i>Suc</i> – LLVY – AMC	C-terminal von Tyrosin	chymotrypsinartig
<i>Z</i> – LLE – AMC	C-terminal von Glutamat	caspaseartig

Schutzgruppen kursiv dargestellt (*BZ*: Benzoyl, *Suc*: Succinyl, *Z*: Benzyloxycarbonyl), die Aminosäure-abfolge im Ein-Buchstaben-Code. AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) fungiert als Fluoreszenzsonde

**Stopp-Lösung:** Nach Ablauf der Inkubationszeit von Proteasom und Substrat wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopp-Lösung beendet. Es wurde für einen Teil der Versuche Ethanol (99,8 %) und für einen Teil der Versuche die in Tabelle 6 beschriebene Lösung verwendet.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Stopp-Lösung für den Enzymassay zur Messung der Proteasom-Aktivität**

Substanz	Konzentration [mM]	Molekulargewicht [g/mol]
Natrium-Chlor-Azetat	100	116,47
Natrium-Azetat	30	82,03
Essigsäure	70	60,00

### 2.4.1 Enzym-Assay zur Messung der Proteasom-Aktivität

Die Proteasomaktivität wurde mit Hilfe des folgenden Versuchsaufbaus gemessen. Die zu untersuchende Proteasompräparation wurde zusammen mit fluorogenen Testpeptiden auf eine 96-Well-Platte in verschiedenen Enzym-Substrat-Verhältnissen pipettiert und für eine definierte Zeit bei 37°C in TEAD-Puffer (s. Tabelle 2) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl einer der o. g. Stopp-Lösungen beendet. Es erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Fluorometer (Synergy 2 Multi-Mode Reader, BioTek® Instruments, Vermont, USA, Anregung mit  $\lambda=350$  nm, Emissionsmessung mit  $\lambda=460$  nm im Messmodus „top400“). Die Fluoreszenzintensität korreliert direkt linear mit der Menge an umgesetztem Substrat.

Mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Eichreihe als Grundlage (s. Abschnitt 2.4.2) wurde über die Beziehung aus Gleichung (2.1) der Substratumsatz in Mol errechnet. Die variablen Größen für die enzymatische Aktivität des Proteasoms sind die eingesetzte Menge Proteasom, der molare Substratumsatz und die Inkubationszeit. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur wurden spezifische Aktivitäten (s. Abschnitt 2.4.3) berechnet. Die Aktivität wurde dabei entweder auf die molare

Menge an eingesetztem Proteasom nach Gleichung (2.3) oder auf die Masse an eingesetztem Proteasom nach Gleichung (2.4) normiert.

### 2.4.2 Eichreihe mit AMC

Um von der gemessenen Fluoreszenz auf die molare Menge an freiem AMC schließen zu können, wurde zuvor als Referenz eine Eichreihe mit AMC angefertigt. Dazu wurde freies AMC in verschiedenen Verdünnungsstufen der Fluoreszenzmessung unterzogen. Als Lösungsmittel wurde DMSO eingesetzt. Ausgehend von einer AMC-Startkonzentration von 3000 pmol/ml wurde eine siebenstufige Verdünnungsreihe hergestellt, bei der sich die AMC-Konzentration jedes Mal halbiert. Von den AMC-Verdünnungen wurden jeweils 200 µl als Doppelproben auf eine 96-Well-Platte pipettiert und fluorometrisch gemessen. Die Ausgleichskurve durch die Messwerte der acht Verdünnungsstufen zeigte lineares Verhalten. Abzüglich der Null-Werte von Testansätzen, die lediglich DMSO enthielten, wird das lineare Verhalten mit folgender Ausgleichsgeraden beschrieben:

$$y = 2,77 x + 10 \quad (2.1)$$

Daraus folgt der lineare Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenz ( $y$ ) und eingesetzter AMC-Stoffmenge ( $x$ ) in pmol:

$$x = \frac{y - 10}{2,77} \quad [pmol] \quad (2.2)$$

Mit Hilfe von Gleichung (2.2) wurde die umgesetzte Substratmenge berechnet.

### 2.4.3 Spezifische enzymatische Aktivität

Um eine Vergleichbarkeit mit Literaturwerten herstellen zu können, bietet sich die Angabe der Aktivität bzw. der spezifischen Aktivität normiert auf die eingesetzte Enzymmenge in Mol oder Gramm an. Die enzymatische Aktivität des Proteasoms wird in Katal (kat) angegeben. Die Einheit Katal ergibt sich aus dem Substratumsatz (in Mol) pro Zeiteinheit (in Sekunden). Normiert auf die eingesetzte Enzymmenge in Mol ergibt sich die spezifische Aktivität:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Substratumsatz} [\text{mol}]}{\text{Inkubationszeit} [\text{s}] \cdot \text{Enzymmenge} [\text{mol}]} \left[ \frac{\text{kat}}{\text{mol}} \right] \quad (2.3)$$

Alternativ kann die spezifische Aktivität auch auf die eingesetzte Enzymmasse in Gramm normiert werden:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Substratumsatz} [\text{mol}]}{\text{Inkubationszeit} [\text{s}] \cdot \text{Enzymmenge} [\text{g}]} \left[ \frac{\text{kat}}{\text{g}} \right] \quad (2.4)$$

## 2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionale Gelelektrophorese (1D-Gelelektrophorese) ist eine Standardmethode, um Proteine eines Proteingemisches nach ihrem Molekulargewicht zu trennen und wurde 1970 von Lämmli entwickelt [132]. Die Trennung erfolgt innerhalb einer Polyacrylamid (PAA)-Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Felds. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteinproben zunächst mit Lämmli-Puffer (vgl. [132]) vermischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und auf eine 11 % PAA-Gelmatrix aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 90 min. Nach Anfärbung mit dem Farbstoff „Coomassie Brilliant Blau“ nach dem Verfahren von Dyballa und Metzger [133], das eine Modifikation des Verfahrens nach Kang et al. [134] darstellt, waren die aufgetrennten Proteine als Banden sichtbar.

## 2.6 In-Gel-Verdau

Zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen aus einer Gelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit als vorbereitender Schritt ein In-Gel-Verdau (IGV) durchgeführt. Beim IGV handelt es sich um eine Technik zur Verdauung und Extraktion von Proteinen aus einer Gelmatrix, das von Rosenfeld et al. im Jahr 1992 entwickelt wurde [135]. Der IGV besteht aus vier Teilschritten: 1. Entfärbung, 2. Reduktion und Alkylierung, 3. Proteinverdau durch eine Protease und 4. Extraktion und Elution der Produkte. Zur Durchführung eines IGV wurden die Reagenzien aus Tabelle 7 verwendet:

**Tabelle 7: Reagenzien für den In-Gel-Verdau**

Entfärbelösung	Ethanol, 96 %-ig	10 %
	Ortho-Phosphosäure, 100 %-ig	2 %
	Wasser	88 %
Waschpuffer 1	Ammonium-Hydrogencarbonat, 25 mM	50 %
	Acetonitril	50 %
Waschpuffer 2	Acetonitril	100 %
Trypsinpuffer	Ammonium-Hydrogencarbonat, 25 mM, pH 8,0, eiskalt	100 %
Trypsinlösung	Trypsin	20 µg
	Trypsinpuffer	200 µl
Elutionspuffer	Acetonitril	50 %
	Ameisensäure	5 %
	Wasser	45 %

**1. Entfärbung:** Zunächst wurden die zu untersuchenden Proteinbanden mit einem Skalpell aus der Gelmatrix ausgeschnitten und in Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm gestückelt. Über Nacht erfolgte die Entfärbung der Coomassie-gefärbten Proteine mit der Entfärbelösung unter ständiger Bewegung auf einem Rotationsschüttler. Die Entfärbelösung wurde am nächsten Tag abgenommen und verworfen. Es folgten vier Waschschrte von jeweils 30 min mit Waschpuffer 1 und ein Waschschrte à 30 min mit Waschpuffer 2 bei jeweils etwa 100 µl Arbeitsvolumen pro Teilschritt. Die entfärbten Gelstücke wurden mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

**2. Reduktion und Alkylierung:** Ziel war es, durch irreversible Trennung der Disulfidbrücken eine offene 3-D-Struktur des Proteins zu erhalten, die dem Verdauungsenzym bestmögliche Angriffsstellen bietet. Da die Proteine im vorliegenden Fall aus einer Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen stammten, konnte auf den Reduktions- und Alkylierungsschritt verzichtet werden.

**3. Verdau:** Nun folgte der In-Gel-Verdau im engeren Sinne mit Trypsin als Protease. Die Serinprotease Trypsin schneidet auf der C-terminalen Seite der Aminosäuren Arginin und Lysin. Zunächst wurden getrockneten und entfärbten Gelstücke mit einem gleichen Volumen eiskalter Trypsinlösung versetzt. Nach 30 min wurde der Überstand verworfen, d. h. überschüssiges Trypsin entfernt, und die Gelstücke mit dem gleichen Volumen Trypsinpuffer versetzt. Die Inkubation im Trypsinpuffer erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

**4. Extraktion und Elution:** Im letzten Schritt des IGV wurden die Produkte des Trypsinverdaus aus der Gelmatrix extrahiert und in Lösung gebracht. Dazu wurde am Folgetag des Verdaus der Überstand des Trypsinverdaus abgenommen und gesammelt.



Er enthielt bereits einen Teil der entstandenen Peptide. Die restlichen Peptide, die noch in der Gelmatrix gebunden waren, wurden extrahiert. Dazu wurden zwei Teile Wasser auf die Gelstücke gegeben und das Reaktionsgefäß für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Dadurch wurden die Peptide unter Einfluss der Ultraschallwellen mechanisch aus der Gelmatrix herausmobilisiert. Der Überstand wurde gesammelt. Darauf folgten drei Elutionsschritte mit jeweils einem Volumen Elutionspuffer sowie ein Waschschrift mit einem Volumen Waschpuffer 2 für jeweils 30 min. Die Überstände wurden auch hier gesammelt und mit den Überständen aus den vorherigen Arbeitsschritten zusammengeführt. Das Gesamt-Eluat (in Form aller gesammelten Überstände) enthielt die erhaltenen Peptide und wurde in der Vakuumentrifuge bis zur Trockene eingedampft. Das Probengefäß mit den getrockneten Peptiden wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) dient als Messverfahren zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Sie wurde 1918 von Francis Aston erstmals realisiert [136] und im Rahmen dieser Arbeit zur Identifikation von Proteinen und Peptiden eingesetzt. Um die hitzeempfindlichen Proteine zerstörungsfrei untersuchen zu können, wurde die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), die ein hitzeunabhängiges Verfahren zur Überführung der Analyten in die Gasphase darstellt, verwendet.

**Arbeitsablauf der massenspektrometrischen Proteinanalyse:** Mit Hilfe der ESI-MS Technologie konnten unbekannte, in Lösung befindliche Proteine und Peptide identifiziert werden, indem deren exakte Masse bzw. deren Aminosäureabfolge bestimmt wurde (Sequenzierung). Die Identifikation verlief in folgenden Arbeitsschritten:

1. Probenvorbereitung
  - a. Protein-Isolierung
  - b. Enzymatische Spaltung
  - c. Entsalzung
2. Massenspektrometrie:
  - a. Übersichtsspektrum (MS-Spektrum) des Peptidgemischs zur Bestimmung der Massen aller enthaltenen Peptide aufnehmen
  - b. Fragmentspektren (MS/MS-Spektrum) jedes einzelnen Peptides zur Sequenzierung der Peptide aufnehmen

3. Identifikation des Proteins manuell oder mit Hilfe von Datenbanken
  - a. anhand der Peptidmasse (*Peptide Mass Fingerprint*-Verfahren, PMF)
  - b. anhand der Peptidsequenz (MS/MS-Verfahren)

### 2.7.1 Probenvorbereitung

**Proteinisolierung:** Zunächst wurden die bereits beschriebenen Trennverfahren Dialyse, Größenausschlusszentrifugation und Gelelektrophorese angewandt, um aufgereinigte Proteinlösungen herzustellen, da massenspektrometrische Analysen an Proteingemischen i. d. R. nicht erfolgreich sind.

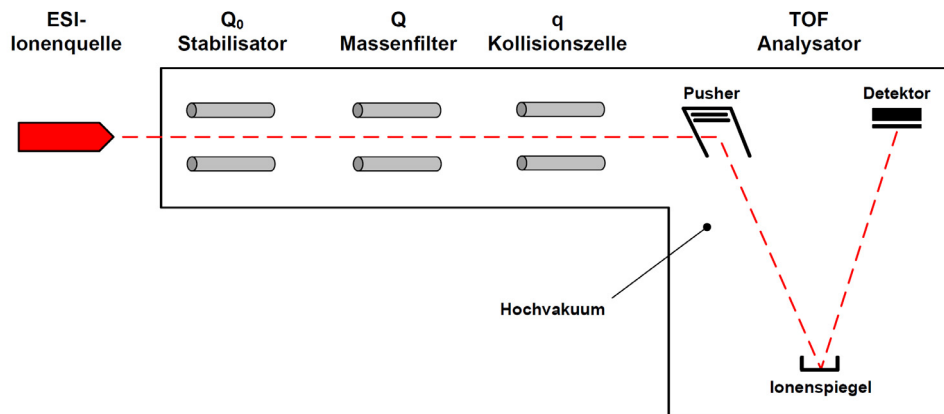
**Enzymatische Spaltung:** Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Fall von Proteinen, ein In-Gel-Verdau durchgeführt, um Peptide mit einer Kettenlänge von unter 30 Aminosäuren (Molekularmasse < 3 kDa) zu generieren, da Peptide in dieser Länge gut geeignet sind zur Sequenzierung mittels Massenspektrometrie.

**Mikro-Chromatographie zur Probenentsalzung:** Zur Entsalzung der Proben wurde eine Mikro-Chromatographie durchgeführt, um Elektrolyte (z. B. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, etc.) aus der Analytlösung zu entfernen. Bei dem verwendeten Verfahren handelte es sich um eine miniaturisierte Reversed-Phase-Chromatographie innerhalb einer mit C<sub>18</sub>-Material gefüllten Pipettenspitze („ZipTip“, Fa. Millipore, Bedford, USA). Vor dem Einsatz wurde die C<sub>18</sub>-Säule aktiviert mit 100 % Methanol (MeOH), danach mit 60 % MeOH plus 1 % Ameisensäure (H-COOH) und schließlich mit 4 % MeOH plus 1 % H-COOH äquilibriert. Das Untersuchungsmaterial wurde zunächst in 4 % MeOH plus 1 % H-COOH gelöst und mehrfach in der C<sub>18</sub>-Säule auf- und abpipettiert, wobei die Peptide am C<sub>18</sub>-Material banden. Die Säule wurde anschließend mehrfach mit 4 % MeOH plus 1 % H-COOH gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Elution der Peptide mit einer Lösung aus 60 % MeOH plus 1 % H-COOH.

### 2.7.2 Aufbau und Funktion des Tandem-Hybrid-Massenspektrometers

Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mit einem Tandem-Hybrid-Massenspektrometer vom Typ ESI-Qq-TOF (Fabrikat QSTAR XL, Applied Biosystems, Foster City, USA). Es bestand aus einer Nano-Electrospray-Ionenquelle (ESI-Quelle), drei Quadrupol-Linsen, die als Stabilisator (Q<sub>0</sub>), Massenfilter (Q) und Kollisionzelle (q) dienten, sowie einem *Time-of-flight*-Massenanalysator (TOF). Die Quadru-

pole und das TOF-Modul befanden sich im Hochvakuum. Die ESI-Quelle wurde bei Atmosphärendruck betrieben und sprühte die Ionen aus einer Glaskapillare heraus durch eine kleine Öffnung (*Orifice*) ins Hochvakuum (s. Abb. 8).



**Abb. 8: Aufbau des Massenspektrometers QSTAR XL**

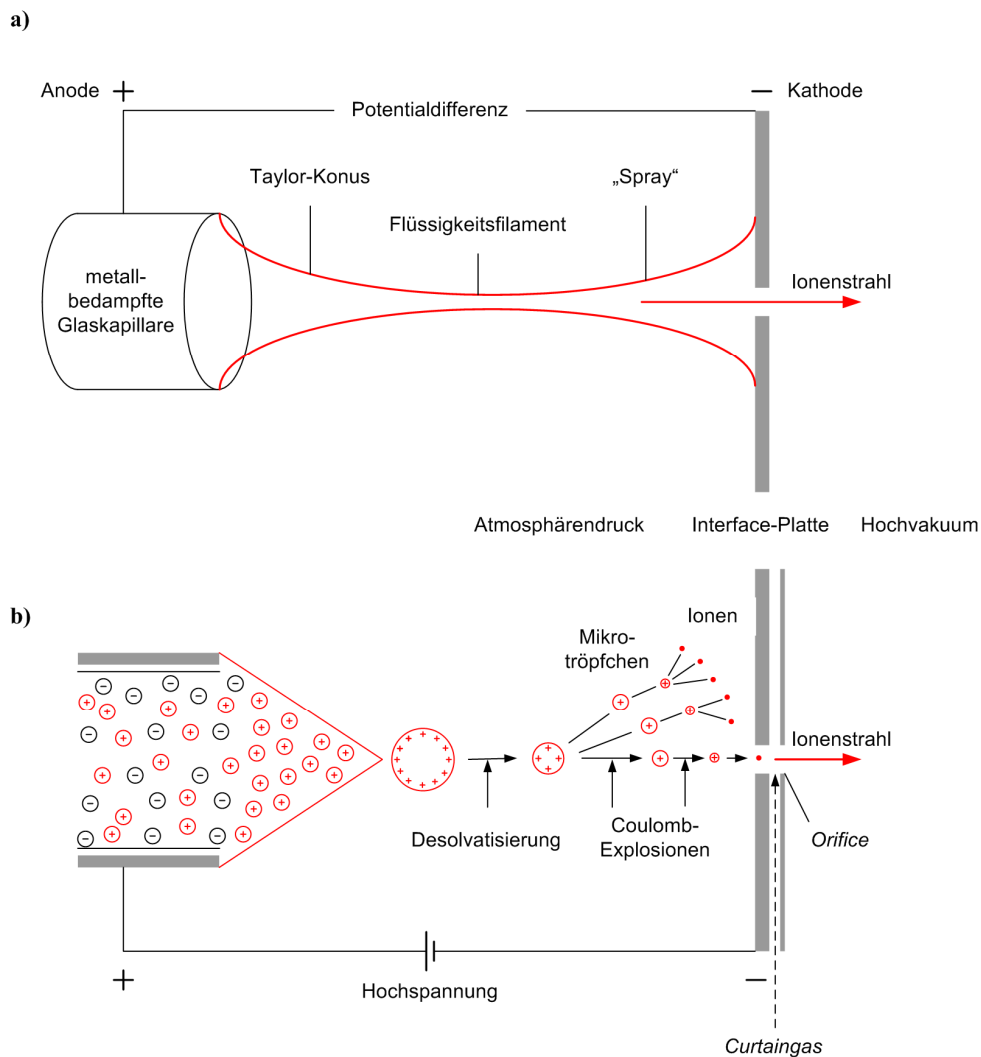
Die bei Atmosphärendruck betriebene Nano-Elektrospray-Ionenquelle (ESI-Ionenquelle) sprüht die Analytione in eine Hochvakuumkammer, in der der Ionenstrahl ein dreifaches Quadrupol-Linsensystem ( $Q_0$ : Stabilisator,  $Q$ : Massenfilter,  $q$ : Kollisionszelle) durchläuft. Im *Time-of-flight* Massenanalysator (TOF Analysator), bestehend aus Pusher, Ionenspiegel und Detektor, wird die Flugzeit der Analytione gemessen.

**Elektrospray-Ionisations-Prozess (ESI-Prozess):** Die Überführung des Analyten in die Gasphase erfolgte nach dem von Mann und Wilm entwickelte Nanospray-ESI-Verfahren [137] und ermöglichte die Untersuchung kleinster Probevolumina (minimal  $0,5 \mu\text{l}$ ). Unter Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz von 1200 Volt wurden die ionisierten Peptide in Richtung Orifice beschleunigt und auf dem Weg dorthin desolvatisiert. Der ESI-Prozess besteht formal aus vier Teilprozessen (s. Abb. 9):

**Vakuumverhältnisse und Curtain-Gas:** Der Einstrom von Umgebungsluft durch das Orifice in die Hochvakuumkammer wurde minimiert, indem zwischen Interface-Platte und Orifice in orthogonaler Richtung zum Einlass Stickstoff (Curtain-Gas) vorbeigeleitet wurde.

**Funktionsweise Quadrupole, Kollision und TOF:** In der Vakuumkammer des QSTAR XL durchlaufen die beschleunigten Ionen ein dreifaches Linsensystem, bestehend aus Quadrupolen, die jeweils aus vier parallel verlaufenden Metallstäben aufgebaut sind. Durch kombinierte Wechsel- und Gleichspannungsfelder konnte dadurch die Flugbahn der Ionen beeinflusst werden. Der erste Quadrupol ( $Q_0$ ) diente als Stabilisator des Ionenstrahls, der zweite Quadrupol ( $Q$ ) wurde als optionaler Massenfilter, der nur Ionen mit vorgegebenem Masse-Ladungs-Verhältnis passieren lässt, genutzt. Quadrupol

Nummer drei (q) bildete die Kollisionszelle, in der durch Einstrom von Kollisionsgas (Stickstoff) unter gleichzeitiger Beschleunigung der Ionen die Fragmentierung der Peptide realisiert wurde. Am Ende der Anordnung befand sich ein TOF-Analysator, dessen integrierter Pusher ankommende Ionen bündelweise passieren ließ und über einen Ionenspiegel auf den Detektor lenkte. Aus der Flugzeit zwischen Pusher und Detektor wurde bei bekannter Wegstrecke die Masse des eintreffenden Ions berechnet.



**Abb. 9: Funktionsprinzip des Elektrospray-Ionisations-Prozesses (ESI-Prozess)**

a) makroskopischer ESI-Prozess: Zwischen der metallbedampften Glaskapillare und der Interface-Platte entsteht eine Potentialdifferenz durch Anlegen einer Hochspannung von 1.200 V. Dadurch tritt ionisierte Analytlösung aus der Kapillare aus, bildet ein konusförmiges Flüssigkeitsfilament („Spray“) und wird in Richtung der Eintrittsöffnung (Orifice) in die Hochvakuumkammer beschleunigt.

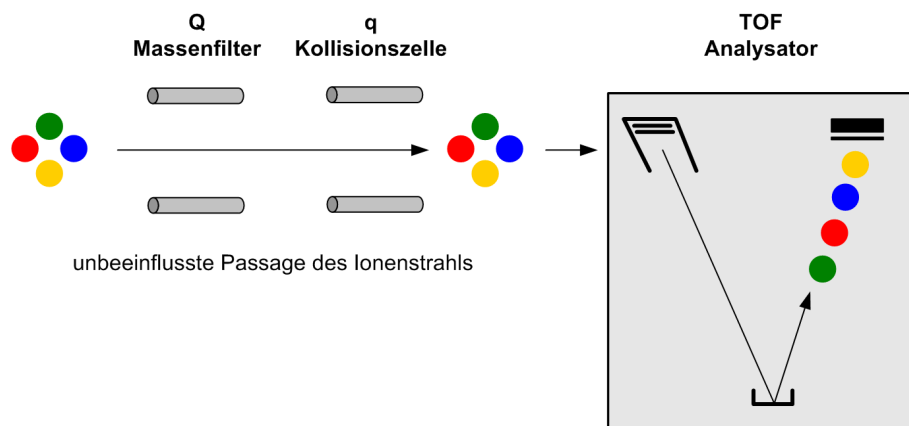
b) mikroskopischer ESI-Prozess: Der Gesamtprozess besteht aus vier Teilprozessen. 1. Bildung kleiner geladener Tröpfchen 2. Verkleinerung der Tröpfchen aufgrund von Lösungsmittelverlust durch Verdampfen (Desolvatisierung); 3. spontaner Zerfall in kleinere Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen); 4. Bildung gasförmiger Ionen beim Transfer in die Hochvakuumkammer. Stickstoff (Curtain-Gas) wird zur weiteren Desolvatisierung durch Kollision und zur Ablenkung von Neutralteilchen eingesetzt. Abbildung modifiziert in Anlehnung an Lottspeich et al. [138].

### 2.7.3 Identifikation von Peptiden und Proteinen

Zur massenspektrometrischen Identifikation eines Proteins waren mindestens ein Übersichtsspektrum und teilweise noch Fragmentspektren notwendig.

#### 2.7.3.1 MS-Übersichtsspektrum und *Peptide Mass Fingerprint*

Die MS-Messung der Peptidgemische wurde als Übersichtsspektrum (MS-Spektrum) dargestellt und lieferte die Massen der im Spray befindlichen Peptide. Zum Aufnehmen des MS-Spektrums wurden die Quadrupole so geschaltet, dass keine Selektion und keine Fragmentierung der Ionen erfolgten. Die Ionen passierten im TOF die feldfreie Driftstrecke ( $L$ ) bekannter Länge. Ihre Flugzeit wurde am Ende der Strecke von einem Analysator gemessen (s. Abb. 10).



**Abb. 10: Funktionsprinzip des QSTAR XL zur Aufnahme eines Übersichtsspektrums**

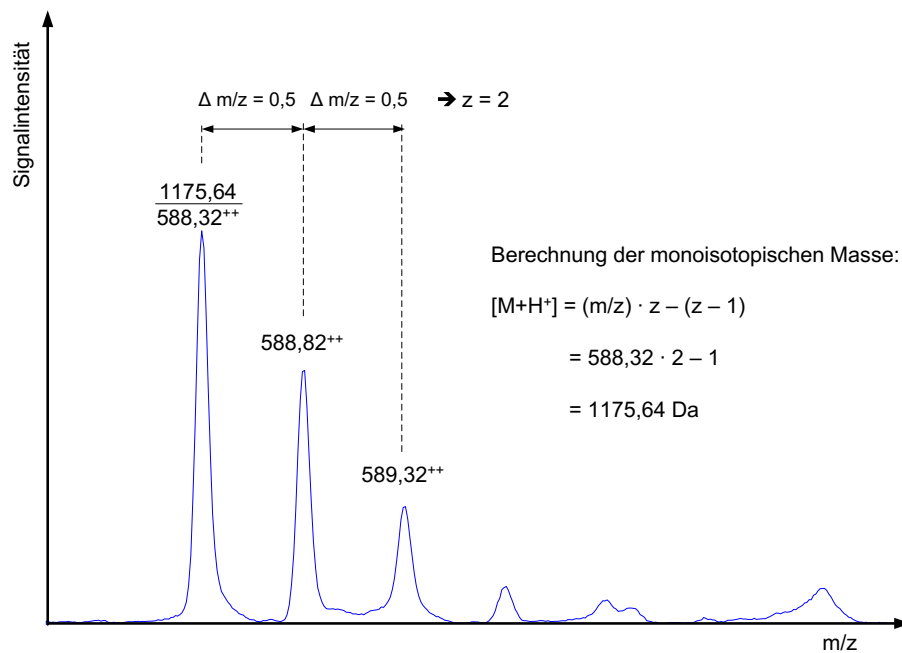
Das Quadrupol-Linsensystem des Massenspektrometers QSTAR XL ist so geschaltet, dass der Ionenstrahl lediglich auf seiner Flugbahn stabilisiert wird, aber ansonsten unbeeinflusst zum TOF geleitet wird, in dem sämtliche Ionen detektiert werden.

Die resultierende individuelle Fluggeschwindigkeit der Analytione, die beim Eintritt ins Hochvakuum alle mit derselben Energie beschleunigt wurden, ist abhängig von der Masse ( $m$ ) und dem Ladungszustand ( $z$ ). Gleichung (2.5) beschreibt die Zusammenhänge ( $m$ : Masse des Analytions,  $z$ : Ladungszustand des Analytions in ganzzahligen Vielfachen der Elementarladung  $e = 1,602 \cdot 10^{-19}$  C,  $U$ : Beschleunigungsspannung,  $v$ : Fluggeschwindigkeit,  $L$ : Länge der Driftstrecke und  $t$ : Flugzeit)

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{v^2} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2 \quad (2.5)$$

Die Massenbestimmung von Peptiden und kurzen Proteinen erfolgte anhand des Isotopenmusters. Die Masse großer Proteine wurde mittels einer Dekonvolution errechnet.

**Bestimmung der Molekülmasse von Peptiden anhand des Isotopenmusters:** Im Falle von Peptiden mit einem Molekulargewicht von bis zu 10 kDa wurde die Bestimmung der Molekülmasse anhand des Isotopenmusters durchgeführt. Aus dem Messwert  $m/z$  und dem Ladungszustand  $z$  wurde die Masse  $m$  (=monoisotopische Masse  $[M+H^+]$ ) folgendermaßen errechnet:  $m = [M+H^+] = z \cdot (m/z) - (z - 1)$ . Die Information über den Ladungszustand  $z$  war im MS-Spektrum enthalten (s. Abb. 11).



**Abb. 11: Massenspektrum zur Bestimmung der Peptidmasse anhand des Isotopenmusters**

Beispielhaft ist das Übersichtsspektrum eines Peptids mit der Masse 1175,64 Da gezeigt. Es erscheint im Spektrum als zweifach geladenes Signal, erkennbar am *Peak*-Abstand von  $\Delta m/z = 0,5$  Elementarmassen. Aus dem Messwert des *Peaks* mit dem niedrigsten  $m/z$ -Verhältnis ( $m/z = 588,32$  Elementarladungen) wird die monoisotopische Masse  $[M+H^+]$  anhand der genannten Formel berechnet.

Das Signal eines Peptids besteht i.d.R. aus mehreren dicht beieinander liegenden Einzel-*Peaks* im Abstand einer Elementarmasse. Grund dafür ist, dass neben den üblichen  $^{12}\text{C}$  Atomen auch ein oder mehrere  $^{13}\text{C}$  Atome im Grundgerüst des Peptids enthalten sind. Jedes  $^{13}\text{C}$ -Atom erhöht die Peptidmasse um eine Elementarmasse und ist durch einen eigenen *Peak* im MS-Spektrum repräsentiert. Die nebeneinander liegenden *Peaks* bilden das sog. Isotopenmuster. Der *Peak* mit dem kleinsten  $m/z$  repräsentiert die monoisotopische Masse. In der Regel besitzt die monoisotopische Masse die höchste Signalintensität (quantitative Angabe der Signalintensität in *Counts* pro Sekunde, cps). Beträgt der Abstand im MS-Spektrum zwischen den *Peaks*  $\Delta m/z = 1$ , dann liegt der Ladungszustand  $z = 1$  vor. Bei  $\Delta m/z = 0,5$  handelt es sich um ein zweifach geladenes Ion (La-

dungszustand  $z = 2$ ), bei  $\Delta m/z = 0,33$  um ein dreifach geladenes usw. Aus den gemessenen  $m/z$ -Verhältnissen wurden (wie in Abb. 11 gezeigt) die einzelnen Peptidmassen berechnet. Allerdings war die Kenntnis der Masse allein i. d. R. nicht ausreichend, denn häufig existierten massengleiche Peptide mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz, sodass eine eindeutige Zuordnung allein über die Peptidmasse nicht möglich war.

#### **Bestimmung der Molekülmasse von Proteinen mit Hilfe der Dekonvolution:**

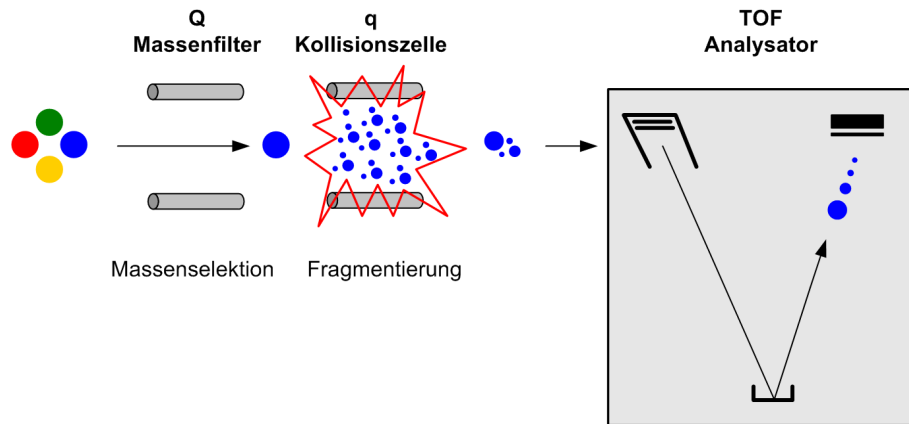
Im Fall von Proteinen mit Molekülmassen von  $> 10$  kDa wurde die Dekonvolution zur Bestimmung der Molekülmasse eingesetzt, da die Auflösung des verwendeten MS-Geräts nicht ausreichte, um das o. g. Verfahren mittels Isotopenmuster anzuwenden. Das verwendete Dekonvolutions-Tool ist in der Auswertesoftware „Analyst“ von Applied Biosystems implementiert und heißt dort „Bayesian Protein Reconstruct“. Die Dekonvolution stellt ein mathematisches Verfahren zur Verbesserung der Auflösung von MS-Spektren dar, aus der die Masse des gesuchten Proteins rekonstruiert wird. Aus der Beziehung in Gleichung (2.5) ist anhand der Antiproportionalität von Proteinmasse und dem Quadrat der Fluggeschwindigkeit  $m \sim (1/v^2)$  ersichtlich, dass die *Peak*-Abstände benachbarter Isotope sehr klein werden, sodass sie nicht mehr voneinander abgrenzbar waren. Gut erkennbar dagegen waren nahe beieinander liegende Signale desselben Proteins in unterschiedlichen Ladungszuständen, die zur Dekonvolution verwendet werden.

**Peptide Mass Fingerprint (PMF-Verfahren):** Die Gesamtliste der Fragmentationen des jeweils untersuchten Proteins aus dem MS-Spektrum stellte den *Peptide Mass Fingerprint* dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ermittelten Einzelmassen manuell mit der Massenliste der theoretischen Verdau möglicher Proteine verglichen. Das Verfahren kam schnell an seine Grenzen, wenn ein Gemisch aus mehreren Proteinen vorlag oder die Peptidmassen durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst wurden. Bei hochmolekularen Proteinen, wie dem humanen Serumalbumin, existierten innerhalb des Moleküls oft mehrere Peptide mit identischer Masse, was eine eindeutige Zuordnung nur aufgrund der Peptidmasse unmöglich machte.

#### **2.7.3.2 MS-MS-Fragmentspektren und Peptidsequenzierung**

Exaktere Information lieferte das MS-MS-Fragmentspektrum, das auch Tandem-Massenspektrometrie genannt wird. Peptide mit unbekannter Sequenz, deren Masse zuvor im MS-Verfahren ermittelt wurde, wurden in zwei hintereinander geschalteten Analysatoren sequenziert. Dazu wurde der Quadrupol Q als Massenfilter genutzt, d. h. er ließ nur das jeweils zu untersuchende Peptid mit bestimmter Masse passieren. Im zweiten Quadrupol q, der Kollisionskammer, wurde das selektierte Peptid durch Be-

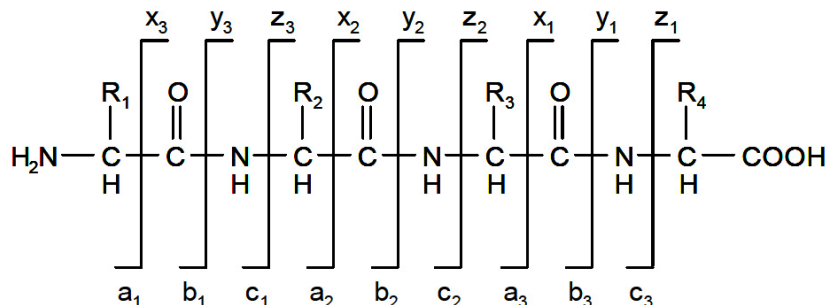
schuss mit Stickstoff fragmentiert. Im TOF-Analysator erfolgte die Aufnahme des Fragmentspektrums (= MS/MS-Spektrum, s. Abb. 12).



**Abb. 12: Funktionsprinzip des QSTAR XL zur Aufnahme eines MS-MS-Fragmentspektrums**

Das Quadrupol-Linsensystem des Massenspektrometers QSTAR XL ist so geschaltet, dass der Massenfilter (Q) nur Ionen einer gewünschten Masse passieren lässt, die in der Kollisionszelle (q) durch Beschuss mit Stickstoff in kleinere Peptide fragmentiert werden.

**Fragmentierungsverhalten:** Im Fragmentspektrum waren nur Bruchstücke des ursprünglich selektierten Vorläuferpeptids zu finden. Das Fragmentierungsverhalten des Vorläuferpeptids hängt von seiner Größe, der Art und Abfolge der Aminosäuren, sowie der Lokalisation seines angehängten Protons ab. Die Brüche entstehen hauptsächlich entlang des Peptid-Rückgrats. Die bei C-terminal lokalisierter Ladung entstehenden Fragmente werden „y-Fragment“ genannt, bei N-terminal lokalisierter Ladung entstehen „b-Fragmente“. Die Nomenklatur folgt Roepstorff und Fohlman [139] und ist in Abb. 13 dargestellt. Bei Peptiden aus tryptischem Verdau werden bevorzugt Peptidfragmente aus der y-Serie detektiert, da sie C-terminal eine basische Aminosäure besitzen (Arginin oder Lysin), die Ladungen gut stabilisieren kann.



**Abb. 13: Nomenklatur für Peptidfragmente aus massenspektrometrischen Analysen nach Roepstorff und Fohlman [139]**

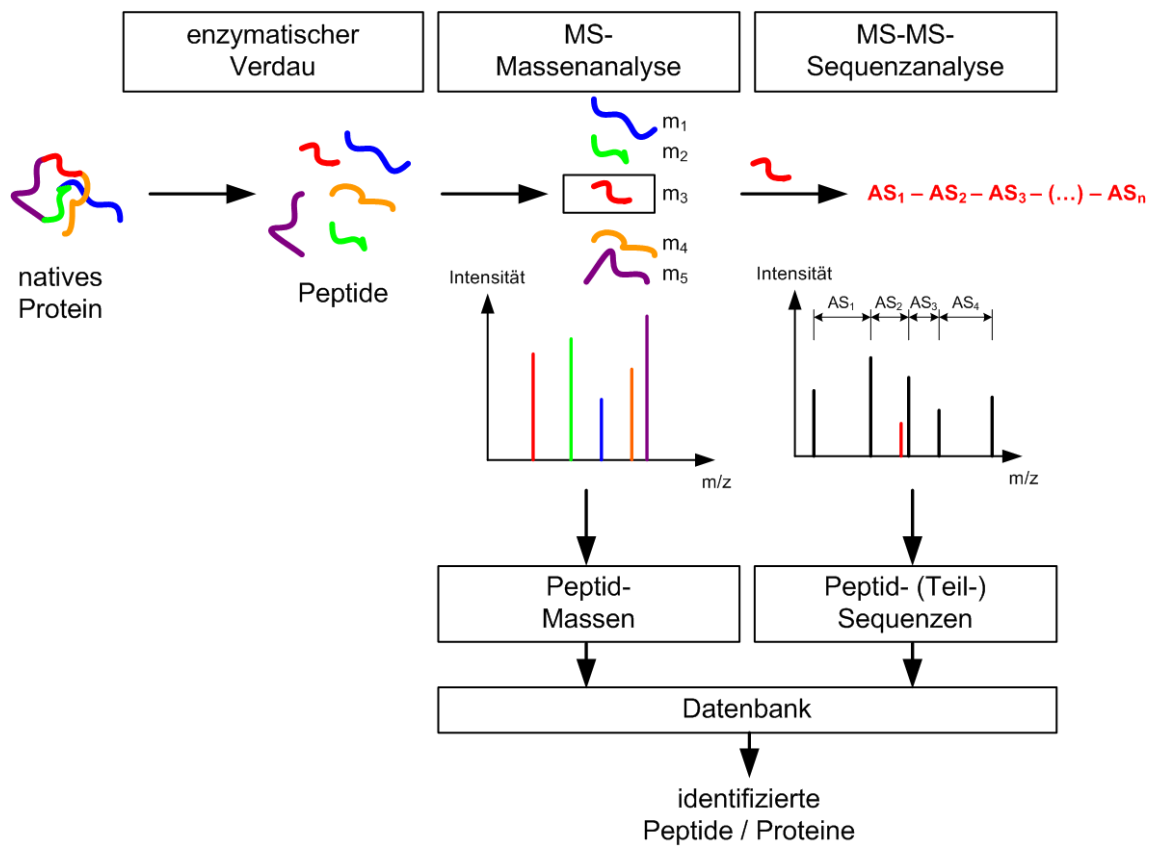


**Sequenzanalyse (MS-MS-Verfahren):** Die aufgezeichneten MS-MS-Fragmentspektren wurden z. T. direkt aus der Auswertesoftware des Massenspektrometers heraus an die internetbasierte Analysesoftware „Mascot“ (Fa. Matrix Science, Boston, USA) weitergeleitet. Die datenbankgestützte automatisierte Auswertung lieferte die zum Spektrum zugehörige Aminosäuresequenz und das dazu passende identifizierte Protein. Kam mehrere Proteine in Frage, erfolgte die Darstellung gewichtet nach Wahrscheinlichkeiten.

Bei den Verdauversuchen im Rahmen dieser Arbeit, bei denen sich nur bekannte Proteine in der Analytlösung befanden, erfolgte die Peptididentifikation manuell durch MS-MS-Sequenzierung einer Aminosäureabfolge von mind. drei bis vier Aminosäuren (sog. Sequenz-*tag*) und der zusätzlichen Anwendung des PMF-Verfahrens. Die Sequenzaufklärung erfolgte anhand der y- oder der b-Serie der Fragmentionen. Der Massenabstand zwischen zwei Fragmentionen der gleichen Serie repräsentierte die Masse einer spezifischen Aminosäure. Dadurch wurde Schritt für Schritt die Aminosäuresequenz des Peptids aufgeklärt.

Die Überlegenheit gegenüber dem PMF-Verfahren bestand darin, dass nicht nur Massen- sondern auch Sequenzinformationen genutzt wurden. Dies erhöhte die Sicherheit der Zuordnung zum gesuchten Protein. Darüber hinaus konnten Proteinmodifikationen identifiziert und aminosäuregenau verortet werden. Im Fall proteasomaler Degradation konnten die Schnittstellen des Proteasoms aminosäuregenau zugeordnet werden.

Die Abb. 14 fasst die Arbeitsschritte zur massenspektrometrischen Proteinanalyse grafisch zusammen:



**Abb. 14: Arbeitsablauf der massenspektrometrischen Proteinanalyse**

Ein unbekanntes Protein wird analysiert durch enzymatischen Verdau und massenspektrometrische Bestimmung der Peptidmasse (MS-Massenanalyse) bzw. einer tandem-massenspektrometrischen Analyse der Aminosäuresequenz (MS/MS-Sequenzanalyse). Datenbanken können die Analyse unterstützen.

## **3 Ergebnisse**

In Abschnitt 3.1 wird zunächst die Charakterisierung zweier exemplarischer BALF-Proben von PAP-Patienten mit quantitativer und qualitativer Analyse des alveolären Proteasoms beschrieben. In Abschnitt 3.2 erfolgt die Beschreibung des Aufbaus eines Verfahrens zur Quantifizierung der proteasomalen Enzymaktivität und der Anwendung an PAP-Proteasom. Im Abschnitt 3.3 wird die Entwicklung eines Testsystems beschrieben, mit dem der proteasomale Verdau des alveolären Proteins humanes Serumalbumin (HSA) untersucht wurde.

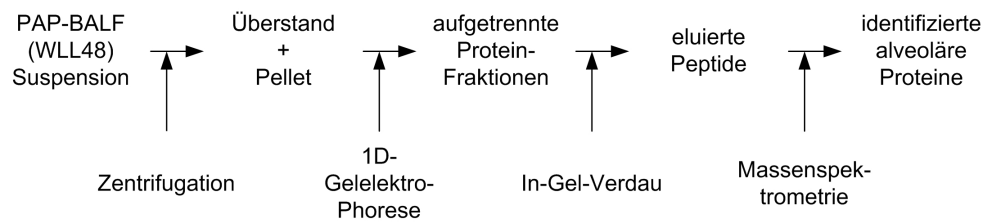
### **3.1 Charakterisierung bronchoalveolärer Lavage bei pulmonaler Alveolarproteinose**

#### **3.1.1 Quantitative Proteinbestimmung**

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde der Assay nach Lowry (vgl. Abschnitt 2.3) benutzt. Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte exemplarisch an den beiden Patientenproben (WLL4 und WLL48). Die untersuchten BALF-Proben lagen als trübe Suspensionen vor. Die Probe WLL48 enthielt 10,1 mg/ml, die Probe WLL4 enthielt 4,0 mg/ml Protein in der Suspension. Durch Zentrifugation (1000 x g; 4°C; 10 min) wurden die Proben in ein Pellet und einen Überstand aufgetrennt. Die Überstände erschienen dabei mit bloßem Auge als klare Flüssigkeiten und machten mindestens 90 % des Gesamtvolumens aus. Für die Lavage WLL48 wurde eine Gesamtproteinbestimmung getrennt nach Pellet und Überstand durchgeführt (Pellet 10,1 mg/ml; Überstand 5,8 mg/ml). Unter Berücksichtigung der Volumenverteilung Überstand zu Pellet von ca. 9:1 befanden sich im Überstand etwa 60 % der Proteine.

#### **3.1.2 Qualitative Proteinbestimmung**

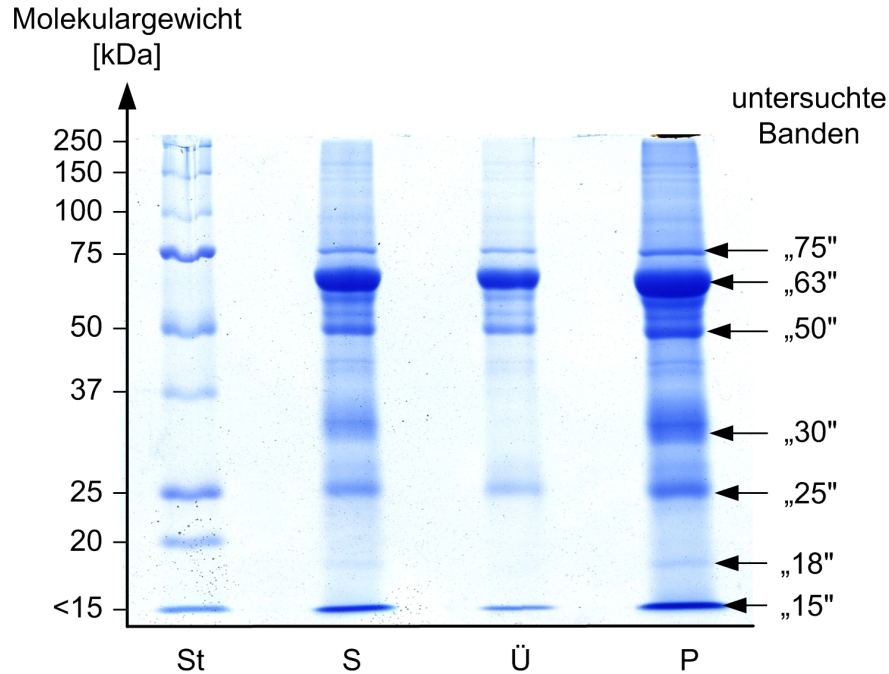
Die qualitative Proteinbestimmung zur Untersuchung, welche einzelnen Proteine in der BALF enthalten sind, erfolgte exemplarisch an der BALF WLL48. Die Untersuchung bestand aus einem vierschriftigen Verfahren (s. Abb. 15).



**Abb. 15: Arbeitsablauf zur Charakterisierung der PAP-BALF WLL48**

Zunächst wurde die BALF durch Zentrifugation in ein Pellet und einen Überstand aufgetrennt. Die Suspension, das Pellet und der Überstand wurden mit Hilfe der 1D-Gelelektrophorese (Verfahren s. Abschnitt 2.5) detaillierter aufgetrennt. Aus dem Proteinprofil des Pellets wurden die prominenten Banden aus dem Gel exzidiert und einem In-Gel-Verdau (Verfahren s. Abschnitt 2.6) unterzogen. Der letzte Schritt bestand aus der massenspektrometrischen Identifikation der in der jeweiligen Bande vorkommenden Proteine (Verfahren s. Abschnitt 2.7).

**Gelelektrophorese:** Die Auftrennung des Gesamtproteins erfolgte nach dem in Abschnitt 2.5 vorgestellten Elektrophoreseverfahren und ist in Abb. 16 gezeigt.

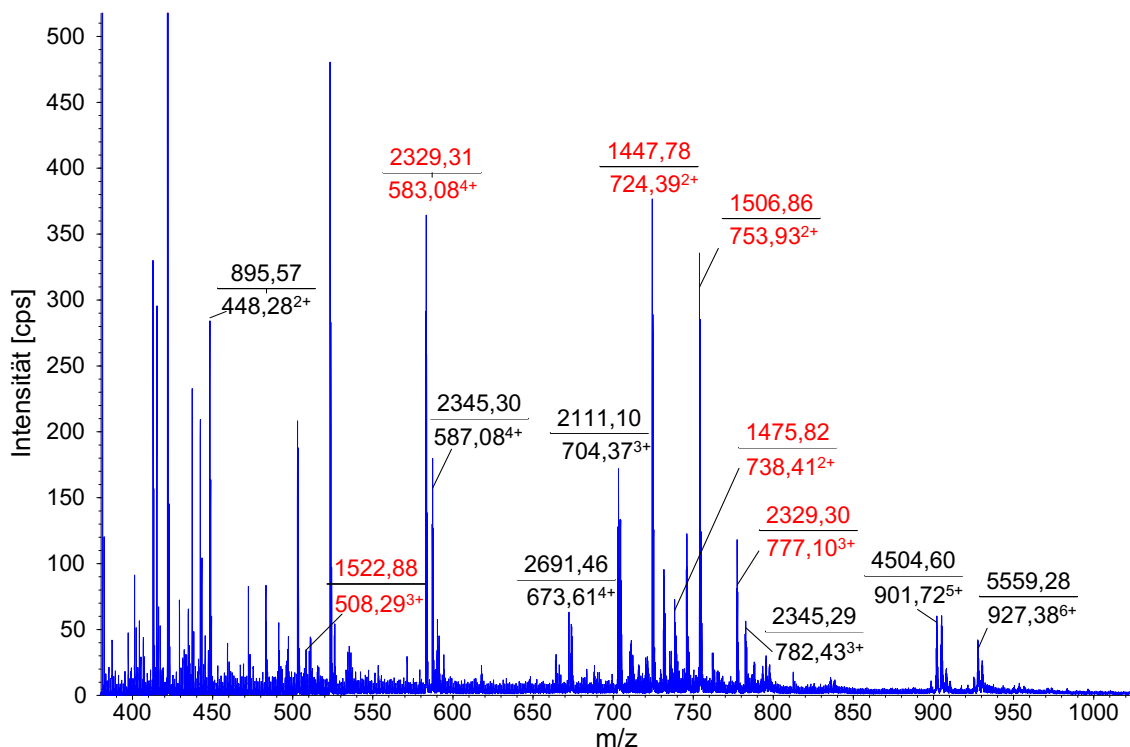


**Abb. 16: 1D-Elektrophorese-Gel der PAP-BALF WLL48**

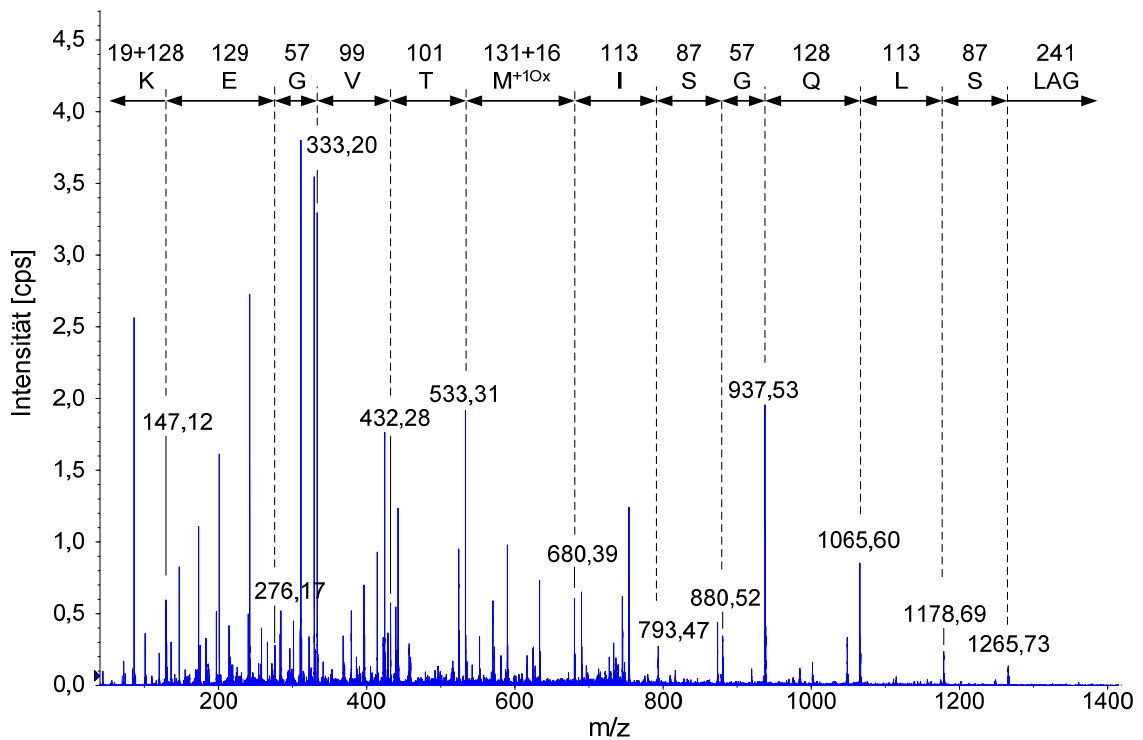
Es wurden jeweils 2,2  $\mu\text{l}$  pro Spur aufgetragen: Suspension (S) sowie Überstand (Ü) und Pellet (P). Zum Vergleich dient ein Proteinstandard (St). Banden, die massenspektrometrisch untersucht wurden, sind mit Pfeilen markiert.

Von Suspension, Überstand und Pellet wurden jeweils 2,2 µl eingesetzt. Auf Basis der in den Versuchen aus Abschnitt 3.1.1 gemessenen Proteinkonzentrationen bedeutet dies: In der Suspension-Spur (S) waren 20 µg Protein, in der Überstand-Spur (Ü) ca. 15 µg und in der Pellet-Spur (P) ca. 70 µg Protein enthalten. Der Vergleich mit dem Proteinstandard (St) ließ prominente Banden in den Massenbereichen 75, 63, 50, 30, 25, 18 kDa und in der Lauffront, in der sich Peptide <15 kDa sammeln, erkennen. Es zeigte sich, dass manche Banden nur im Pellet sichtbar wurden und im Überstand gänzlich fehlten.

**Massenspektrometrische Identifikation der Proteinbanden:** Um die Proteine der massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich zu machen, wurden die sieben prominentesten Banden im Bereich 75, 63, 50, 30, 25, 18 und <15 kDa zunächst aus dem Gel ausgeschnitten und einem In-Gel-Verdau unterzogen (Verfahren s. Abschnitt 2.6). Im Rahmen der massenspektrometrischen Identifikation (Verfahren s. Abschnitt 2.7) wurde für jede untersuchte Bande ein Übersichtsspektrum angefertigt. Exemplarisch ist hier das Übersichtsspektrum der Bande „30“ (s. Abb. 17) sowie das MS/MS-Fragmentspektrum eines tryptischen Peptids aus der Bande „30“ gezeigt (s. Abb. 18).



**Abb. 17: MS-Spektrum der Bande „30“ aus dem Elektrophoresegel der PAP-BALF WLL48**  
MS-Übersichtsspektrum der Bande 30, die Surfactantprotein A (SP-A) enthält. Eine Auswahl der enthaltenen Signale ist mit Zahlenwerten dargestellt. Identifizierte Peptide des SP-A sind rot hervorgehoben.



**Abb. 18: MS/MS-Fragmentspektrum aus der PAP-BALF WLL48**

Exemplarisches MS/MS-Fragmentspektrum des Peptids  $m/z = 753,93^{2+}$ , entspricht  $[M+H]^+ = 1506,86$  Da. Die Sequenzierung des Peptids erfolgte durch Berechnung der Massenabstände. Die identifizierte Peptidsequenz G-A-L-S-L-Q-G-S-I-M<sup>+10x</sup>-T-V-G-E-K ist Teil des Proteins SP-A1 (Position 123-137) zuzüglich einer Oxidation am Methionin (Position 132)

Mit Hilfe des MS/MS-Verfahrens oder durch Massenanalyse im PMF-Verfahren konnten 44 Signale identifiziert werden, die 8 verschiedenen alveolären Proteinen zugeordnet wurden (s. Tabelle 8 und Tabelle 9).

**Tabelle 8: Massenspektrometrisch identifizierte Peptide aus der PAP-BALF WLL48.**

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [m]	Aminosäuresequenz	Verfahren
Bande 75: tryptische Peptide von Serotransferrin				
489,78	2	978,56	K. DGAGDVAFVK .H	PMF
500,79	2	1000,57	K. YLGEEYVK .A	MS/MS
625,35	2	1249,69	K. SASDLTWDNLK .A	MS/MS
642,33	2	1283,65	K. EGYGYTGAFR .C	MS/MS
797,45	2	1593,89	R. TAGWNIP <sup>+10x</sup> GLLYNK .I	MS/MS
731,38	3	2192,15	K. IM <sup>+10x</sup> NGEADAM <sup>+10x</sup> SLDGGFVYIAGK .C	PMF
Bande 63: tryptische Peptide von humanem Serumalbumin (HSA)				
464,26	2	927,52	K. YLYEIAR .R	MS/MS
480,80	2	960,60	K. FQNALLVR .Y	MS/MS
500,82	2	1000,64	K. QTALVELVK .H	MS/MS
507,32	2	1013,63	K. LVAASQAALGL .-	PMF
575,32	2	1149,64	R. DAHKSEVAHR .F	PMF
613,82	2	1226,63	R. FKDLGEENFK .A	PMF
409,56	3	1266,67	R. FKDLGEENFK .A	PMF
489,97	3	1467,90	R. RHPDQSVVLLLR .L	MS/MS

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [m]	Aminosäuresequenz	Verfahren
Bande 63: tryptische Peptide von humanem Serumalbumin (HSA), Fortsetzung				
574,33	2	1639,99	K. KVPQVSTPTLVEVSR .N	MS/MS
812,40	2	1623,80	K. DVFLGMFLQEQR .R	PMF
820,41	2	1639,82	K. DVFLGM <sup>+1ox</sup> FLQEQR .R	PMF
871,95	2	1742,91	R. HPYFYAPELLFFAK .R	PMF
581,65	3	1742,95	R. HPYFYAPELLFFAK .R	PMF
633,68	3	1988,05	R. RHPYFYAPELLFFAK .R	PMF
633,68	3	1988,05	R. HPYFYAPELLFFAKR .Y	PMF
1023,06	2	2045,11	K. VFDEDKPLVEEPQNLK .Q	MS/MS
Bande 50: tryptische Peptide von Immunglobulin $\gamma$				
539,86	2	1186,71	K. GPSVFPLAPSSK .S	MS/MS
937,51	2	1874,00	R. GILMPDSCCTQLHELK .L	MS/MS
559,97	3	1677,92	K. FNWYVDGVEVHNAK .T	MS/MS
641,02	3	1921,06	R. EPQVYTLPPSREEM <sup>+1ox</sup> TK .N	MS/MS
961,49	2	1921,99	K. TTPPM <sup>+1ox</sup> LDSDGSFLLYSK .L	MS/MS
Bande 30: tryptische Peptide von Surfactantprotein A1 (SP-A1)				
724,39	2	1447,78	R. NPEENEAIASFVK .K	MS/MS
777,10	3	2329,30	R. GPPGLPAH <sup>+1ox</sup> LDEELQATLHDFR .H	MS/MS
508,29	3	1522,88	R. GALSLOQSIM <sup>+2ox</sup> TVGEK .V	MS/MS
753,93	2	1506,86	R. GALSLOQSIM <sup>+1ox</sup> TVGEK .V	MS/MS
Bande 25: tryptische Peptide von Immunglobulin $\kappa$				
632,34	2	1895,01	-. DIQM <sup>+1ox</sup> TQSPSSLSASVGDR .V	MS/MS
751,92	2	1502,84	K. NSTYLSSTLTLK .A	MS/MS
816,93	2	1632,86	R. FSGSGSGTDFTLTISR .L	MS/MS
1068,53	2	2136,06	K. VDNALQSGNSQESVTEQDSK .D	MS/MS
973,56	2	1946,11	-. TVAAPSVFIFPPSDEQLK .S	MS/MS
Bande 18: tryptische Peptide der leichten Kette von Ferritin				
531,31	2	1591,93	K. LNQALLDLHALGSAR .T	MS/MS
574,01	3	1940,97	K. KLNQALLDLHALGSAR .T	MS/MS
Bande 15: tryptische Peptide der schweren Kette von Immunglobulin (Ig heavy chain)				
507,34	2	1013,68	R. ISIH <sup>+1ox</sup> PDTSK .N	MS/MS
529,36	2	1075,71	R. GTM <sup>+1ox</sup> VTVSSAST .-	MS/MS
Bande 15: tryptische Peptide von Surfactantprotein B (SP-B)				
408,75	2	816,50	R. IQAM <sup>+1ox</sup> IPK .G	MS/MS
603,34	2	1205,68	K. GALAVAVAQVC <sup>+3ox</sup> R .V	MS/MS
681,92	2	1362,84	R.-YSVILLDTLLGR.-M	MS/MS

Schnittstellen sind durch Punkte gekennzeichnet. Oxidierte Aminosäuren sind rot hervorgehoben

Bei der exemplarischen Untersuchung der PAP-BALF WLL48 wurden die sieben prominentesten Banden (d. h. die am stärksten gefärbten Banden) aus dem Elektrophoresegele gewählt. Folgende Proteine wurden identifiziert: humanes Serumalbumin, Surfactantprotein A, Immunglobuline, Surfactantprotein B, Serotransferrin und Ferritin (s. Tabelle 9).

**Tabelle 9: Massenspektrometrisch identifiziert Proteine aus der PAP-BALF WLL48**

Bande	identifiziertes Protein	Accession-Nr.*	Molekulargewicht [Da]
„75“	Serotransferrin	AAB22049	77.050,16
„63“	humanes Serumalbumin (HSA)	AAH34023	69.321,50
„50“	Immunglobulin Schwereketten (Ig $\gamma$ )	AAB86467	51.246,33
„30“	Surfactantprotein A1 (SP-A1)	AAO13486	26.211,56
„25“	Immunglobulin Leichtkette (Ig $\kappa$ )	CAA09181	25.993,52
„18“	Ferritin Leichtkette	AAA52439	20.019,71
„< 15“	Surfactantprotein B (SP-B)	AAH32785	42.088,92

\* laut Proteindatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

Von den identifizierten Proteinen gehören humanes Serumalbumin, die Immunglobuline, Serotransferrin und Ferritin zu den Plasmaproteinen. Die Surfactantproteine A und B sind lungenspezifische Proteine und Bestandteile des Lungensurfactants. Etwa ein Drittel der identifizierten Proteine lagen in teiloxidiertem Zustand vor. Am häufigsten war die Aminosäure Methionin oxidiert.

## 3.2 Aufbau und Anwendung eines Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität des 20S Proteasoms

Ziel der im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche war es, ein Testsystem aufzubauen, mit dem die proteasomale Aktivität *in vitro* nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Die Anwendung des Testsystems, das in Abschnitt 2.4 genauer beschrieben wird, erfolgte an erythrozytärem Proteasom von gesunden Probanden und an alveolärem 20S Proteasom von PAP-Patienten.

### 3.2.1 Enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms aus Erythrozyten

Der Aufbau und die Anwendung des Testsystems erfolgte zunächst an 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten (h-Ery). Die enzymatische Aktivität von drei verschiedenen Chargen der Proteasompräparation h-Ery wurde untersucht und verglichen. Zu diesem Zweck wurde die Proteasompräparation aufbereitet und das Enzym-Substrat-Verhältnis für den Versuch festgelegt.

**Aufbereitung der Proteasom-Präparationen mittels Dialyse:** Die drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery wurden in einer Konzentration von 1 mg 20S Proteasom pro Milliliter Trägerlösung (50 % Glycerin, 50 % TEAD-Puffer) bezogen. Zunächst



wurde das Glycerin entfernt, weil es spätere massenspektrometrische Untersuchungen behindert hätte. Die Aufreinigung erfolgte mittels Dialyse nach dem in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Verfahren. Dadurch ergaben sich Volumen- und Konzentrationsänderungen der h-Ery-Chargen, die in Tabelle 10 zusammengefasst sind:

**Tabelle 10: Konzentrationen der Proteasom-Präparation h-Ery vor und nach Dialyse**

h-Ery	vor Dialyse		nach Dialyse	
	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [ $\text{mg/ml}$ ]	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Konzentration [ $\text{mg/ml}$ ]
Charge 1	40	1	100	0,400
Charge 2	100	1	160	0,625
Charge 3	100	1	165	0,600

**Festlegung Enzym-Substrat-Verhältnis:** Ziel war es herauszufinden, ob die molaren Verhältnisse von Proteasom zu Substrat einen Einfluss auf das Degradationsverhalten haben. Um den möglichen Einfluss zu studieren, wurden zunächst die drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery aus Tabelle 10 auf jeweils  $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $= 6,67 \text{ pmol/ml}$ ) in TEAD-Puffer verdünnt. Daraus wurde eine vierstufige Verdünnungsreihe hergestellt, bei der sich die Konzentrationen mit jeder Verdünnungsstufe halbierten.

**Versuchsablauf:** Der Versuchsaufbau folgte dem Protokoll aus Abschnitt 2.4.

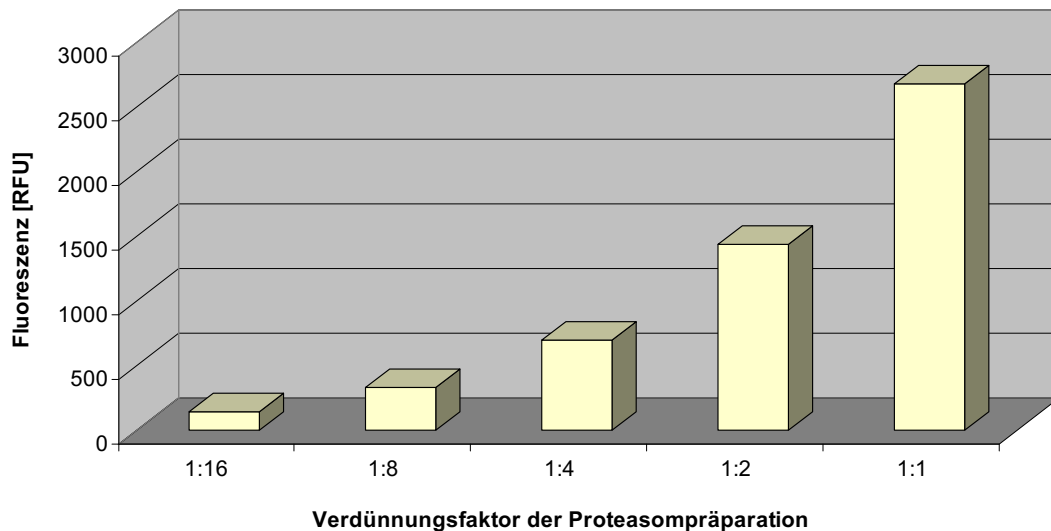
### 3.2.1.1 Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses

Ziel des ersten Versuches war zu zeigen, ob die vorliegende Proteasompräparation h-Ery enzymatisch aktiv ist und welche Einflüsse verschiedene Enzym-Substrat-Verhältnisse haben. Dafür wurde zunächst exemplarisch das Verhalten einer einzigen enzymatischen Aktivität betrachtet, nämlich der caspaseartigen Aktivität, die mit Hilfe des Testpeptids Z-LLE-AMC untersucht wurde. Die Tabelle 11 fasst die Versuchsbedingungen zusammen:

**Tabelle 11: Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses des Enzym-Substrat-Verhältnisses auf die caspaseartige Aktivität der Proteasompräparation h-Ery**

Substrat	20 $\mu\text{l}$ Z-LLE-AMC (400 $\mu\text{M}$ )
Proteasom	20 $\mu\text{l}$ h-Ery Proteasompräparation (Charge 1), unverdünnt (1:1, entspricht $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), sowie in 4 Verdünnungsstufen bis 1:16
Inkubation	90 min bei $37^\circ\text{C}$
Stopp-Lösung	Ethanol (99,5 %)

Die Abb. 19 zeigt, dass nach abgelaufener Inkubation unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten. Bei konstantem Substratangebot und zunehmender Proteasomkonzentration verstärkte sich das Fluoreszenzsignal. Der grafische Verlauf zeigt in guter Näherung exponentielles Verhalten.



**Abb. 19: Fluoreszenz nach Inkubation des fluorogenen Peptids Z-LLE-AMC mit verschieden stark verdünnter Proteasompräparation h-Ery**

Die Proteasompräparation (jeweils 20  $\mu$ l) wurde unverdünnt (1:1 entspricht 5 ng/ml) sowie in 4 absteigenden Verdünnungsstufen mit jeweils 20  $\mu$ l (400  $\mu$ M) des Testpeptids inkubiert für 90 min bei 37°C. Die Fluoreszenz ist angegeben in relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescence units*, RFU)

Dieses Ergebnis zeigt zunächst, dass die untersuchte Charge der Proteasompräparation h-Ery enzymatisch aktiv ist. Es zeigt weiterhin, dass pro Mol eingesetzten Proteasoms stets etwa gleich viel Substrat umgesetzt wird. Die spezifische Proteasomaktivität ist also im untersuchten Konzentrationsbereich unter den gewählten Versuchsbedingungen konstant, d. h. unabhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis. In weiteren Versuchen zeigte die Proteasompräparation h-Ery auch für die anderen beiden enzymatischen Aktivitäten konstante spezifische Aktivitäten (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.1.2 Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten

Im folgenden Versuch wurden alle drei enzymatischen Aktivitäten systematisch untersucht, quantifiziert und als spezifische Aktivitäten normiert. Nacheinander wurden konstante Mengen der drei fluorogenen Testsubstrate mit verschiedenen stark verdünnten Lösungen der Proteasompräparation h-Ery inkubiert. Die Tabelle 12 fasst die Versuchsbedingungen zusammen:

**Tabelle 12: Versuchsbedingungen zur Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery**

Substrate	20 µl Z-LLE-AMC (400 µM) bzw. 20 µl BZ-VGR-AMC (400 µM) bzw. 20 µl Suc-LLVY-AMC (200 µM)
Proteasom	20 µl h-Ery Proteasompräparation (Charge 1) in 4 Verdünnungsstufen (1:1, entspricht 5 ng/µl bis 1:16, entspricht 0,313 ng/µl)
Versuchsansätze	30 (5 Proteasomverdünnungen x 3 Aktivitäten x 2 Doppelproben)
Inkubation	90 min bei 37°C
Stopp-Lösung	Ethanol (99,5 %)

Exemplarisch wird einer der 30 Versuchsansätze hier dargestellt. Für den Ansatz mit 20 µl Z-LLE-AMC plus 20 µl der Proteasompräparation h-Ery (unverdünnt 1:1 = 5 ng/µl = 6,67 pmol/ml) wird die Berechnung der Enzymaktivität gezeigt.

**Berechnung des molaren Enzym-Substrat-Verhältnisses:** Bei einer Mischung von 20 µl des Testpeptids Z-LLE-AMC ( $c = 400 \mu\text{mol/l}$ ) mit 20 µl der unverdünnten Proteasompräparation h-Ery (Charge 1,  $c = 6,67 \text{ pmol/ml}$ ) ergab sich ein molares Enzym-Substratverhältnis von etwa 1:60.000.

**Berechnung der umgesetzten Substratmenge:** In dem entsprechenden Probegefäß wurde nach Ende der Inkubation eine Fluoreszenz von 2.674 (gemittelte Doppelprobe) gemessen. Aus der Gleichung (2.2) kann damit der molare Substratumsatz berechnet werden:

$$\text{molarer Substratumsatz} = \frac{2674 - 10}{2,77} \text{ pmol} = 961,73 \text{ pmol} \quad (3.1)$$

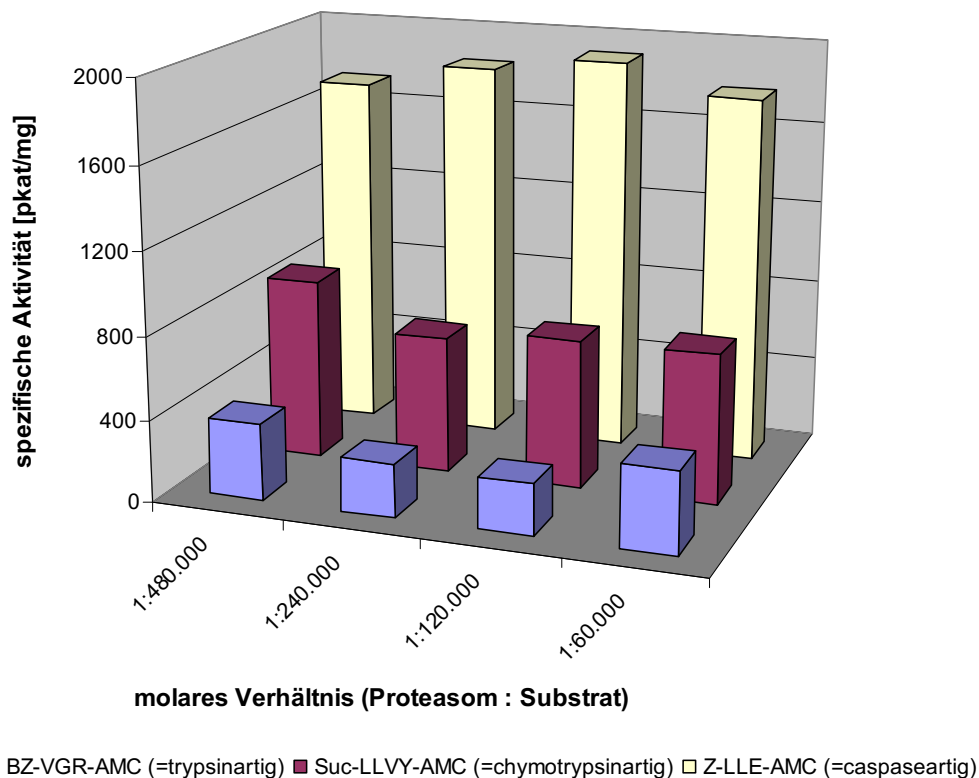
**Berechnung der enzymatischen Aktivität:** Aus dem molaren Substratumsatz von 962 pmol, der eingesetzten Proteasommenge von 0,133 pmol (entspricht 100 ng) und der Inkubationszeit von 90 min kann nach Gleichung (2.3) (s. S. 21) die spezifische enzymatische Aktivität pro Mol Enzym berechnet werden:

$$\text{Aktivität} = \frac{961,73 \text{ pmol}}{90 \cdot 60 \text{ s} \cdot 0,133 \text{ pmol}} = 1,339 \frac{\text{kat}}{\text{mol}} \quad (3.2)$$

Alternativ kann die spezifische Aktivität nach Gleichung (2.4) (s. S. 21) auch auf die Masse des eingesetzten Enzyms bezogen werden:

$$\text{Aktivität} = \frac{961,73 \text{ pmol}}{90 \cdot 60 \text{ s} \cdot 100 \text{ ng}} = 1781 \frac{\text{pkat}}{\text{mg}} \quad (3.3)$$

Die Abb. 20 stellt die Ergebnisse zu den drei enzymatischen Aktivitäten des erythrozytären Proteasoms bei verschiedenen Enzym-Substrat-Verhältnissen dar: Es ist zu erkennen, dass die drei Aktivitäten unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die caspaseartige Aktivität liegt dabei stets höher als die chymotrypsinartige Aktivität. Die trypsinartige Aktivität ist in allen Fällen am niedrigsten (casp > ch-tr > tr). Bei allen drei Testpeptiden zeigt sich im untersuchten Bereich, dass die spezifische Aktivität weitgehend konstant ist und somit (im untersuchten Konzentrationsbereich) unabhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis.



**Abb. 20: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Charge 1) in Abhängigkeit vom Enzym-Substrat-Verhältnis**

Auffällig ist, dass die spezifischen Aktivitäten bei Änderung des Enzym-Substrat-Verhältnisses weitgehend konstant bleiben (vgl. die jew. Säulen von li. nach re.)

**Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery:** Der Versuch vergleicht die enzymatischen Aktivitäten der drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery, um festzustellen, ob die Chargen eine ähnliche Aktivität aufweisen. Die Messung erfolgte für jede Charge analog zum Vorgehen im o. g. Versuch. Da die enzymatischen Aktivitäten in den vorherigen Versuchen unabhängig vom Enzym-Substratverhältnis waren, wurden die gemessenen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Verdünnungsstufen gemittelt. Die Tabelle 13 zeigt die enzymatischen Aktivitäten der drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery jeweils in zwei unterschiedli-

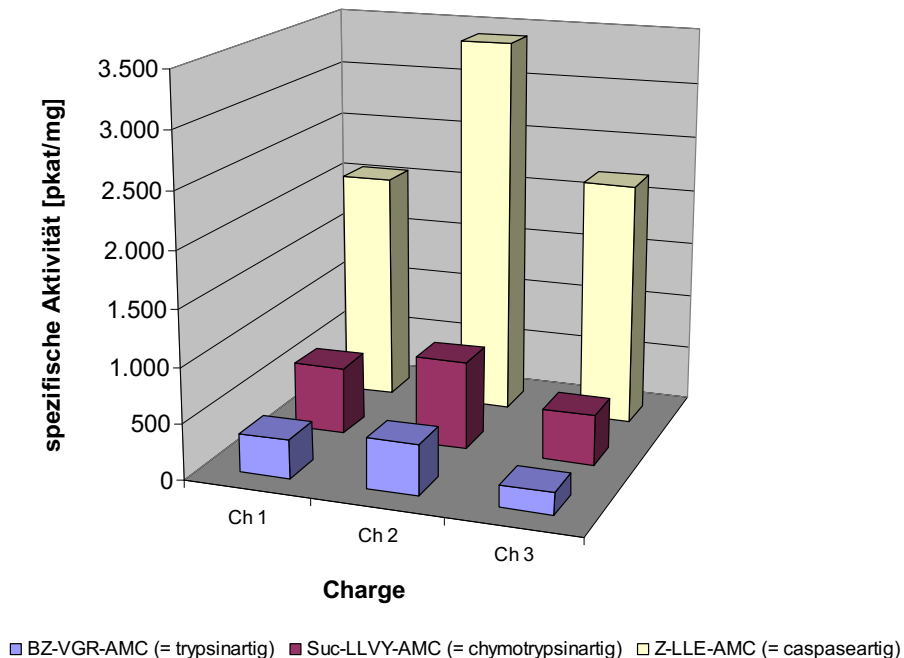
chen Darstellungsweisen: einmal bezogen auf die Masse an Enzym [pkat/mg] und einmal bezogen auf die Masse an Enzym und die Inkubationszeit in Minuten [pmol/ng/min]. Für jede Aktivität wurde ein Mittelwert mit Standardabweichung aus den Messwerten der drei Chargen gebildet, um Vergleiche mit Literaturwerten zu ermöglichen.

**Tabelle 13: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Chargen 1-3)**

Charge	Trypsinartige Aktivität (BZ-VGR-AMC)		Chymotrypsinartige Aktivität (Suc-LLVY-AMC)		Caspaseartige Aktivität (Z-LLE-AMC)	
	[pkat/mg]	[pmol/ng/min]	[pkat/mg]	[pmol/ng/min]	[pkat/mg]	[pmol/ng/min]
1	343	0,021	601	0,036	2066	0,124
2	451	0,027	790	0,047	3404	0,204
3	195	0,012	456	0,027	2194	0,132
M ±SD	330 ±129	0,020 ±0,008	616 ±167	0,037 ±0,010	2555 ±738	0,153 ±0,044

Für jede Charge wurde eine Messreihe durchgeführt (3 Testpeptide mit jeweils 5 verschiedenen Enzym-Substratverhältnisse, jeweils als Doppelproben, Details s. Text). Die Einzelergebnisse stellen Mittelwerte der Doppelproben und der 5 gemessenen Enzym-Substratverhältnisse dar. Um Vergleichbarkeit mit Literaturwerten zu ermöglichen, wurden Mittelwerte (M) aus den drei Chargen mit Standardabweichungen (SD) errechnet.

Die Abb. 21 zeigt die drei enzymatischen Aktivitäten der drei Chargen grafisch.



**Abb. 21: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Chargen 1-3)**  
Grafische Darstellung der Daten aus Tabelle 13

Es ist zu erkennen, dass zwar alle drei Chargen auch jeweils alle drei klassischen enzymatischen Aktivitäten aufweisen, jedoch teilweise in unterschiedlicher Intensität. Die Charge 2 zeigte bei allen drei Aktivitäten die jeweils höchsten Intensitäten, gefolgt von Charge 3 und Charge 1. Die trypsinartigen Aktivitäten der Chargen 3 und 1 waren im Vergleich zu Charge 2 um 56 bzw. 24 % niedriger. Die chymotrypsinartigen Aktivitäten der Chargen 3 und 1 fielen im Vergleich zu Charge 2 um 42 bzw. 24 % niedriger aus. Die caspaseartigen Aktivitäten der Chargen 3 und 1 lagen im Vergleich zu Charge 2 um 35 bzw. 39 % darunter. Wird die chymotrypsinartige Aktivität als Vergleich herangezogen, so gilt im Mittel für alle drei Chargen, dass die caspaseartige Aktivität etwa vierfach über der chymotrypsinartigen Aktivität lag und die trypsinartige Aktivität nur halb so hoch ausfiel, wie die chymotrypsinartige Aktivität.

Das Ergebnis zeigt, dass verschiedene h-Ery-Proteasompräparationen, trotz ihres gemeinsamen Ursprungs aus demselben Körperkompartiment, deutliche Abweichungen in der enzymatischen Aktivität aufweisen können.

### 3.2.2 Enzymatische Aktivität des alveolären 20S Proteasoms bei PAP

Die Untersuchung erfolgte exemplarisch an der PAP-BALF WLL48. Das Proteasom wurde dafür nicht aus der BALF isoliert, sondern der BALF-Überstand, der das Proteasom enthält, wurde mit fluorogenen Peptiden inkubiert. Die Einflüsse des Enzym-Substrat-Verhältnisses und der Inkubationszeit wurden untersucht. Zuvor musste die BALF jedoch aufbereitet werden.

**Aufbereitung der BALF:** Die Probe WLL48 enthielt 20S Proteasom in der Konzentration von 1.731 ng/ml (Messwert mitgeteilt von PD Dr. Stephan Sixt). Die BALF wurde zentrifugiert und der Überstand, in dem sich das Proteasom befand [2], abgenommen. Das Volumen des Pellets war im Vergleich zum Überstand vernachlässigbar. Deshalb wurde die Annahme getroffen, dass die Konzentration des 20S Proteasoms im Überstand etwa gleich groß ist wie die Proteasomkonzentration in der Suspension, also 1.731 ng/ml. Der Überstand wurde unverdünnt, 1:5 und 1:10 verdünnt mit den fluorogenen Peptiden inkubiert.

**Versuchsablauf:** Der Versuchsablauf folgte dem Protokoll aus Abschnitt 2.4. Zu jeweils 20 µl Testsubstrat in den Endkonzentrationen 200 µM Suc-LLVY-AMC, 400 µM, BZ-VGR-AMC, bzw. 400 µM Z-LLE-AMC wurden 20 µl BALF-Überstand in den Verdünnungen 1:1, 1:5 bzw. 1:10 hinzugegeben. 20 µl BALF (1:1) enthielten etwa 35 µg 20S Proteasom. Zum Stoppen der Reaktion wurde in dieser Versuchsreihe die

Stopp-Lösung nach Tabelle 6 (s. S. 19) verwendet, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass Ethanol nicht geeignet war, die Reaktion vollständig zu stoppen (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2.1 Einfluss von Inkubationszeit und Enzym-Substrat-Verhältnis

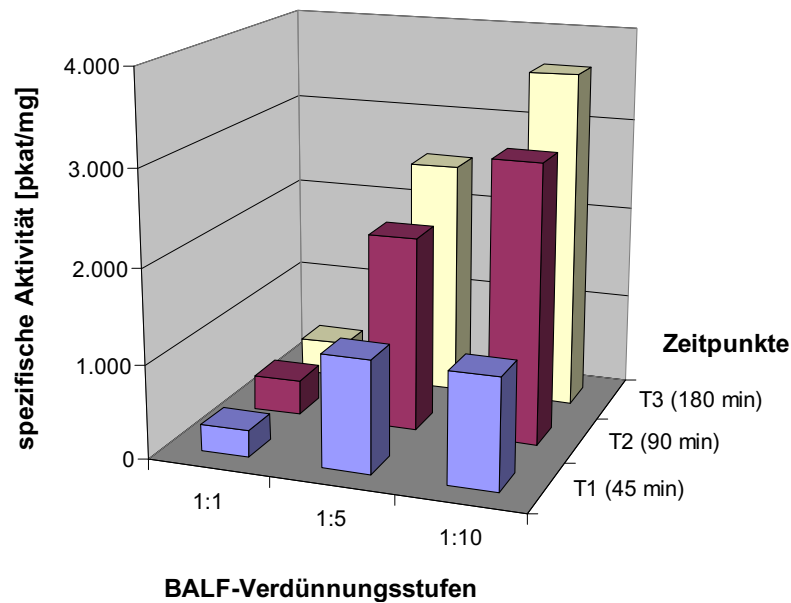
Zunächst erfolgte exemplarisch die Betrachtung einer einzigen enzymatischen Aktivität (chymotrypsinartige Aktivität) im zeitlichen Verlauf. Das entsprechende Testpeptid Suc-LLVY-AMC wurde zusammen mit WLL48-Überstand inkubiert. Die Reaktion wurde nach 45, 90 bzw. 180 min gestoppt. Die Tabelle 14 fasst die Versuchsbedingungen zusammen:

**Tabelle 14: Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses des Enzym-Substrat-Verhältnisses und der Inkubationszeit auf die chymotrypsinartige Aktivität der PAP-BALF WLL48**

Substrat	20 µl Suc-LLVY-AMC (200 µM)
Proteasom	20 µl BALF WLL48 Überstand unverdünnt (1:1, entspricht 1,731 ng/µl) sowie verdünnt (1:5) und (1:10)
Versuchsansätze	18 (3 BALF-Verdünnungen x 3 Zeitpunkte x 2 Doppelproben)
Inkubation	45, 90 und 180 min bei 37°C
Stopp-Lösung	Stopp-Lösung nach Tabelle 6

Die Abb. 22 (s. 46) zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten der verschieden stark verdünnten BALF zu den drei genannten Zeitpunkten. Es lässt sich erkennen, dass die chymotrypsinartige Aktivität in der PAP-BALF WLL48 vorhanden war. Sie konnte zu allen Zeitpunkten und in allen Verdünnungsstufen nachgewiesen werden. Dargestellt ist die spezifische Aktivität, d. h. der gemessene Substratumsatz ist normiert auf die Inkubationszeit und die eingesetzte Proteasommenge. Eine Verdünnung der Probe hatte zur Folge, dass die spezifische Aktivität sich nicht konstant zeigte. In der Probe mit 1:10 verdünnter Lavage lag die spezifische Enzymaktivität um Faktor 5 bis 10 über der Probe mit unverdünnter Lavage. Auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich die spezifische Aktivität nicht konstant. Bei unverdünnter Lavage stieg die spezifische Aktivität von Zeitpunkt T1 zum Zeitpunkt T3 um 30 % an. Bei der 1:5 Verdünnung verdoppelte sie sich, und bei der 1:10 Verdünnung verdreifachte sie sich sogar in diesem Zeitraum.

Das Ergebnis legt nahe, dass das Proteasom in der Lavage WLL48 spezifische Aktivitäten aufweist, die abhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis von der Inkubationszeit sind. Die höchste Aktivität wurde mit der 1:10 verdünnten Lavage und 180 min Inkubationszeit gemessen.

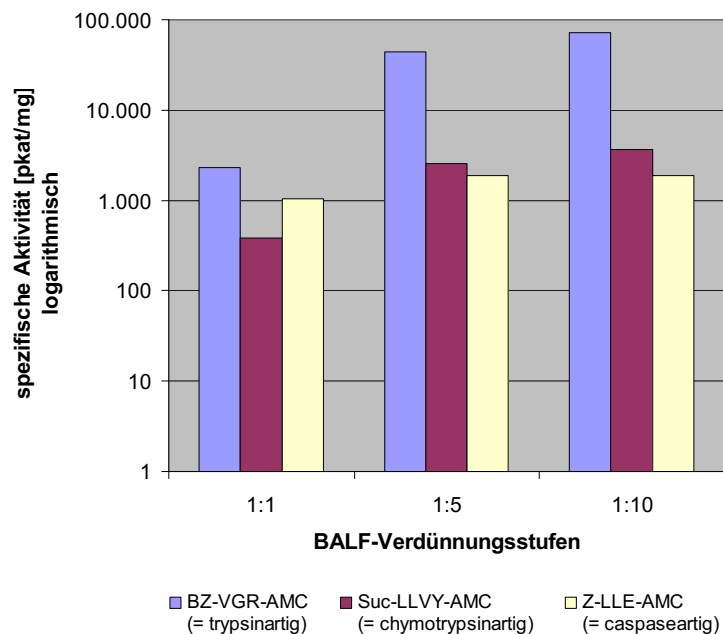


**Abb. 22: Spezifische chymotrypsinartige Aktivität der PAP-BALF WLL48 in Abhängigkeit der BALF-Verdünnung und der Inkubationszeit**

Grafische Darstellung der Ergebnisse aus dem in Tabelle 14 genannten Versuchsaufbau. Gemittelte Doppelproben.

### 3.2.2.2 Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten

Im folgenden Versuch wurden alle drei Enzymaktivitäten zum Zeitpunkt T3 (nach 180 min Inkubation) untersucht und verglichen (s. Abb. 23).



**Abb. 23: Spezifische Aktivitäten der PAP-BALF WLL48 in Abhängigkeit der BALF-Verdünnung**

Logarithmische Darstellung der Ergebnisse nach Inkubation von unverdünnter BALF (1:1), sowie 1:5 und 1:10 verdünnter BALF, nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten. Gemittelte Doppelproben.



Bei allen Messwerten handelt es sich um spezifische Aktivitäten, das heißt, die Aktivitäten sind bezogen auf die jeweils vorliegende Proteasomkonzentration. Unverdünnte Lavage (1:1) zeigte dabei die niedrigsten spezifischen Enzymaktivitäten. Dabei war die trypsinartige Aktivität höher als die caspaseartige Aktivität und diese wiederum höher als die chymotrypsinartige Aktivität. Mit zunehmender Verdünnung (1:5 bzw. 1:10) stiegen die spezifischen Aktivitäten insgesamt stark an. Die spezifische Aktivität für trypsinartiges Verhalten beispielsweise lag im Falle der 1:10-Verdünnungen um Faktor 30 höher als bei unverdünnter BALF.

Die Ergebnisse zeigen, dass die PAP-BALF WLL48 bei der Degradation fluorogener Peptide alle drei klassischen enzymatischen Aktivitäten aufweist. Die trypsinartige Aktivität war dabei am stärksten ausgeprägt, und mit Abstand folgten die caspase- und chymotrypsinartigen Aktivitäten. Die spezifischen Aktivitäten waren abhängig von der Verdünnung der BALF und stiegen bemerkenswerterweise mit zunehmender Verdünnung an.

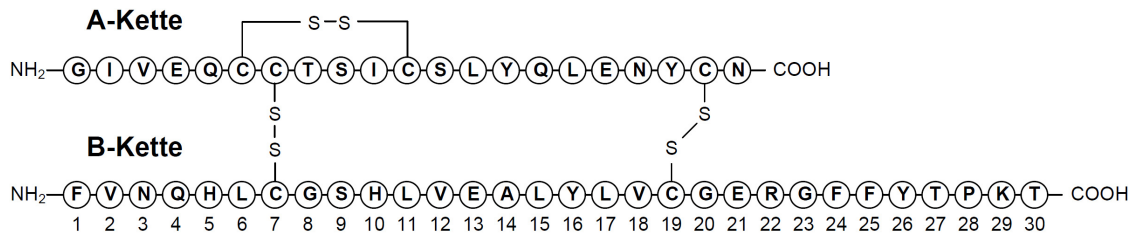
### **3.3 Entwicklung und Anwendung eines *in vitro* Testsystems zum Verdau von Proteinen durch 20S Proteasom und der massenspektrometrischen Charakterisierung der Produkte**

Ziel der folgenden Versuche war es, ein Verfahren zu etablieren, mit dem der proteasomale Verdau von Proteinen *in vitro* nachgestellt und die Verdauprodukte im Anschluss analysiert werden können. Das Verfahren wurde an Insulin als Modellsubstrat etabliert und im Anschluss genutzt, um den Verdau des alveolären Proteins HSA durch 20 S Proteasom zu studieren.

#### **3.3.1 Entwicklung des Testsystems und Anwendung an Insulin als Modellsubstrat**

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann darüber bestimmen, ob ein Protein vom Proteasom degradiert werden kann oder nicht. Es stellt sich die Frage, ob die 3D-Struktur dabei vollständig aufgebrochen werden muss und wie dies *in vitro* erfolgen kann und ggf. *in vivo* auch tatsächlich erfolgt. Um dies näher zu untersuchen, wurde Insulin als Modellsubstrat für das 20S Proteasom gewählt, weil es mit 51 Aminosäuren vergleichsweise klein ist, aber dennoch eine komplexe 3D-Struktur aufweist (s. Abb. 24). Mit seinen zwei Aminosäureketten und den beiden stark strukturbildenden intermo-

lekularen Disulfidbrücken ist Insulin gut geeignet, den Einfluss der Teriärstruktur auf das 20S Proteasom zu zeigen.



**Abb. 24: Struktur von Insulin**

Die A-Kette (21 Aminosäuren) ist über zwei intermolekulare Disulfidbrücken (S-S) mit der B-Kette (30 Aminosäuren) verbunden. Innerhalb der A-Kette besteht eine intramolekulare Disulfidbrücke.

### 3.3.1.1 Versuchsaufbau

**Inkubation von Insulin mit 20S Proteasom:** Rekombinant hergestelltes Humaninsulin wurde zusammen mit 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten (h-Ery) inkubiert. Der Verdau erfolgte bei 37°C in einer HEPES-Pufferlösung (s. Tabelle 1, S. 14) in Anlehnung an [140–142]) bei pH 7,8. Als Enzym-Substrat-Verhältnis wurde 1:7.000 gewählt in Anlehnung an Versuche von Eggers et al. [140], die ein Oligopeptid (17 Aminosäuren, Molekulargewicht ca. 2 kDa) zusammen mit 20S Proteasom inkubierten. Die Ansätze wurden jeweils an zwei Zeitpunkten (nach einer und nach 19 Stunden Inkubation) massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurden jeweils 10 µl Probe entsalzt, ein MS-Übersichtsspektrum aufgenommen und prominente Signale im MS/MS-Verfahren identifiziert.

**Untersuchung des Einflusses der 3D-Struktur von Insulin auf den Verdau:** Um die Einflüsse der dreidimensionalen Struktur von Insulin zu untersuchen, wurden in einem zweiten Versuchsansatz die Disulfidbrücken zwischen der Insulin-A- und B-Kette aufgebrochen, bevor es mit Proteasom inkubiert wurde. Zum Aufbrechen der Disulfidbrücken wurde Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens verwendet.

**Untersuchung des Auftretens von spontaner nicht-proteasomaler Degradation:** Um zu differenzieren, ob eine Degradation des Insulinmoleküls Folge proteasomaler Degradation ist, oder allein schon durch die Inkubationsbedingungen erfolgt, wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen Insulin den genannten Versuchsbedingungen unterzogen wurde, jedoch ohne Proteasom hinzuzufügen.

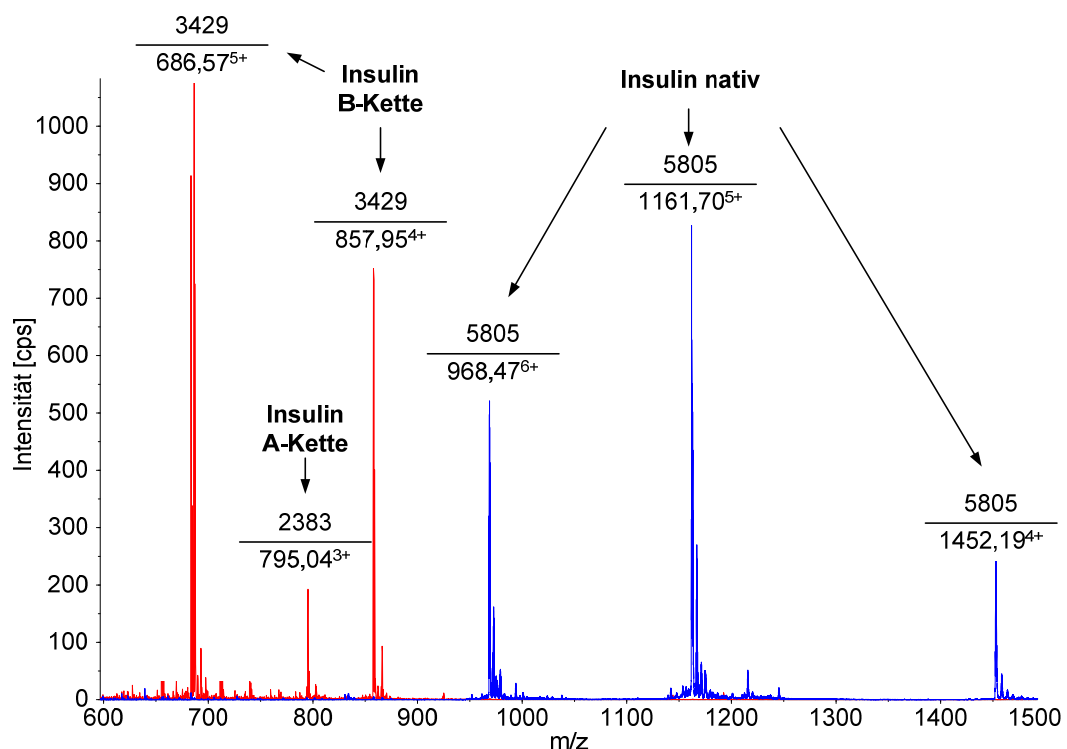
**Übersicht über die Versuchsansätze:** In Tabelle 15 ist eine Übersicht über die Versuchsansätze und die zugehörigen Kontrollen gegeben:

**Tabelle 15: Versuchsansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin**

Ansatz Nr.	Kontrollen		Versuche	
	1	2	3	4
Insulin [5 mM]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
DTT [0,15 M]	0	1 µl	1 µl	0
20S Proteasom [0,4 µg/µl]	0	0	1,25 µl	1,25 µl
HEPES-Puffer	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

### 3.3.1.2 Untersuchungen zum Einfluss der 3D-Struktur von Insulin

**Inkubation von nativem Insulin mit Dithiothreitol:** Natives Insulin wurde mit und ohne Dithiothreitol für eine Stunde inkubiert (Ansätze 1 und 2). Die beiden im Anschluss aufgenommenen MS-Spektren sind in Abb. 25 als überlagerte Spektren dargestellt. Es wurden insgesamt lediglich sechs Signale detektiert, die in Tabelle 16 (s. S. 50) genauer beschrieben werden.



**Abb. 25: MS-Übersichtsspektren der Kontrollansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin**

1. MS-Spektrum von nativem Insulin (Ansatz 1, blau hervorgehoben); 2. MS-Spektrum von Insulin in Anwesenheit von DTT (Ansatz 2, rot hervorgehoben). Beide Ansätze gemessen nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C in HEPES-Puffer.

Die Ergebnisse zeigen, dass natives Insulin ohne DTT-Zugabe in Lösung über eine Stunde stabil bleibt (Nachweis des nativen Insulins im MS; keine Insulinfragmente im MS). Insulin war unter diesen Bedingungen auch noch nach 19 Stunden stabil (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von DTT dagegen war Insulin bereits nach einer Stunde vollständig in seine beiden Teilketten gespalten (Signale des nativen Insulins sind nicht detektierbar; A- und B-Ketten sind im MS nachweisbar). Nach 19 Stunden waren die solitären Insulin-Ketten im Sinne einer spontanen Degradation in kleinere Insulinfragmente zerfallen (Fragmente sind im MS sichtbar; A- und B-Ketten sind nicht mehr detektierbar; Daten nicht gezeigt).

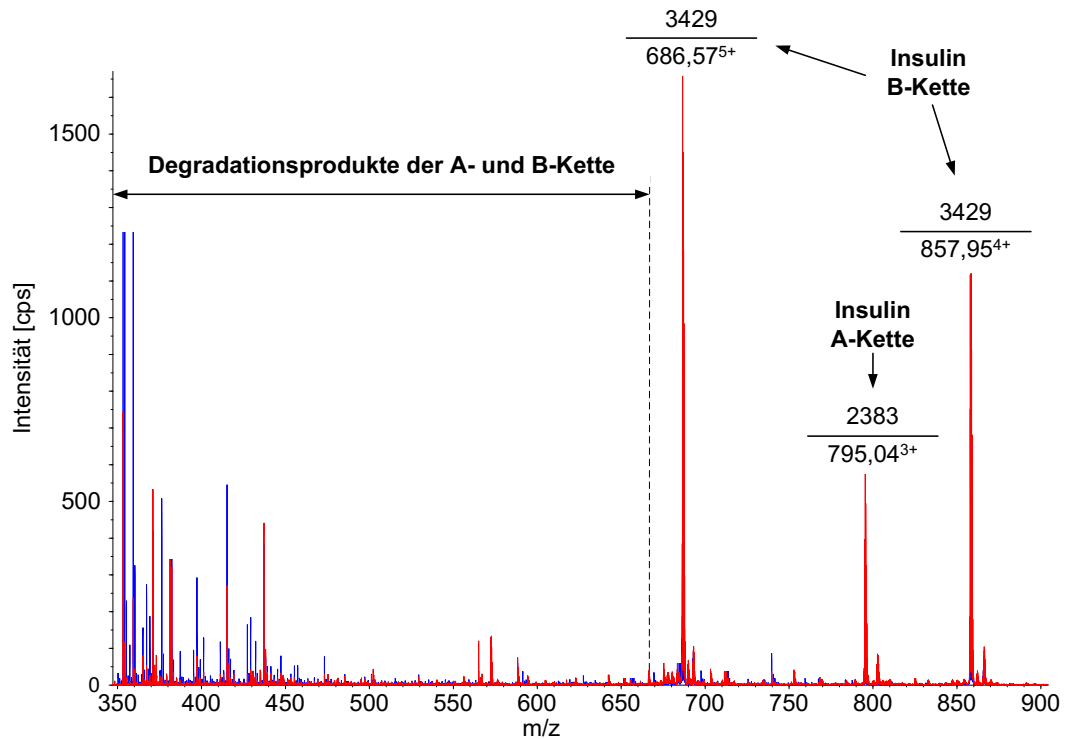
**Tabelle 16: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von nativem Insulin mit und ohne DTT-Zugabe**

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz	Insulin	
				nativ (Ansatz 1)	nativ+DTT (Ansatz 2)
				Signal vorhanden	
686,570	5	3428,850	Insulin B-Kette	nein	ja
795,038	3	2383,114	Insulin A-Kette	nein	ja
857,953	4	3428,812	Insulin B-Kette	nein	ja
968,470	6	5805,82	Insulin-Gesamtmolekül	ja	nein
1161,939	5	5805,70	Insulin-Gesamtmolekül	ja	nein
1452,191	4	5805,76	Insulin-Gesamtmolekül	ja	nein

**Inkubation von nativem Insulin mit 20S Proteasom:** Zunächst wurde natives Insulin zusammen mit 20S Proteasom inkubiert und mit der Kontrolle ohne 20S Zugabe verglichen (Ansätze 4 und 1). Sowohl nach einer Stunde, als auch nach 19 Stunden zeigten sich keine Unterschiede in den MS-Spektren (Daten nicht gezeigt). Das heißt, natives Insulin wurde nicht vom 20S Proteasom degradiert.

**Inkubation von DTT-behandeltem Insulin mit 20S Proteasom:** Im folgenden Versuch wurde DTT-vorbehandeltes Insulin, also solitäre A- und B-Ketten, mit und ohne Proteasom inkubiert (Ansätze 2 und 3). Die Abb. 26 zeigt die überlagerten MS-Übersichtsspektren der beiden Ansätze. In beiden Fällen sind die drei hohen *Peaks* vorhanden, die die solitären Ketten A und B repräsentieren (zwei *Peaks* repräsentieren die B-Kette in zwei verschiedenen Ladungszuständen, der dritte *Peak* repräsentiert die A-Kette). Neu in diesem Ansatz waren zahlreiche Signale mehrfachgeladener Ionen im Massenbereich ab  $m/z > 350$ , die Degradationsprodukte der Insulinketten darstellten. Um zu zeigen, dass die Fragmente Produkte proteasomaler Degradation sind, musste ausgeschlossen werden, dass es sich um Produkte spontaner Degradation unter dem

Einfluss von DTT handelt. Dies erfolgte durch direkten Vergleich aller Signale aus dem Versuch mit Proteasom und der Kontrolle ohne Proteasom im folgenden Abschnitt.



**Abb. 26: MS-Übersichtsspektren der Versuchsansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin**

1. MS-Spektrum von Insulin in Anwesenheit von DTT (Ansatz 2, rot hervorgehoben); 2. MS-Spektrum von Insulin in Anwesenheit von DTT und 20S Proteasom (Ansatz 3, rot hervorgehoben). Beide Ansätze gemessen nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C in HEPES-Puffer.

### 3.3.1.3 Schnittverhalten von 20S Proteasom beim Verdau von Insulin

Die Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über die vorhandenen Signale nach 19 Stunden Inkubation von DTT-behandeltem Insulin mit und ohne Proteasom (Ansätze 2 und 3).

**Tabelle 17: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von Insulin in Anwesenheit von DTT mit und ohne 20S Proteasom-Zugabe**

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz	Insulin	
				+DTT (Ansatz 2)	+DTT +20S (Ansatz 3)
				Signalintensität [cps]	
372,69	2	744,380		0	88
374,70	2	748,400		0	70
376,22	2	751,440		0	30
376,25	2	751,500		0	80
379,21	2	757,420	B 1-6	0	1100
387,21	2	773,420		0	50

Tabelle 17 (Fortsetzung)

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz	Insulin	
				+DTT (Ansatz 2)	+DTT +20S (Ansatz 3)
				Signalintensität [cps]	
390,22	2	779,440		0	40
413,24	2	825,478	B 8-15	0	460
420,23	2	839,460		0	70
424,23	2	847,460		0	210
430,72	2	860,440	B 1-7	60	1500
460,24	2	919,472	B 21-27	0	100
464,75	2	928,490	B 7-15	0	435
479,30	2	957,600		0	200
480,76	2	960,514	B 23-30	0	720
488,74	2	976,484	B 20-27	0	660
497,24	2	993,480		0	900
521,29	2	1041,582	B 6-15	0	70
522,81	2	1044,610	B 9-17	0	150
526,76	2	1052,512	A 1-10	0	100
533,27	2	1065,540	B 5-15	0	70
537,75	2	1074,494		0	70
540,26	2	1079,520		0	60
545,30	2	1089,606		0	100
551,31	2	1101,626	B 8-17	0	700
562,31	2	1123,610		0	35
565,79	2	1130,580		0	19
566,77	2	1132,548		0	38
570,29	2	1139,576		0	30
572,82	2	1144,640		25	0
578,27	2	1155,532	A 1-11	18	65
589,78	2	1178,568	B 18-27	0	250
600,85	2	1200,692		0	130
602,82	2	1204,636		0	190
409,89	3	1227,670		0	115
622,83	2	1244,660		90	0
623,33	2	1245,656		0	345
415,89	3	1245,670		0	280
418,89	3	1254,670		0	70
635,28	2	1269,560		0	60
638,85	2	1276,700		20	0
641,30	2	1281,600		0	30
642,27	2	1283,540		0	30
651,83	2	1302,664	B 20-30	0	1000
434,90	3	1302,697	B 20-30	6	1500
659,35	2	1317,694		15	15
663,34	2	1325,680		0	35
447,56	3	1340,680		0	155
671,33	2	1341,652		0	30

Tabelle 17 (Fortsetzung)

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz	Insulin	
				+DTT	+DTT +20S
				(Ansatz 2)	(Ansatz 3)
				Signalintensität [cps]	
447,89	3	1341,670		0	170
675,79	2	1350,584		0	60
681,37	2	1361,740		0	100
686,78	2	1372,558		0	45
459,24	3	1375,720		40	50
692,80	2	1384,592		0	25
694,33	2	1387,660		0	45
700,78	2	1400,562		0	15
469,24	3	1405,723	B 19-30	0	280
703,85	2	1406,700	B 7-19	0	160
727,86	2	1454,722		0	30
741,87	2	1482,746	B 1-13	0	60
494,93	3	1482,784	B 1-13	0	500
752,88	2	1504,752	B 18-30	0	170
502,26	3	1504,783	B 18-30	25	880
757,35	2	1513,700		18	20
518,61	3	1553,842	B 1-14	0	80
556,30	3	1666,900	B 1-15	15	140
877,87	2	1754,740		8	20
890,95	2	1780,900	B 16-30	0	40
594,31	3	1780,930	B 16-30	18	375
891,45	2	1781,894		0	45
928,39	2	1855,770		0	10
929,38	2	1857,760		0	15
940,37	2	1879,738		0	6
993,40	2	1985,808		0	4
784,71	3	2352,130	A komplett	20	0
789,04	3	2365,120	A komplett	60	0
795,04	3	2383,120	A komplett	300	20
1192,51	2	2384,014	A komplett	16	2
802,36	3	2405,080	A komplett	100	10
1175,04	4	4697,160		2	0
1183,04	4	4729,160		3	0

**Insulin + DTT:** Im Ansatz mit Insulin und DTT ohne Proteasom wurde die A-Kette nachgewiesen, die B-Kette jedoch nicht. Abgesehen von den Signalen, die die A-Kette repräsentieren, zeigten sich 12 weitere Signale mit geringer Intensität im MS (Intensitäten max. 60 cps). Davon konnten fünf Signale identifiziert werden. Diese stellten Fragmente der Insulin B-Kette dar, bei denen es sich um spontane, nicht-proteasomale Degradationsprodukte handelte. Bevorzugte Bruchstellen der B-Kette waren die Bindun-

gen zwischen den Aminosäuren 7/8 (C/G), 19/20 (C/G), 15/16 (L/Y) und 17/18 (L/V). Fragmente aus der A-Kette wurden nicht detektiert, was darauf hindeutet, dass diese im Gegensatz zur B-Kette stabil in Lösung blieb und keiner spontanen Degradation unterlag.

**Insulin + DTT + 20S:** Im Ansatz mit Insulin, DTT und 20S Proteasom wurden nach 19 Stunden weder die A- noch die B-Kette nachgewiesen, d. h. beide wurden degradiert. Im MS waren 75 Signale mit z. T. sehr hohen Intensitäten (bis zu 1500 cps) abgrenzbar, aus denen 19 Peptide der B-Kette und ein Peptid der A-Kette identifiziert werden konnten. Die B-Kette wurde mit einer Sequenzabdeckung von 100 % identifiziert, die A-Kette mit etwa 50 %. Von den 75 Signalen erschienen 66 Signale ausschließlich im Ansatz mit Proteasom. Die neun bekannten Signale aus dem Ansatz ohne Proteasom kamen hier meist in erheblich höheren Signalintensitäten vor.

Die hohe Anzahl an neu aufgetretenen Peptiden und die insgesamt sehr hohen Signalintensitäten beim Ansatz mit Proteasom zeigen im Vergleich mit den Ergebnissen des Kontrollversuchs ohne Proteasom, dass das 20S Proteasom enzymatische Aktivität für denaturiertes Insulin besitzt. Bevorzugte Schnittstellen waren dabei 7/8 (C/G), 19/20 (C/G), 15/16 (L/Y), 17/18 (L/V) und 6/7 (L/C).

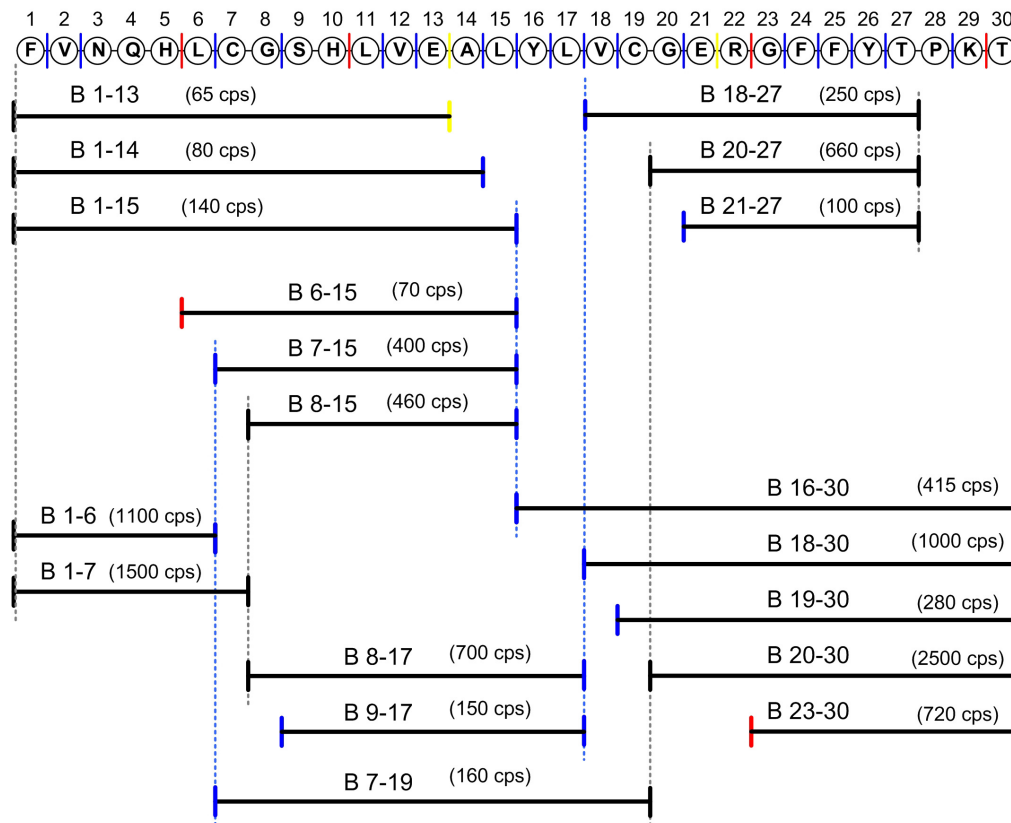
**Schnittkarte Insulin B-Kette:** Die Ergebnisse werden in einer sogenannten Schnittkarte grafisch dargestellt (s. Abb. 27). Neben den im Experiment tatsächlich detektierten Schnittstellen wurden auch die theoretisch möglichen proteasomalen Schnittstellen dargestellt. Dies sind diejenigen Peptidbindungen, die sich aufgrund der drei klassischen Aktivitäten des Proteasoms als theoretisch mögliche Schnittstellen ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die C-terminalen Peptidbindungen folgender Aminosäuren als trypsin-, chymotrypsin-, bzw. caspaseartig eingestuft (s. Tabelle 18, sowie Diskussion, Abschnitt 4.4, S. 91):

**Tabelle 18: Theoretische Schnittstellen der drei klassischen Aktivitäten des Proteasoms**

Enzymaktivität	Schnitt C-terminal der Aminosäure
trypsinartig	K, R, H
chymotrypsinartig	V, L, I, M, F, A, P, G, W, Y
caspaseartig	D, E



Auf dieser Basis ergibt sich die folgende Schnittkarte der Insulin B-Kette aus theoretisch vorhergesagten Schnittstellen und den tatsächlich im Experiment identifizierten Peptiden:

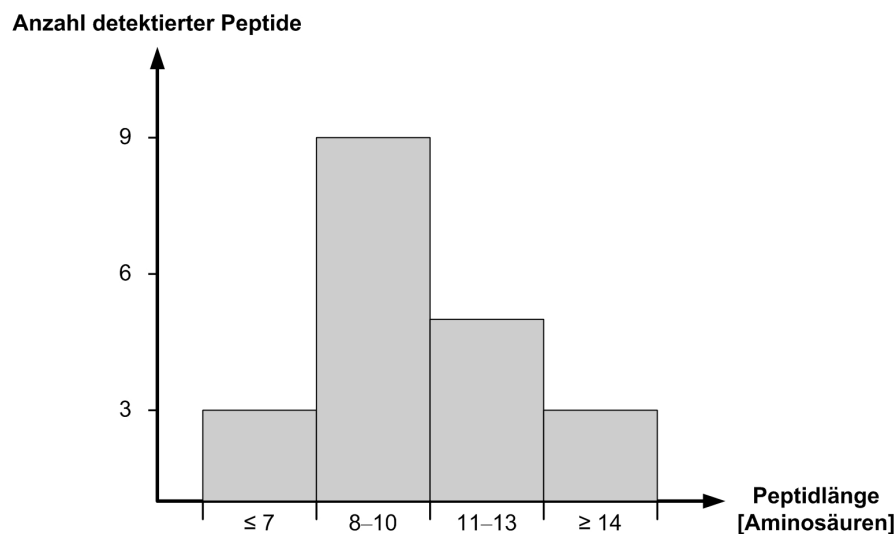


**Abb. 27: Schnittkarte der Insulin B-Kette**

Dargestellt sind die massenspektrometrisch identifizierten Verdauprodukte der Insulin B-Kette. Gemessen wurde nach 19-stündiger Inkubation von Insulin in Anwesenheit von DTT und 20S Proteasom bei 37°C in einem HEPES-Puffer (Ansatz 3). In der Sequenz der B-Kette sind die theoretisch vorhergesagten Schnittstellen farblich hervorgehoben (rot: trypsinartig; blau: chymotrypsinartig; gelb: caspaseartig). Die Schnittstellen der tatsächlich nachgewiesenen Schnittprodukte sind als Balken dargestellt und im gleichen Farbcode markiert. In Klammern stehen die Signalintensitäten des jeweiligen Peptids aus dem MS-Übersichtsspektrum als Maß für dessen Auftretenshäufigkeit.

Was das tatsächlich beobachtete Schnittverhalten des Proteasoms betrifft, lässt sich aus der Schnittkarte Folgendes ablesen: Es wurden Peptide mit Schnitten an trypsin-, chymotrypsin- und caspaseartigen Schnittstellen nachgewiesen, d. h. das 20S Proteasom zeigte beim Verdau der Insulin B-Kette alle drei klassischen Aktivitäten. Von den 19 identifizierten Peptiden enthielten 14 Peptide ein oder zwei chymotrypsinartige Schnitte. Trypsin- und caspaseartige Schnitte traten nur zwei- bzw. einmal auf. Darüber hinaus gab es Peptide, die Schnitte an drei weiteren Schnittstellen aufwiesen, nämlich an den Aminosäuren 7/8 (C/G), 19/20 (C/G) und 27/28 (T/P), die keine theoretischen Schnitt-

stellen in Bezug auf das Konzept der drei klassischen Proteasomaktivitäten darstellen. Wird die Intensität der jeweiligen Peptide aus dem MS-Übersichtsspektrum als Maß für die Konzentration des Peptids in der Probe mit einbezogen, dann ergibt sich folgendes Bild: Etwa 47 % der Schnitte fanden an atypischen Schnittstellen statt, 45 % an chymotrypsinartigen Schnittstellen und nur 7 bzw. <1 % an trypsin- bzw. caspaseartigen Schnittstellen. Die meisten der identifizierten Peptide hatten eine Länge von 8-13 Aminosäuren, längere oder kürzere Peptide waren seltener. Die Peptidlängenverteilung ist in folgendem Histogramm veranschaulicht (s. Abb. 28).



**Abb. 28: Längenverteilung der Verdauungsprodukte des Insulins**

Das Histogramm zeigt die Peptidlängenverteilung der Verdauungsprodukte aus Ansatz 3 zum Verdau von Insulin durch 20S Proteasom.

Die Ergebnisse zeigen, dass 20S Proteasom die solitären Insulin-Ketten A und B degradieren konnte mit klarer Präferenz für die B-Kette. In etwa der Hälfte der Fälle schnitt es beim Verdau der B-Kette an sogenannten atypischen Schnittstellen, die (bezogen auf das Konzept der drei klassischen Proteasomaktivitäten) keine theoretischen Schnittstellen darstellen. Bei den übrigen Schnitten, die an theoretisch vorhergesagten Schnittstellen erfolgten, handelte es sich überwiegend um chymotrypsinartige Schnitte.

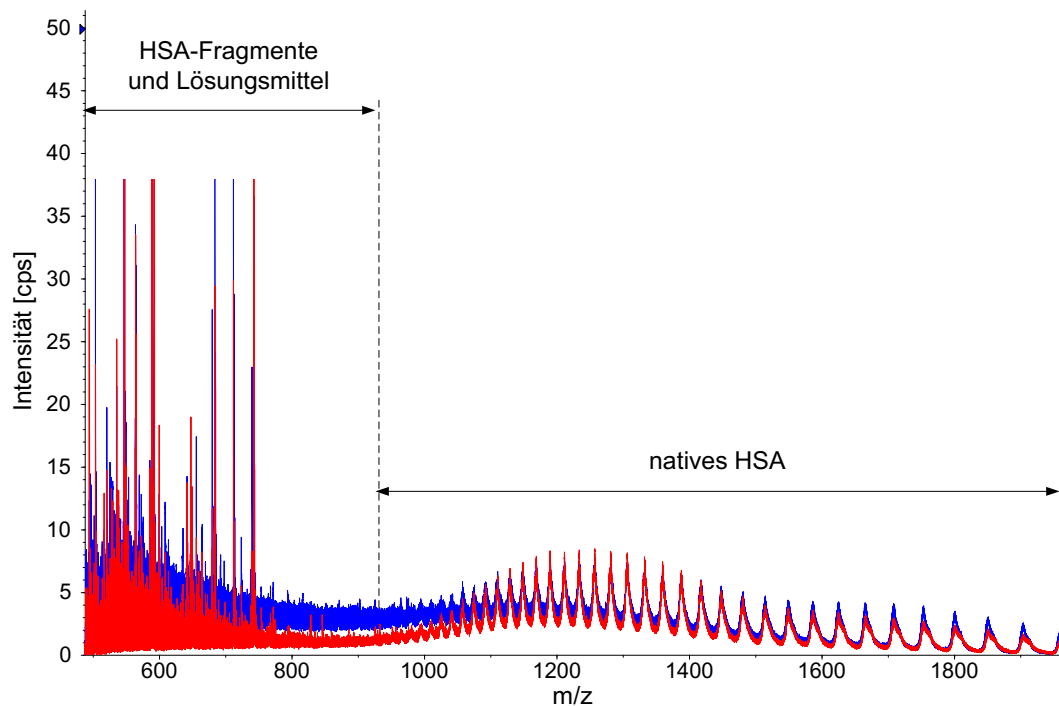
### 3.3.2 Vorbehandlung von Albumin

HSA, das in PAP-BALF nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Die Ergebnisse zum Verdau von Insulin durch 20 S Proteasom zeigten einen erheblichen Einfluss der 3D Struktur des Proteins auf den Verdau. Nur denaturiertes Insulin stellte ein geeignetes Substrat für das 20S Proteasom dar. Aus diesem Grund sollten Verdauversuchen von HSA durch 20S Proteasom an HSA mit unterschiedlich

denaturierter Struktur durchgeführt werden. Deshalb wurde zunächst das Verhalten von HSA in Lösung sowie unter denaturierenden Bedingungen (DTT, Temperatur, pH, Puffer, Ionen) und unter oxidierenden Bedingungen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) untersucht.

### 3.3.2.1 Untersuchung zur Stabilität von HSA in Lösung

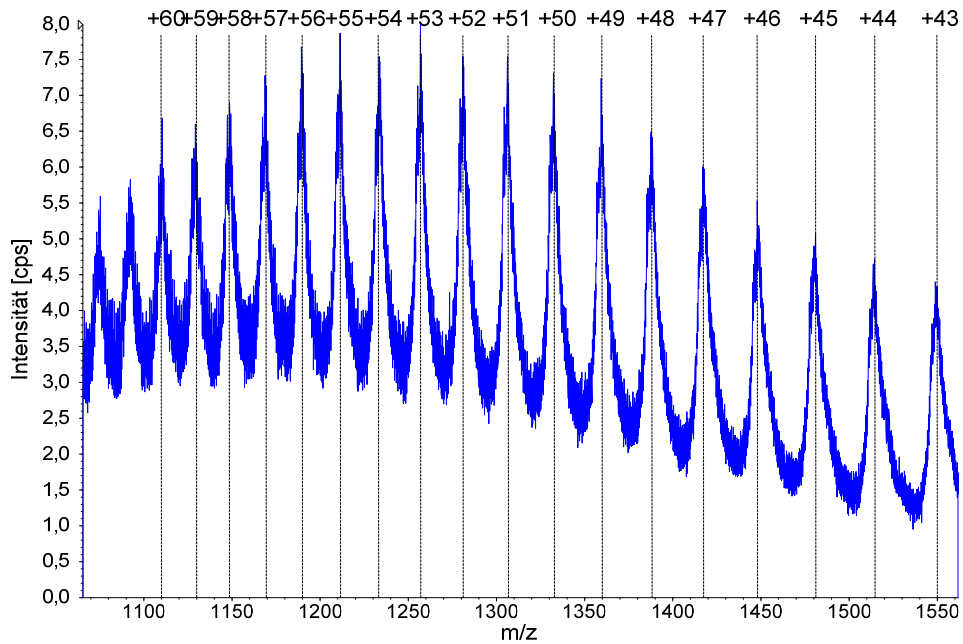
Die folgenden beiden Versuche sollten zeigen, ob sich HSA in Lösung über die Zeit stabil verhält. Zunächst wurde aus lyophilisiertem HSA (vgl. Abschnitt 2.1) eine 0,5 mM Lösung mit Reinstwasser hergestellt. Um mögliche kleinmolekulare Verunreinigungen zu entfernen, wurde eine Dialyse vorangeschaltet (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das dialysierte HSA wurde einmal direkt nach der Dialyse und ein zweites Mal nach 20 Stunden Inkubation bei 4°C entsalzt und massenspektrometrisch untersucht. Die Abb. 29 zeigt die beiden überlagerten Übersichtsspektren.



**Abb. 29: MS-Übersichtsspektren von nativem HSA**

1. MS-Spektrum von nativem HSA, gemessen direkt nach Herstellung der HSA-Lösung (blau);
2. MS-Spektrum von nativem HSA, gemessen nach 20 Stunden Inkubation bei 4°C (rot).

Im Massenbereich von  $m/z = 1000-1950$  erschien in beiden Fällen natives HSA als gezacktes Signal. Eine Proteinrekonstruktion mittels Dekonvolution (Verfahren s. Abschnitt 2.7.3.1) errechnet eine Masse von 66.457 Da in guter Näherung zur Herstellerangabe von 66.478 Da (s. Abb. 30, S. 58).



**Abb. 30: MS-Dekonvolutionspektrum von nativem HSA**

Gemessen direkt nach Herstellung der HSA-Lösung. Rekonstruktion der Proteinmasse durch Dekonvolution. Angegeben sind die Anzahl der angelagerten Protonen, errechnet durch das Auswerte-Tool „Bayesian Protein Reconstruct“ der Software Analyst.

In Abb. 29 zeigen sich im Massenbereich von  $m/z < 900$  nach beiden Zeitpunkten Signale von Lösungsmitteln aus der MS-Probenvorbereitung und einigen wenigen HSA-Fragmenten (Details s. Tabelle 19).

**Tabelle 19: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Untersuchung von nativem HSA**

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz	HSA nativ	
				ohne Inkubationszeit	nach 20h bei 4°C
				Signal vorhanden	
563,31	2	1125,62		ja	ja
591,35	2	1181,70	HSA 423-432	ja	ja
641,35	2	1281,70		ja	ja
723,35	2	1445,70		ja	ja
742,43	2	1483,86	HSA 438-451	ja	ja
438,25	2	875,50		nein	ja
448,60	3	1343,80		nein	ja
478,80	2	956,60	HSA 438-446	nein	ja
493,81	2	986,62	HSA 447-455	nein	ja
535,30	2	1069,60	HSA 433-446	nein	ja
548,34	2	1095,68		nein	ja
588,32	2	1175,64		nein	ja
599,34	2	1197,68		nein	ja
649,40	2	1297,80		nein	ja
663,85	2	1326,70	HSA 519-529	nein	ja

In dem sofort nach Dialyse untersuchten HSA wurden fünf Signale detektiert, von denen zwei als HSA-Peptide identifiziert wurden. In der nach 20 Stunden gemessenen Probe befanden sich neben diesen fünf Signalen noch weitere zehn Signale, von denen vier als HSA-Peptide identifiziert werden konnten. Das heißt, dass sich bereits in frisch zubereiteter HSA-Lösung neben nativem HSA auch HSA-Fragmente befanden. Die Anzahl spontaner Degradationsprodukte nimmt nach 20 Stunden Inkubation weiter zu.

In einem weiteren Versuch sollte der mögliche Einfluss von HEPES-Pufferlösung, die für die nachfolgende Inkubation von HSA mit 20S Proteasom verwendet wird, auf die Stabilität von nativem HSA untersucht werden. Es sollte getestet werden, ob die Umgebungsbedingungen, die durch das HEPES-Puffersystem hergestellt werden, die Stabilität von nativem HSA beeinflussen. Dazu wurde in HSA in HEPES-Puffer (vgl. Tabelle 1, S. 14) für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden keine Degradationsprodukte detektiert (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2.2 Untersuchung zum Einfluss von Dithiothreitol und Hitze auf HSA

Zunächst wurde HSA mit aufsteigenden DTT-Konzentrationen unter Hitzeeinwirkung inkubiert mit dem Ziel, die Disulfidbrücken durch DTT zu öffnen und die Reaktion durch Hitze zu beschleunigen und zu verstärken. Die Auswirkungen dieser Denaturierung wurden im Anschluss mittels Massenspektrometrie untersucht.

**Aufsteigende DTT-Konzentrationen:** In Lösung gebrachtes HSA wurde erhitzt, zunächst auf 56°C, dann auf 90°C, in An- und Abwesenheit eines HEPES-Puffers (pH 7,8). Unter Zugabe aufsteigender DTT-Konzentrationen zeigten die Lösungen folgendes Verhalten (s. Tabelle 20).

**Tabelle 20: Makroskopische Strukturveränderungen von gelöstem HSA in Abhängigkeit von Temperatur, DTT-Konzentration und Pufferlösung**

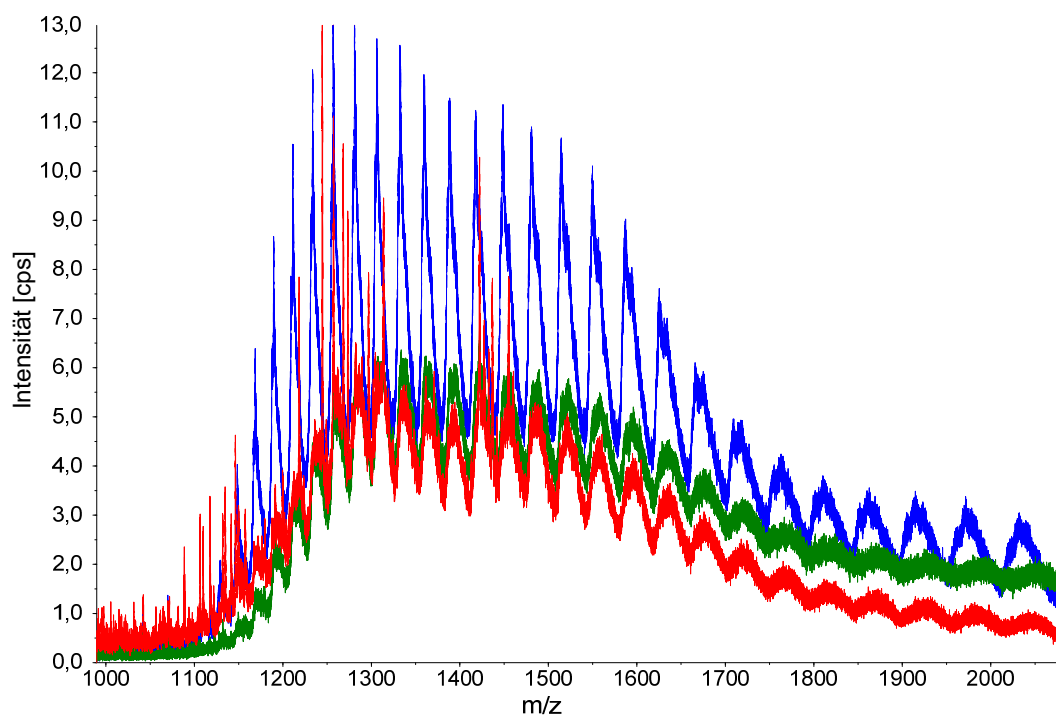
HSA nativ	DTT [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ HSA]	Hitzebehandlung	
		56°C	90°C
in HEPES-Puffer	0,03	flüssig	beginnende Gelbildung
in HEPES-Puffer	0,09	flüssig	Gelbildung
in HEPES-Puffer	0,18	Gelbildung	Gelbildung
in Reinstwasser	4,50	flüssig	nicht untersucht

Bereits die niedrigste verwendete DTT-Konzentration von 0,03  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein führte bei 90°C zu einer beginnenden Verfestigung des in HEPES-Puffer gelösten HSA zu einem Gel. Ab Konzentrationen von 0,18  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  war dieser Prozess bereits bei einer Inkubation bei 56°C zu beobachten. In Abwesenheit von HEPES-Puffer führten auch

bis zu 25-fach höhere DTT-Konzentrationen (4,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) bei 56°C nicht zu einer solchen Gelbildung.

**MS-Untersuchung von HSA unter Hitze- und DTT-Einwirkung:** Von nativem HSA, gelöst in HEPES-Puffer, wurde ein MS-Übersichtsspektrum aufgenommen. Eine zweite Probe HSA in HEPES-Puffer wurde für 30 min auf 56°C erhitzt und davon ebenfalls ein MS-Übersichtsspektrum aufgenommen. Eine dritte Probe wurde analog zur zweiten Probe behandelt, jedoch wurde vor der Hitzeeinwirkung 0,03  $\mu\text{mol}$  DTT/mg HSA zugegeben. Der Vergleich der drei Massenspektren (s. Abb. 31) liefert folgende Ergebnisse: Im Massenbereich  $m/z = 1000\text{-}2000$  zeigte sich ein deutliches Signal für natives HSA, und abgeschwächte Signale für hitzebehandeltes, sowie hitze- und DTT-behandeltes HSA.

Das Ergebnis legt nahe, dass unter den angewandten denaturierenden Bedingungen HSA teilweise degradiert wurde.



**Abb. 31: MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses der Vorbehandlung auf HSA**  
1. natives HSA (blau), 2. hitzebehandeltes HSA (grün), 3. hitze- und DTT-behandeltes HSA (rot).

Im Massenbereich  $m/z < 1000$  befanden sich unter den gewählten denaturierenden Bedingungen vermehrt Signale, bei denen es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte handelt (s. Tabelle 21):

**Tabelle 21: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale von HSA in Abhängigkeit von Temperatur und DTT-Konzentration**

HSA nativ	HSA +Hitze	HSA +Hitze +DTT
7 Signale	davon 5 Signale wieder gefunden	davon 5 Signale wieder gefunden
	+ 20 neue Signale	davon 17 Signale wieder gefunden
		+ 21 neue Signale
= 7 Signale	= 26 Signale	= 44 Signale

In nativem HSA wurden lediglich sieben Signale detektiert. Hitzebehandeltes HSA zeigte 26 Signale und hitze- plus DTT-behandeltes HSA ergab 44 Signale.

Das Ergebnis zeigt, dass HSA allein durch Hitze teilweise degradiert wurde und dass hitzebedingte Degradation unter DTT-Einfluss noch verstärkt wurde.

### 3.3.2.3 Untersuchung zum Einfluss von Wasserstoffperoxid auf HSA

HSA wurde (nach Denaturierung durch DTT) zusammen mit Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur oder unter Hitzeeinwirkung inkubiert. Ziel war es, die Proteinstruktur durch Öffnung von Disulfidbrücken zu denaturieren und durch nachfolgende Oxidation von Cystein eine Rückfaltung zu verhindern. Die Auswirkungen wurden mittels Massenspektrometrie untersucht.

**MS-Untersuchung von HSA unter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Raumtemperatur:** Mit DTT vorbehandeltes HSA (0,9 µmol DTT/mg HSA) wurde mit Wasserstoffperoxid (4 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg HSA) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde die Masse des HSA mittels MS-Dekonvolution bestimmt. Die Masse betrug nach der Oxidation  $M_{\text{ox}} = 66.560$  Da (Daten nicht gezeigt). Verglichen mit der Masse von nativem HSA ( $M_{\text{nativ}} = 66.457$ , vgl. Abschnitt 3.3.2.1) ergab sich durch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Vorbehandlung eine Massenzunahme von 103 Da. Dies entspricht (unter Berücksichtigung der Molekülmasse des Sauerstoffs von 16 Da) einer Anlagerung von etwa 6 Sauerstoffatomen an ein HSA-Molekül. Das oxidierte HSA wurde nach 0,5 Stunden, nach 19, sowie nach 42 Stunden im MS auf Degradationsprodukte hin untersucht, um dessen Stabilität über der Zeit zu beurteilen. Die Tabelle 22 (s. 62) zeigt die Ergebnisse. Nach einer halben Stunde wurden drei Fragmente detektiert, nach 19 Stunden betrug die Anzahl 17. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 42 Stunden führte nicht zu einer relevanten Erhöhung der Anzahl der Fragmente.

**Tabelle 22: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale von HSA nach Hitze-Denaturierung und Oxidation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Abhängigkeit der Inkubationszeit**

HSA +DTT +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
nach 30 Minuten	nach 19 Stunden	nach 42 Stunden
3 Signale	davon 3 Signale wieder gefunden	davon 3 Signale wieder gefunden
	+ 14 neue Signale	davon 14 Signale wieder gefunden
		+ 1 neues Signale
= 3 Signale, davon 3 als HSA- Peptide identifiziert	= 17 Signale, davon 13 als HSA- Peptide identifiziert	= 18 Signale, davon 13 als HSA- Peptide identifiziert

Das Ergebnis zeigt, dass denaturiertes und oxidiertes HSA instabil war und über der Zeit zunehmend in kleinere Fragmente zerfiel.

#### **MS-Untersuchung von HSA unter Einfluss von hochdosiertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Hitze:**

Mit DTT vorbehandeltes HSA wurde auch hier mit Wasserstoffperoxid inkubiert. Explizites Ziel war es an dieser Stelle, die denaturierenden Bedingungen im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen deutlich zu steigern. Dazu wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration auf 19 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg HSA (von vormals 4 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg HSA) gesteigert, die Inkubationstemperatur des Oxidationsschritts auf 60°C (von vormals Raumtemperatur) angehoben und die Inkubationszeit des Oxidationsmittels auf 26 Stunden (von vormals 1 Stunde) erhöht. Darüber hinaus wurde auch die DTT-Konzentration auf 4,5 µmol DTT/mg HSA (von vormals 0,9 µmol DTT/mg HSA) erhöht. Am Ende der Inkubationszeit zeigten sich 16 Signale mit hohen Intensitäten im MS-Übersichtsspektrum. Davon wurden neun Signale als HSA-Peptide identifiziert (s. Tabelle 23, 63).

Das native Molekül beginnt bei Aminosäure 25, da der Abschnitt 1-25 das Signalpeptid darstellt, das im nativen Protein nicht mehr enthalten ist und endet hinter Aminosäure 609. Unter Berücksichtigung dieses Umstands zeigen die Ergebnisse, dass v. a. Fragmente vom Anfang der Aminosäurekette (HSA 25-/26-37) und vom Ende (HSA 587-/588-/592-/593-609) entstanden sind. Zwei der detektierten Peptide waren jeweils dreifach oxidiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass DTT-denaturiertes HSA mit Wasserstoffperoxid unter den gegebenen Bedingungen sowohl bei Raumtemperatur, als auch unter Hitze einwirkung oxidiert werden konnte. Über die Zeit zeigte es sich instabil und wies nach 1-2 Tagen zahlreiche Degradationsprodukte auf.



**Tabelle 23: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Untersuchung von HSA nach Vorbehandlung unter stark denaturierenden Bedingungen**

Masse/Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	Sequenz
356,97	4	1424,88	HSA 26-37 (PMF)
506,97	3	1518,91	HSA 133-145
385,71	4	1539,84	HSA 25-37
513,95	3	1539,85	
392,72	4	1567,88	
545,31	3	1633,93	HSA 132-145
413,74	4	1651,96	
552,66	3	1655,98	HSA 593-609
601,69	3	1803,07	HSA 592-609
695,97	3	2085,91	HSA 320-338 +2 H <sub>2</sub> O-Anlagerungen
771,41	3	2312,23	HSA 588-609 +3 Oxidationen
809,76	3	2427,28	HSA 587-609 +3 Oxidationen
822,08	3	2464,24	
860,42	3	2579,26	
748,38	5	3737,90	
963,98	4	3852,92	

Denaturierende Bedingungen: Zugabe von 4,5 µmol DTT/mg HSA und nachfolgender Oxidation mit 19 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg HSA bei 60°C für 26 Stunden

### 3.3.3 Degradation von Albumin durch 20S Proteasom

#### 3.3.3.1 Untersuchungen zum Einfluss denaturierender Umgebungsbedingungen

In vier Vorversuchen wurde natives, bzw. auf unterschiedliche Arten denaturiertes HSA zusammen mit 20S Proteasom inkubiert, um den proteasomalen Verdau in Abhängigkeit der Proteinstruktur zu studieren.

**Versuchsaufbau:** Natives HSA sowie unterschiedlich vorbehandeltes HSA (DTT, Hitze, Wasserstoffperoxid) wurden jeweils zusammen mit 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten (Proteasompräparation „h-Ery“) in HEPES-Puffer für 17-24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zu jedem Versuch wurde ein Kontrollansatz hergestellt, der denselben Bedingungen unterworfen wurde, lediglich ohne Zugabe von Proteasom. Jeder Verdau wurde am Ende der Inkubationszeit massenspektrometrisch untersucht und mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Die MS-Spektren wurden im Hinblick auf „differenzielle Signale“ untersucht. Es handelte sich dabei um Signale, die im Verdau (im Vergleich mit der Kontrolle) neu auftreten (Gruppe 1) und um Signale, die in der Kontrolle vorhanden waren, aber im Verdau nicht mehr nachgewiesen werden

konnten (Gruppe 2). Signale aus beiden Gruppen sprechen dafür, dass das Proteasom ursächlich verantwortlich für die Entstehung der zugehörigen Peptide war. Im Einzelnen wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt:

- „**HSA nativ**“: HSA gelöst in Reinstwasser,  $\pm 20S$  Proteasom inkubiert in HEPES-Puffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 20 Stunden
- „**HSA+DTT+Hitze**“: HSA gelöst in Reinstwasser, +DTT ( $0,045 \mu\text{mol/mg}$  HSA), erhitzt auf  $56^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten, abgekühlt auf Eis,  $\pm 20S$  Proteasom inkubiert in HEPES-Puffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 17 Stunden
- „**HSA+DTT+Oxidation**“: HSA gelöst in Reinstwasser, +DTT ( $0,9 \mu\text{mol/mg}$  HSA),  $+\text{H}_2\text{O}_2$  ( $4 \mu\text{mol/mg}$  HSA) inkubiert bei Raumtemperatur für 1 Stunde,  $\pm 20S$  Proteasom inkubiert in HEPES-Puffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 19 Stunden
- „**HSA+DTT+Hitze+Oxidation**“: HSA gelöst in Reinstwasser, +DTT ( $4,5 \mu\text{mol/mg}$  HSA), erhitzt auf  $60^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten,  $+\text{H}_2\text{O}_2$  ( $19 \mu\text{mol/mg}$  HSA) inkubiert bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 44 Stunden, abgekühlt auf Raumtemperatur,  $\pm 20S$  Proteasom inkubiert in HEPES-Puffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden

Die Tabelle 24 fasst die Ergebnisse der Versuchsreihe zusammen.

**Tabelle 24: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale aus der Inkubation von unterschiedlich vorbehandeltem HSA mit 20S Proteasom (Verdau) und ohne 20S Proteasom (Kontrolle)**

	Anzahl der Signale				
	Kontrollen	Verdau	differenzielle Signale		
			Gruppe 1*	Gruppe 2**	insgesamt
HSA nativ	keine	keine	keine	keine	keine
HSA+DTT+Hitze	15	15	1	1	2
HSA+DTT+Oxidation	18	17	2	3	5
HSA+DTT+Hitze+Oxidation	33	42	11	2	13

\*/\*\* = Signale, die ausschließlich im Verdau / bzw. ausschließlich in der Kontrolle auftreten  
Inkubation jeweils in HEPES-Puffer bei  $37^{\circ}\text{C}$ ; Inkubationszeiten variierten zw. 17 und 24 Stunden

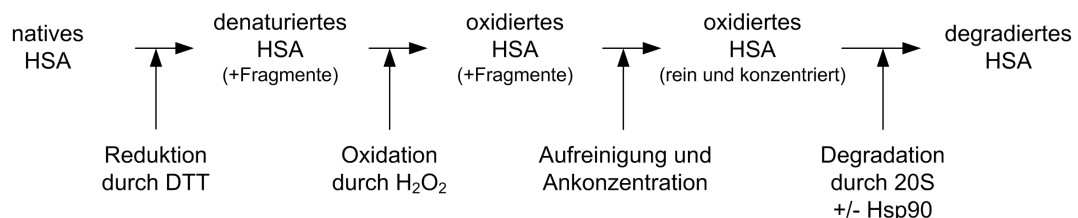
**Ergebnisse:** Natives HSA lieferte weder in der Kontrolle noch nach Verdau Signale und zeigte sich somit unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil, unabhängig davon, ob 20S Proteasom anwesend war oder nicht. Das vollständige Fehlen von Degradationsprodukten zeigt, dass natives HSA ohne Vorbehandlung nicht vom 20S Proteasom degradiert werden kann.

Bei denaturiertem und bei oxidiertem HSA dagegen waren im Verdauansatz mit 20S Proteasom zahlreiche Signale (15, 17 bzw. 42 Signale) vorhanden, wobei auch die zu-

gehörigen Kontrollen ohne Proteasom-Zugabe ebenfalls viele Signale (15, 18 bzw. 33 Signale) zeigten. Es ergaben sich 2, 5 bzw. 13 differenzielle Signale in den Verdaus mit vorbehandeltem HSA. Sowohl Hitzebehandlung als auch Oxidation von HSA (jeweils in Kombination mit DTT) ließen differenzielle Signale entstehen. Die Kombination von Hitzebehandlung, Oxidation und DTT ergab die höchste Anzahl an differenziellen Signalen.

### 3.3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Proteinoxidation und Hsp90

Im folgenden Versuch wurde denaturiertes und verschieden stark oxidiertes HSA zusammen mit 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten (Proteasompräparation „h-Ery“) inkubiert und zwar in An- und Abwesenheit von Hsp90. Ziel war es, den Einfluss unterschiedlich starker Oxidation und den Einfluss des Chaperons Hsp90 auf den proteasomalen Verdau zu untersuchen. Um die Qualität der Messdaten zu optimieren, kam in dieser Versuchsreihe ein ergänzendes methodisches Ziel hinzu, nämlich die Präsenz nicht-proteasomaler Degradationsprodukte (entstanden im Rahmen der Substratvorbehandlung) so weit wie möglich zu minimieren. Aus diesem Grund wurde diesmal vor Zugabe des Proteasoms eine Aufreinigung des Substrats vorgenommen. Der Versuch bestand aus folgenden Schritten (s. Abb. 32).

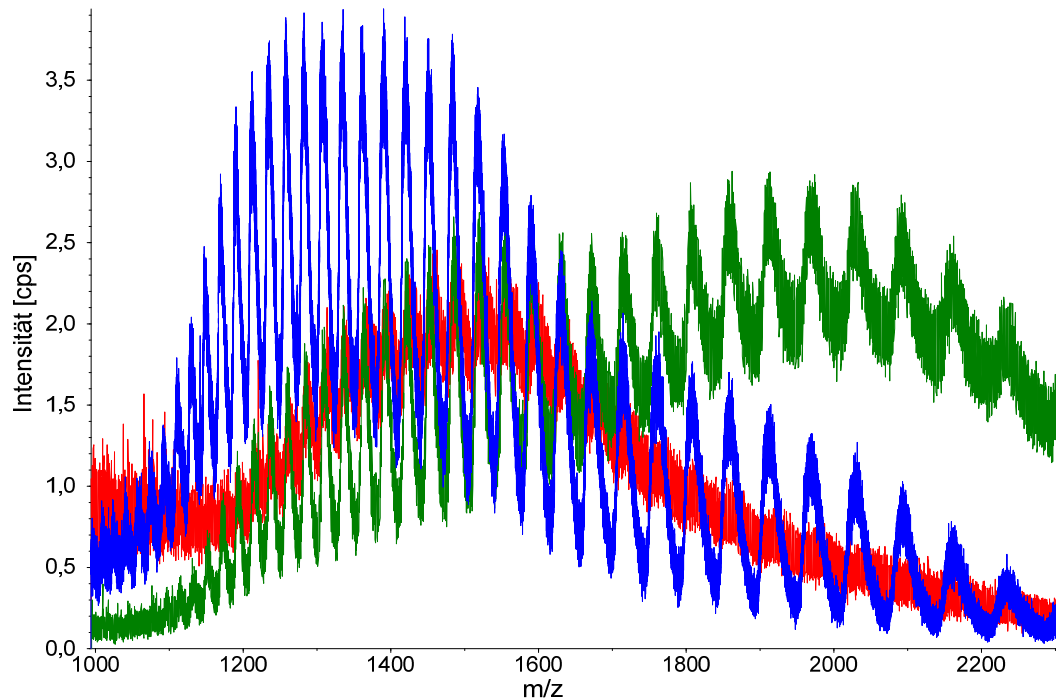


**Abb. 32: Arbeitsablauf zur Untersuchung des Einflusses von Proteinoxidation und Hsp90 auf den Verdau von HSA und 20S Proteasom**

**Denaturierung von HSA durch DTT und Hitze:** Von der HSA-Stammlösung (0,05 mM) wurden 500  $\mu$ l verwendet und mit 3,33  $\mu$ l DTT (0,15 M) versetzt. Das entspricht 0,3  $\mu$ mol DTT/mg HSA beziehungsweise einer DTT-Konzentration von 1 mM bezogen auf das Gesamtvolumen. Die Probe wurde für 30 min auf 56°C erhitzt und dann unmittelbar auf Eis gestellt, um Rückfaltungen zu verhindern.

**Oxidation von HSA durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Aus dem DTT- und hitzevorbehandelten HSA wurden 3 Versuchsansätze hergestellt, ein Ansatz ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe, die anderen beiden mit 10 bzw. 50  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg HSA. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Beigabe von 50  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg Protein wurde in Anlehnung an Whittier et al. [128] gewählt. Danach fand eine 18-stündige Inkubation bei 37°C statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit zeigte sich in dem stark oxi-

dierten Ansatz eine trübe Suspension, die bei den anderen beiden Ansätzen nicht erkennbar war. Von den drei Ansätzen wurden MS-Übersichtsspektren aufgezeichnet und überlagert (s. Abb. 33)



**Abb. 33: MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses unterschiedlich starker Oxidation auf HSA**

1. nicht-oxidiertes HSA (blau), 2. schwach oxidiertes HSA (10  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  / mg HSA, rot), 3. stark oxidiertes HSA (50  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  / mg HSA, grün); zunehmende Oxidation führt zu einer zunehmenden Massenverschiebung nach rechts, die die Anlagerung von Sauerstoffatomen repräsentiert.

In den Spektren ist mit steigendem Grad der Oxidation eine zunehmende Verschiebung der Kurven nach rechts sichtbar, die eine Massenzunahme durch Anlagerung von Sauerstoffmolekülen repräsentiert. Die Molekülmassen der drei Versuchsansätze mit Zugabe von 0/10/50  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ /mg HSA wurden mit Hilfe der MS-Dekonvolution bestimmt und verglichen (s. Tabelle 25).

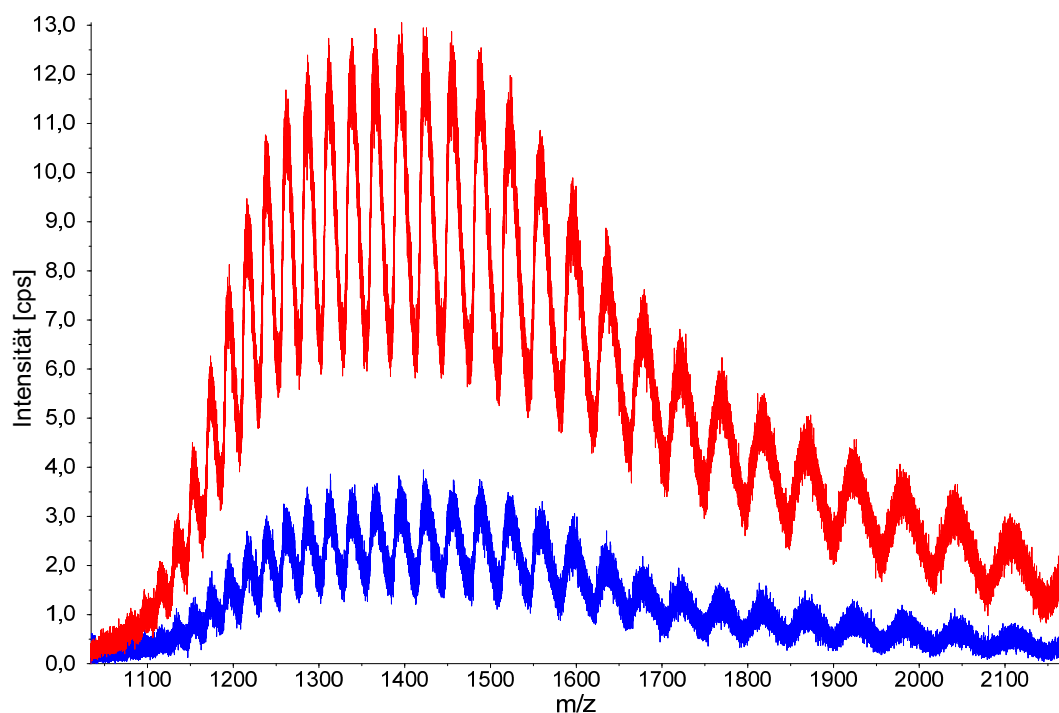
**Tabelle 25: Massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewichte von HSA in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$**

$\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosis [ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ /mg HSA]	Molekulargewicht [Da]	Massenzunahme [Da]	Sauerstoff-Anlagerung [Anzahl]
0	66.484	0	0
10	66.608	124	~ 8
50	66.820	336	21

Die Messwerte zeigen eine Anlagerung von etwa 8 Sauerstoffatomen an das HSA-Molekül bei einer Oxidation mit 10  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  / mg Protein. Eine Steigerung der Was-

serstoffperoxidzugabe auf 50  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  / mg Protein ließ den Oxidationszustand des HSA weiter ansteigen und es wurde eine Anlagerung von 21 Sauerstoffatomen beobachtet.

**Aufreinigung des oxidierten HSA durch Größenausschlusszentrifugation:** Die Aufreinigung erfolgte durch Größenausschlusszentrifugation mit einem Zentrifugenfilter des Typs „Amicon“ (Verfahren s. Abschnitt 2.2.1). Das zurückgewonnene Volumen betrug 20 bis 40  $\mu\text{l}$  und wurde auf ein Zielvolumen von 60  $\mu\text{l}$  in Reinstwasser verdünnt. Im Ansatz mit starker Oxidation zeigte sich im Gegensatz zu den beiden anderen Ansätzen ein weißlicher Niederschlag. Für weitere Kalkulationen wurde die Annahme gemacht, dass durch nicht-proteasomale Degradation und durch Verluste im Filter 40 % des zu Beginn eingesetzten HSA verloren gegangen sind. Auf dem Boden dieser Annahmen wurde die Konzentration des HSA durch den Aufreinigungsschritt um Faktor fünf gesteigert (von 0,05 mM auf 0,25 mM). Die Abb. 34 zeigt die Signale von HSA im MS-Spektrum vor und nach der Probenaufreinigung.



**Abb. 34: MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses der Aufreinigung von oxidiertem HSA durch Größenausschlusszentrifugation**

1. stark oxidiertes HSA vor der Aufreinigung (blau); 2. stark oxidiertes HSA nach der Aufreinigung mittels Größenausschlusszentrifugation (rot). HSA liegt nach der Aufreinigung in höherer Konzentration vor, was anhand der etwa dreifach höheren Signalintensität zu erkennen ist.

Die Signalintensität nach der Aufreinigung war etwa dreimal so hoch wie vorher. Das Ergebnis belegt, dass HSA nach dem Aufreinigungsschritt in erhöhter Konzentration

vorlag. Im unteren Massenbereich des MS-Spektrums zeigten sich nach der Aufreinigung nahezu keine mehrfachgeladenen Signale (Kontrolle 1.1, nicht-oxidiertes HSA: 4 Signale mit sehr geringer Intensität  $\text{cps} \leq 4$ ; Kontrollen 1.2 und 1.3, oxidiertes HSA: insgesamt 2 Signale mit sehr geringer Intensität  $\text{cps} \leq 4$ ; gemessen jeweils vor Beginn der 18-stündigen Inkubation; Daten nicht gezeigt). Ebenfalls war das Rauschen durch einfachgeladene Lösungsmittel und Verunreinigungen deutlich geringer (Daten nicht gezeigt).

### Degradation von HSA durch 20S-Proteasom in An- und Abwesenheit von Hsp90:

Die drei HSA-Fractionen wurden jeweils mit 20S Proteasom inkubiert und zwar in An- und Abwesenheit von Hsp90. Zu jedem Ansatz wurde eine Kontrolle hergestellt mit identischer Behandlung, jedoch ohne Proteasom-Zugabe. Der Verdau erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  für 18 Stunden. Als Verdau-puffer wurde in Anlehnung an Matthews et al. [143] diesmal ein TRIS-Puffer gewählt, der Tris-HCl, Magnesium-Ionen und DTT enthält (s. Tabelle 3, S. 14). Um den Einfluss von Hsp90 auf den Verdau zu untersuchen, wurde einem Teil der Versuchsansätze Hsp90 beigemischt. Die Konzentration wurde in Anlehnung an Whittier et al. [128] mit  $0,56 \mu\text{g HSP}/\mu\text{g Proteasom}$  angesetzt. Die Tabelle 26 zeigt eine Übersicht über die neun Versuchsansätze:

**Tabelle 26: Versuchsansätze zum Verdau von HSA durch 20S Proteasom**

	nicht-oxidiertes HSA			schwach oxidiertes HSA			stark oxidiertes HSA		
Oxidation	keine			10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ / mg HSA			50 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ / mg HSA		
Ansatz-Nr.	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
	Kontrolle	Verdau	Verdau +Hsp90	Kontrolle	Verdau	Verdau +Hsp90	Kontrolle	Verdau	Verdau +Hsp90
HSA [16,67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	je 20 $\mu\text{l}$ (333 $\mu\text{g}$ )			je 20 $\mu\text{l}$ (333 $\mu\text{g}$ )			je 20 $\mu\text{l}$ (333 $\mu\text{g}$ )		
20S [0,625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	0	je 16 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{g}$ )		0	je 16 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{g}$ )		0	je 16 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{g}$ )	
Hsp90 [0,59 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	0	0	9,5 $\mu\text{l}$ (5,6 $\mu\text{g}$ )	0	0	9,5 $\mu\text{l}$ (5,6 $\mu\text{g}$ )	0	0	9,5 $\mu\text{l}$ (5,6 $\mu\text{g}$ )
H <sub>2</sub> O	25,5 $\mu\text{l}$	9,5 $\mu\text{l}$	0	25,5 $\mu\text{l}$	9,5 $\mu\text{l}$	0	25,5 $\mu\text{l}$	9,5 $\mu\text{l}$	0
Puffer	je 54,5 $\mu\text{l}$			je 54,5 $\mu\text{l}$			je 54,5 $\mu\text{l}$		
Gesamt- Volumen	je 100 $\mu\text{l}$			je 100 $\mu\text{l}$			je 100 $\mu\text{l}$		

Nach Ablauf der 18-stündigen Inkubationszeit zeigten sich in allen neun Proben weiße Konglomerate innerhalb ansonsten klarer Flüssigkeit. Die Proben wurden durch Zentrifugation (500 x g, 5 min, Raumtemperatur) in ein Pellet und einen Überstand aufgetrennt. Jeweils 10 µl wurden vom Überstand entnommen und mittels miniaturisierter *Reversed-Phase-Chromatographie* (Verfahren s. Abschnitt 2.7.1) entsalzt. Bemerkenswert war, dass die oxidierten Proben (Ansätze 2.2, 2.3, 3.2 und 3.3) bei der Entsalzung nur unter hohen Kolbendruckkräften durch die Chromatographiesäule gepresst werden konnten. Nach der Probenentsalzung erfolgte die massenspektrometrische Untersuchung. Die Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der neun Versuchsansätze. Insgesamt wurden 12 Signale als Peptide des HSA identifiziert, was einer Sequenzabdeckung von etwa 14 % entspricht.

**Tabelle 27: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von HSA in An- und Abwesenheit von 20S Proteasom in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung und der An- bzw. Abwesenheit von Hsp90 nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C (Ansätze 1.1-3.3)**

Masse/ Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	HSA- Sequenz	Kontrollen			Verdau			Verdau+Hsp90		
				1.1	2.1	3.1	1.2	2.2	3.2	1.3	2.3	3.3
336,25	2	671,50		0	0	0	0	0	0	0	20	0
355,25	2	709,50		0	0	0	0	0	0	0	0	15
370,25	2	739,50		0	0	0	0	0	0	0	10	9
397,25	2	793,50	92-98	0	0	0	35	33	37	0	0	0
403,70	2	806,40		10	0	0	0	0	0	10	17	0
423,25	2	845,50		0	0	0	20	20	25	0	0	0
431,27	2	861,54		0	0	0	0	35	65	0	0	0
433,25	2	865,50		0	0	0	0	0	40	0	0	0
446,28	2	891,56	294-301	0	0	0	0	28	45	0	0	0
461,25	2	921,50		12	0	0	0	0	0	0	0	0
465,78	2	930,56	91-98	0	0	0	0	25	45	0	0	0
473,29	2	945,58		0	0	0	30	30	40	0	0	0
477,28	2	953,56	62-69	0	0	0	40	80	180	0	0	0
501,74	2	1002,48	510-518 <sup>+Na</sup>	0	0	0	0	40	60	15	27	0
510,78	2	1020,56		25	0	0	0	0	0	0	0	0
515,27	2	1029,54	574-582	0	0	0	80	75	95	55	76	38
519,31	2	1037,62	132-140	0	0	0	60	95	190	20	40	35
539,30	2	1077,60		0	0	0	0	0	0	0	35	25
555,32	2	1109,64		0	0	0	0	30	45	0	0	0
599,33	2	1197,66		0	0	0	20	30	50	15	22	22
615,86	2	1230,72		17	0	0	0	0	0	0	0	0
420,27	3	1258,81		0	0	0	0	30	45	0	14	14
632,35	2	1263,70		0	0	0	0	0	0	14	0	3
428,26	3	1282,78		0	0	0	0	17	30	0	0	0
643,33	2	1285,66		0	0	0	30	0	0	20	0	0

Tabelle 27 (Fortsetzung)

Masse/ Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	HSA- Sequenz	Kontrollen			Verdau			Verdau+Hsp90		
				1.1	2.1	3.1	1.2	2.2	3.2	1.3	2.3	3.3
678,83	2	1356,66		0	0	0	30	0	0	10	0	4
686,39	2	1371,78		0	0	0	0	20	40	0	0	0
696,38	2	1391,76		0	0	0	0	0	40	0	22	18
494,29	3	1480,87		18	0	0	0	0	30	0	0	0
496,28	3	1486,84		0	0	0	0	0	0	15	0	1
500,29	3	1498,87		0	0	0	0	0	0	0	20	20
518,30	3	1552,90		0	0	0	0	60	100	0	35	20
781,39	2	1561,78		0	0	0	15	22	22	0	10	0
521,27	3	1561,81		0	0	0	40	60	80	0	28	10
522,29	3	1564,87		18	0	0	0	0	0	0	0	0
787,91	2	1574,82	519-531	0	0	0	20	25	40	14	26	21
530,31	3	1588,93		0	0	0	0	0	0	0	20	20
796,45	2	1591,90		0	6	0	0	0	0	0	0	0
540,26	3	1618,78		15	0	0	0	0	0	0	0	0
545,32	3	1633,96	132-145	0	0	0	60	65	120	0	0	0
552,31	3	1654,93		0	0	0	0	0	0	15	0	0
828,48	2	1655,96	593-609	4	0	0	0	0	0	4	0	8
552,67	3	1656,01	593-609	23	10	5	0	0	0	0	0	0
567,30	3	1699,90		0	0	0	0	0	0	0	35	28
852,44	2	1703,88		0	0	0	0	0	20	0	0	0
427,31	4	1706,24		0	0	0	0	0	0	20	20	10
590,69	3	1770,07		0	0	0	0	35	70	0	0	0
448,80	4	1792,20		0	0	0	0	15	20	0	0	0
601,69	3	1803,07	592-609	6	0	0	0	0	0	0	0	0
911,67	2	1822,34		0	0	0	4	10	10	0	6	12
626,34	3	1877,02		0	0	0	20	22	40	13	0	2
636,34	3	1907,02		0	0	0	0	0	0	0	18	20
637,36	3	1910,08		0	0	0	0	45	75	0	35	22
959,48	2	1917,96		0	0	0	0	0	0	0	5	13
661,36	3	1982,08		0	0	0	0	20	30	0	0	0
674,36	3	2021,08		0	0	0	0	0	0	0	15	11
698,73	3	2094,19		0	0	0	0	20	30	0	0	0
703,07	3	2107,21		0	0	0	0	0	0	11	0	5
755,42	3	2264,26		0	0	0	12	28	25	0	15	0
789,07	3	2365,21		6	0	0	0	0	0	0	0	0
475,59	5	2373,95		0	0	0	0	0	0	0	0	10
614,32	4	2454,28		0	0	0	0	0	0	0	30	18
849,10	3	2545,30		0	0	0	0	0	0	0	5	11
427,60	6	2560,60		0	0	0	10	15	22	0	0	0
689,15	4	2753,60		0	0	0	0	28	55	0	0	12
708,36	4	2830,44		7	0	0	0	0	0	0	0	0
738,37	4	2950,48		0	0	0	0	0	0	7	0	6



Tabelle 27 (Fortsetzung)

Masse/ Ladung [m/z]	Ladung [z]	Masse [M+H]	HSA- Sequenz	Kontrollen			Verdau			Verdau+Hsp90		
				1.1	2.1	3.1	1.2	2.2	3.2	1.3	2.3	3.3
757,38	4	3026,52		3	5	0	0	0	0	0	0	0
770,43	4	3078,72		0	0	0	0	0	0	0	0	8
792,41	4	3166,64		0	0	0	10	17	17	6	8	7
814,43	4	3254,72		6	6	0	0	0	0	6	0	7
674,12	5	3366,60		0	10	0	0	0	0	0	0	0
869,45	4	3474,80		2	0	0	0	0	0	0	0	0
884,45	4	3534,80		0	0	0	0	0	10	0	0	0
945,48	4	3814,92		1	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Anzahl der in den jeweiligen Verdau detektierten Signale und die (nach Abgleich mit den Kontrollen) resultierende Anzahl differenzieller Signale ist in Tabelle 28 dargestellt:

**Tabelle 28: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale aus der Inkubation von HSA in An- und Abwesenheit von 20S Proteasom in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung und der An- bzw. Abwesenheit von Hsp90 nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C**

	Anzahl der Signale				
	Kontrollen	Verdau	differenzielle Signale		
			Gruppe 1*	Gruppe 2**	insgesamt
HSA denaturiert					
Ansatz (1.2) Verdau	16	18	18	16	34
Ansatz (1.3) Verdau +Hsp90	16	18	15	13	28
HSA schwach oxidiert					
Ansatz (2.2) Verdau	5	31	30	4	34
Ansatz (2.3) Verdau +Hsp90	5	27	27	5	32
HSA stark oxidiert					
Ansatz (3.2) Verdau	1	36	36	1	37
Ansatz (3.3) Verdau +Hsp90	1	34	34	1	35

\*/\*\* = Signale, die ausschließlich im Verdau / bzw. ausschließlich in der Kontrolle auftreten

**Ergebnisse aus den Kontrollen:** Die drei Kontrollen ohne Zugabe von Proteasom (Ansätze 1.1, 2.1 und 3.1) zeigten auch nach 18-stündiger Inkubation deutlich abgrenzbare Signale von unverdaulichem HSA in der Massenspektrometrie (Spektren nicht gezeigt). Im Vergleich zum Zeitpunkt vor Beginn der Inkubation zeigten sich im unteren Massenbereich mehr Signale. Beim denaturierten nicht-oxidierten HSA (Kontrolle 1.1) waren es vor der Inkubation 4 Signale ( $\leq 4$  cps) und nach der Inkubation 16 Signale ( $\leq 25$  cps). Beim oxidierten HSA (Kontrollen 1.2 und 1.3) waren es vor der Inkubation 2 Signale

( $\leq 4$  cps) und danach 5 Signale ( $\leq 6$  cps). Das Auftreten neuer Signale betraf also vorrangig den nicht-oxidierten Kontrollansatz und weniger die oxidierten Kontrollansätze. Von den genannten Signalen konnten 2 Signale identifiziert und dem HSA zugeordnet werden (HSA 593-609, HSA 592-609).

**Ergebnisse aus dem Verdau von denaturiertem HSA:** Im Ansatz mit DTT- und hitzevorbehandeltem HSA mit 20S Proteasom (Ansatz 1.2) traten im Vergleich mit der zugehörigen Kontrolle (Kontrolle 1.1) 18 Signale neu auf (d. h. 18 differenzielle Signale der Gruppe 1) mit Signalintensitäten bis zu 80 cps, von denen 6 Signale als Peptide aus dem HSA-Molekül identifiziert werden konnten. Keines der 16 Signale aus der Kontrolle trat im Verdau erneut auf, dementsprechend ergeben sich 16 differenzielle Signale der Gruppe 2. Daraus resultierten insgesamt  $18 + 16 = 34$  differenzielle Signale (s. Tabelle 27 und Tabelle 28).

Das Ergebnis zeigt, dass bei Inkubation von 20S Proteasom mit denaturiertem HSA proteasomale Verdauprodukte generiert wurden, von denen 6 Peptide eindeutig aus dem HSA-Molekül stammen.

**Ergebnisse aus dem Verdau von oxidiertem HSA:** Im Ansatz mit denaturiertem und gleichzeitig schwach bzw. stark oxidiertem HSA mit 20S Proteasom (Ansätze 2.2 und 3.2) wurden im Vergleich zu den Kontrollen 34 bzw. 37 differenzielle Signale mit hohen Signalintensitäten (bis zu 190 cps) im MS-Übersichtsspektrum detektiert, von denen 9 Signale identifiziert und dem HSA-Molekül zugeordnet werden konnten (s. Tabelle 27 und Tabelle 28). Im Vergleich zu der Kontrolle beim Verdau von nicht-oxidiertem HSA waren in den hier relevanten Kontrollen (Kontrollen 2.1 und 3.1) nur ganz wenige und intensitätsschwache Signale aufgetreten (5 Signale,  $\leq 6$  cps). In den Ansätzen 2.2 und 3.2 waren somit 30 von 34 bzw. 36 von 37 differenziellen Signalen neu aufgetretene Signale (d. h. differenzielle Signale der Gruppe 1). Differenzielle Signale der Gruppe 2 wurden somit nur 4 bzw. eines beobachtet. Von den 36 bei stark oxidiertem HSA (Ansatz 3.2) detektierten differenziellen Signalen der Gruppe 1 waren bereits 16 Signale aus dem Verdau von nicht-oxidiertem HSA (Ansatz 1.2) bekannt, d. h. die übrigen 20 Signale waren charakteristisch für den Verdau von oxidiertem HSA. Signale, die in den Ansätzen mit schwach oxidiertem und mit stark oxidiertem HSA (Ansätze 2.2 und 3.2) nachgewiesen wurden, zeigten stets höhere Signalintensitäten im Fall von stark oxidiertem HSA.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Inkubation von 20S Proteasom mit denaturiertem HSA proteasomale Verdauprodukte mit sehr hohen Signalintensitäten generiert wurden, von

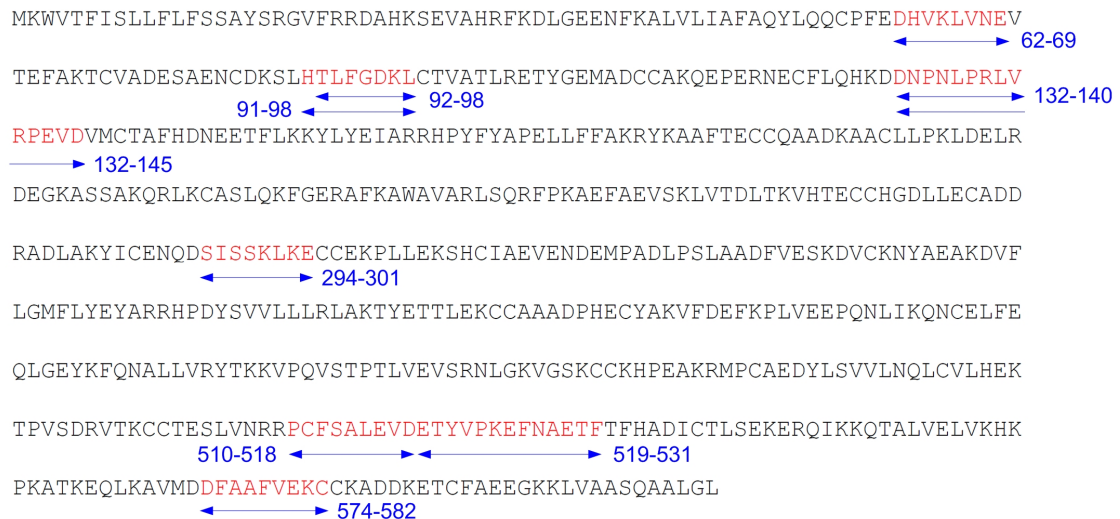
denen 9 Peptide eindeutig aus dem HSA-Molekül stammen. Es wurden etwa doppelt so viele neu aufgetretene Signale (differenzielle Signale der Gruppe 1) gezählt, als beim Verdau von nicht-oxidiertem HSA. Die Anzahl differenzieller Signale der Gruppe 2 dagegen war wesentlich geringer.

**Ergebnisse aus dem Verdau in Anwesenheit von Hsp90:** Im Verdau von denaturiertem HSA mit 20S Proteasom und Hsp90 (Ansatz 1.3) wurden 28 differenzielle Signale detektiert (15 neu aufgetretene Signale der Gruppe 1 und 13 Signale der Gruppe 2). Verglichen mit dem analog durchgeführten Verdau ohne Hsp90 (Ansatz 1.2) waren dies zwar insgesamt etwas weniger differenzielle Signale, allerdings war die Aufteilung auf die Gruppen 1 und 2 gleich gewichtet wie bei den Versuchen ohne Hsp90. Im Verdau von schwach bzw. stark oxidiertem HSA mit 20S Proteasom und Hsp90 (Ansätze 2.3 und 3.3) waren 27 von 32 bzw. 34 von 35 differenziellen Signalen neu aufgetretene Signale (also differenzielle Signale der Gruppe 1). Differenzielle Signale der Gruppe 2 wurden somit nur 5 bzw. eines beobachtet. Verglichen mit den analog durchgeführten Versuchen ohne Hsp90 (Ansätze 2.2 und 3.2) waren dies fast genauso viele differenzielle Signale, deren Aufteilung auf die Gruppen 1 und 2 etwa gleich gewichtet war wie bei den Versuchen ohne Hsp90. Die Signalintensitäten der beobachteten Peptide waren in der Regel im Ansatz mit schwach oxidiertem HSA höher als in dem mit stark oxidiertem HSA.

Unter den insgesamt 41 verschiedenen Signalen aus den Verdauversuchen von HSA mit Hsp90 waren 24 charakteristische Signale, das heißt Signale, die im Verdau ohne Hsp90 nicht aufgetreten waren. Damit wurden etwa 60 % der hier dokumentierten Signale ausschließlich im Zusammenhang mit Hsp90 generiert. Außerdem wurde etwa die Hälfte der Signale aus den Versuchen ohne Hsp90 (Ansätze 1.2, 2.2, 3.2) in den Versuchen mit Hsp90 nicht nachgewiesen. Insgesamt konnten von den 41 Signalen 8 Signale als HSA-Peptide identifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Inkubation von 20S Proteasom mit denaturiertem bzw. oxidiertem HSA in Anwesenheit von Hsp90 proteasomale Verdauprodukte generiert wurden, von denen 8 Peptide eindeutig aus dem HSA-Molekül stammen. In der Summe waren es geringfügig weniger Verdauprodukte als bei Versuchen ohne Hsp90. Auch in Anwesenheit von Hsp90 besteht eine Präferenz des Proteasoms für oxidiertes HSA, hier speziell für schwach oxidiertes HSA. Allerdings handelt es sich im Überwiegenden (60 %) um andere Signale, als beim vergleichbaren Verdau ohne Hsp90.

**Schnittverhalten des Proteasoms beim Verdau von oxidiertem HSA:** Die Abb. 35 zeigt die neun Peptide aus dem Verdau von denaturiertem und stark oxidiertem HSA (Ansatz 3.2), die eindeutig dem HSA zugeordnet wurden in der Primärsequenz des HSA hervorgehoben. Es wurde eine Sequenzabdeckung von etwa 11 % erreicht.



**Abb. 35: Schnittkarte von HSA nach dem Verdau durch 20S Proteasom**

Rot hervorgehoben und durch blaue Pfeile markiert sind die massenspektrometrisch identifizierten Peptide aus dem Verdau von stark oxidiertem HSA (Vorbehandlung mit 50 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / mg HSA und nachfolgende Aufreinigung durch Größenausschlusszentrifugation) inkubiert mit 20S Proteasom für 18 Stunden bei 37°C in TRIS-Puffer.

In der Schnittkarte ist ferner zu sehen, um welche Schnittstellen es sich handelt. Die Tabelle 29 listet die Peptide mit den zugehörigen Schnittstellen auf.

**Tabelle 29: Massenspektrometrisch identifizierte Peptide und Schnittstellen aus dem Verdau von oxidiertem HSA durch 20S Proteasom**

Position	Peptidlänge	Peptidsequenz	Schnittstellen
62-69	8	E. DHVKL VNE .V	caspaseartig / caspaseartig
91-98	8	L. HTLFGDKL .C	chymotrypsinartig / chymotrypsinartig
92-98	7	H. TLFGDKL .C	trypsinartig / chymotrypsinartig
132-140	9	D. DNP NL PRLV .R	caspaseartig / chymotrypsinartig
132-145	14	D. DNP NL PRLV RPEVD .V	caspaseartig / caspaseartig
294-301	8	D. SISKLKE .C	caspaseartig / caspaseartig
510-518	9	R. PCFSALEVD .E	trypsinartig / caspaseartig
519-531	13	D. ETYVPKEFNAETF .T	caspaseartig / chymotrypsinartig
574-582	9	D. DFAAFVEKC .C	caspaseartig / atypisch

Proteasomale Schnitte sind mit Punkten gekennzeichnet

Das 20S Proteasom schnitt fast ausnahmslos an Schnittstellen, die sich anhand der drei klassischen Aktivitäten theoretisch vorhersagen lassen: In über der Hälfte der Fälle (55 %) entsprach die Schnittstelle der caspaseartigen Aktivität. Am zweithäufigsten trat

---

in 28 % der Fälle die chymotrypsinartige Aktivität in Erscheinung. In 11 % der Fälle wurde trypsinartig geschnitten. Der einmal vorkommende Schnitt hinter Cystein wurde als atypisch gewertet. Die meisten Peptide hatten eine Länge von 7 bis 9 Aminosäuren. Zwei Peptide waren 13 bzw. 14 Aminosäuren lang.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Testsystem zur Proteom-Analyse von BALF-Proben

In den in Abschnitt 3.1 dargestellten Versuchen wurde ein Testsystem zur Analyse einer BALF-Probe angewandt, das auf folgenden Methoden basiert: Proteinbestimmung nach Lowry, 1D-Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung, In-Gel-Verdau mit Trypsin als Protease sowie Massenspektrometrie mit PMF- und MS/MS-Verfahren.

**Proteinbestimmung, -auftrennung und -isolierung:** Mit Hilfe der Lowry-Proteinbestimmung konnte der Gesamtproteingehalt quantifiziert werden. In der nachfolgenden Gelelektrophorese wurden die verschiedenen Proteine aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die verwendete 12 % PAA-Gelmatrix bot eine vorteilhaft weite Auftrennung im unteren Massenbereich (30 bis 50 kDa), jedoch im Vergleich dazu eine geringe Auftrennung im Bereich 50 bis 250 kDa. Peptide mit Molekulargewichten  $<15$  kDa konnten in der Gelelektrophorese nicht differenziert werden. Die nachfolgend durchgeführte Massenspektrometrie ermöglichte es jedoch, unterschiedliche Proteine innerhalb derselben Bande klar zu differenzieren. Außerdem besteht das Risiko durch bestimmte Reaktionsschritte im Rahmen der Elektrophorese und des In-Gel-Verdaus artefizielle Aminosäureoxidationen zu generieren [144–146] (näheres s. Abschnitt 4.2.2).

**Limitationen der Massenspektrometrie:** Das PMF-Verfahren zeigte sich, insbesondere bei höhermolekularen Proteinen (wie beispielsweise HSA), in der Regel nicht als ausreichend sicheres Identifikationsverfahren, da auch bei sehr genauer Massenbestimmung eines Peptids meistens mehrere (nahezu) massengleiche Sequenzen innerhalb desselben Proteins in Frage kamen. Befand sich mehr als ein Protein innerhalb derselben Gelbande, wurde die MS-Analyse zusätzlich erschwert. Auch Proteinmodifikationen behinderten die direkte Identifikation entsprechender Peptide, wodurch diese möglicherweise seltener entdeckt wurden als nicht-modifizierte Peptide. Daher war in der Regel die Sequenzinformation aus dem MS/MS-Verfahren zur Identifikation eines Peptids erforderlich. Ebenfalls konnte nur durch das MS/MS-Verfahren eine valide Aussage zu Modifikationen (wie z. B. Oxidationen von Aminosäuren) getroffen werden. Die

Unterstützung durch die datenbankgestützte Auswertesoftware Mascot erwies sich für einen Teil der Fragestellungen als hilfreich. Hierbei ist zu beachten, dass unbekannte Proteine nur dann identifiziert werden können, wenn sie in der Datenbank enthalten sind.

#### 4.1.2 Testsystem zur Untersuchung der proteasomalen Aktivität

In den in Abschnitt 3.2 dargestellten Versuchen wurde ein Testsystem zur Quantifizierung der Enzymaktivität von 20S Proteasom aufgebaut und angewandt. Das Verfahren basiert auf einem Enzymassay mit optischem Nachweis der Enzymreaktion anhand fluorogener Peptide und ermöglicht es, enzymatische Aktivitäten von Proteasom aus verschiedenen Quellen quantitativ miteinander zu vergleichen. Anhand der drei verwendeten Testpeptide können die drei klassischen Enzymaktivitäten des Proteasoms untersucht werden.

**Limitationen bei der Verwendung fluorogener Peptide:** Durch fluorogene Peptide wird für die jeweilige Aktivität nur jeweils eine bestimmte Schnittstelle untersucht. Beim proteasomalen Verdau größerer Proteine *in vivo* existieren sowohl für die trypsin-, die chymotrypsin- und die caspaseähnliche Aktivität jeweils bis zu zehn potentielle Schnittstellen hinter unterschiedlichen Aminosäuren, von denen beim *in vitro* Assay jeweils nur eine einzige durch das entsprechende Testpeptid untersucht wird. Da die Testpeptide so kurz sind, bleibt außerdem unklar, ob das Proteasom im Fall längerer und komplexerer Peptidketten dieselbe Enzymaktivität aufweist. Denn die Spezifität einer potentiellen Schnittstelle ergibt sich nicht allein aus der reinen Aminosäureabfolge, sondern wird auch durch die benachbarten Aminosäuren mit determiniert (sekundäre Spezifität, vgl. [75]). Eine Interaktion der enzymatischen Untereinheiten des Proteasoms untereinander ist ebenfalls beschrieben und kann in dem gewählten einfachen Aufbau nicht untersucht werden. Atypische Aktivitäten des Proteasoms, wie beispielsweise eine beschriebene Präferenz für verzweigt-kettige oder kleine neutrale Aminosäuren [147] sind im gewählten Modell ebenfalls nicht untersuchbar.

**Limitationen beim Verdau fluorogener Peptide in bronchoalveolärer Lavage:** Das angewandte Testsystem mit fluorogenen Peptiden war in der Lage, die drei untersuchten Enzymaktivitäten zu quantifizieren. Eine Aussage darüber, welche Enzyme innerhalb der untersuchten BALF für den enzymatischen Umsatz verantwortlich waren, ist dadurch jedoch nicht möglich. Da die Möglichkeit besteht, dass in der untersuchten BALF auch nicht-proteasomale Enzyme enthalten sind, sollten bei zukünftigen Studien auch Kontrollen mit Proteasominhibitoren durchgeführt werden (s. dazu auch Abschnitt

4.3.2), um proteasomale Degradation mit höherer Sicherheit von nicht-proteasomaler Degradation zu differenzieren.

#### 4.1.3 Testsystem zur Untersuchung des proteasomalen Verdauverhaltens

Mit Hilfe dieses Verfahrens sollte die Frage geklärt werden können, ob große Proteine mit komplexer 3D-Struktur potentielle Substrate für das 20S Proteasom darstellen. Außerdem sollten *in vitro* Inkubationsbedingungen und Vorbehandlungen ausgetestet werden können, die notwendig sind, um ein komplexes Protein dahingehend zu verändern, dass es ein geeignetes Substrat für das 20S Proteasom darstellt. Das Verfahren sollte weiterhin detaillierte Beobachtungen des proteasomalen Schnittverhaltens ermöglichen. In Abschnitt 3.3 wurde die Entwicklung und Anwendung eines solchen Testsystems beschrieben. Es wurde verwendet, um zu analysieren, ob und unter welchen Bedingungen das im Alveolarraum in hoher Konzentration auftretende Protein HSA ein potentielles Substrat für das alveoläre Proteasom darstellt. Das Verfahren bestand aus einem *in vitro* Verdau mit 20S Proteasom als Enzym und unterschiedlich vorbehandeltem HSA als Substrat, an das sich die massenspektrometrische Analyse der Verdauprodukte anschloss.

**Limitationen bei der Interpretation massenspektrometrischer Daten:** Die Massenspektrometrie zeigte sich für die genannte Fragestellung hervorragend geeignet, da sie es ermöglichte, durch Sequenzaufklärung der proteasomalen Degradationsprodukte das Schnittverhalten des Proteasoms „aminosäuregenau“ zu analysieren.

Bei der Interpretation massenspektrometrischer Daten aus dem Versuch zur Oxidation von HSA ist Folgendes zu vermerken: Der Oxidationsstatus von HSA konnte durch Messung der Massenverschiebung bestimmt werden. Die expliziten Bindungsstellen der Sauerstoffatome, die bei der Oxidation an das HSA angelagert werden, waren allerdings im Fall dieses großen Proteins nicht exakt bestimmbar. Bei kleineren oxidierten Peptiden dagegen konnten Aminosäureoxidationen im MS/MS-Verfahren exakt nachgewiesen und lokalisiert werden.

Bei der Interpretation der massenspektrometrischen Daten aus Verdauversuchen mit 20S Proteasom ist folgendes zu berücksichtigen: Signale, die nur in Verdauansätzen (d. h. in Anwesenheit von Proteasom) auftreten, repräsentieren Peptide, die höchstwahrscheinlich proteasomale Degradationsprodukte darstellen. Wenn im zugehörigen Kontrollansatz Signale (d. h. Peptide) detektiert werden, dann handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Fragmente des Substratproteins, also um Produkte spontaner



nicht-proteasomaler Degradation. Bisweilen werden bestimmte Peptide sowohl in Verdauansätzen als auch in den zugehörigen Kontrollen nachgewiesen. Zur Differenzierung von proteasomaler und nicht-proteasomaler Degradation ist es ungünstig, wenn bereits im Kontrollansatz viele Peptidfragmente vorhanden sind. Denn diese nicht-proteasomalen Degradationsprodukte stellen aus zwei Gründen ein Hindernis bei der Interpretation von Versuchsergebnissen aus Verdauversuchen dar: Erstens verschleiern sie die Herkunft von Peptiden, weil bei den detektierten Peptiden unklar bleibt, ob diese durch spontane oder durch proteasomale Degradation entstanden sind. Zweitens werden Verdaus durch Anwesenheit nicht-proteasomale Degradationsprodukte potentiell verfälscht, weil diese möglicherweise Substrate für das Proteasom darstellen und mitverdaut werden könnten. Dies hat zur Folge, dass es bei den auftretenden Degradationsprodukten unklar bleibt, ob diese aus dem intakten Substratprotein oder aus einem Fragment des Substratproteins stammen.

Auf dem Boden der genannten Überlegungen folgten im Rahmen dieser Arbeit zwei Konsequenzen zur Verbesserung der Ergebnisqualität: Erstens wurde das HSA-Substrat vor Beginn des Verdaus aufgereinigt mit dem Ziel, nicht-proteasomalen Degradationsprodukte möglichst vollständig zu entfernen und nur das intakte HSA-Protein zum Verdaus anzubieten. Die zur Realisierung dieses Ziels eingesetzte Größenausschlusszentrifugation erwies sich als geeignet, um denaturiertes und oxidiertes HSA weitestgehend von nicht-proteasomalen Degradationsprodukten aufzureinigen.

Zweitens musste nach Ende des Verdaus besondere Vorsicht bei der Einordnung von Verdauprodukten herrschen, da spontane nicht-proteasomale Degradation möglicherweise parallel zur proteasomalen Degradation zeitgleich in demselben Reaktionsgefäß stattgefunden hat. Peptide aus den Verdauansätzen lassen sich nur dann mit hoher Wahrscheinlichkeit als Degradationsprodukte proteasomalen Ursprungs einordnen, wenn sie ausschließlich im Verdauansatz (also in Anwesenheit von 20S Proteasom) auftreten und nicht in der Kontrolle (das heißt in Versuchsansätzen ohne 20S Proteasom Zugabe). Tritt ein und dasselbe Signal im Verdaus und in der Kontrolle auf, ist ein proteasomaler Ursprung des entsprechenden Peptids nur wahrscheinlich, wenn die Differenz der Signalintensität von Verdaus zu Kontrolle signifikant hoch ist. Signale, die ausschließlich in der Kontrolle, aber nicht im Verdauansatz nachgewiesen werden, repräsentieren nicht-proteasomale Degradationsprodukte, die während der Inkubation vom Proteasom weiter degradiert wurden.

**Einführung des Begriffs „differenzielles Signal“:** In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Begriff des differenziellen Signals eingeführt, um bei der Auswertung massenspektrometrischer Daten eine schnelle Differenzierung zwischen proteasomalen und nicht-proteasomalen Degradationsprodukten zu ermöglichen. Als differenzielle Signale wurden Signale definiert, wenn sie entweder ausschließlich im Verdauansatz vorkamen (Gruppe 1) oder ausschließlich in der Kontrolle (Gruppe 2). Die Klassifikation eines Signals als differenzielles Signal impliziert somit den proteasomalen Ursprung des entsprechenden Degradationsproduktes. Durch die Aufteilung in die Gruppen 1 und 2 kann darüber hinaus eine Aussage gemacht werden, ob es sich dabei um ein proteasomales Degradationsprodukt des ursprünglichen intakten Substratproteins oder um ein proteasomales Degradationsprodukt eines Fragments des ursprünglichen Substratproteins handelt.

**Limitationen bei der Beschreibung der Schnittstellencharakteristik:** Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schnittverhalten des erythrozytären Proteasoms (h-Ery) beim Verdau von Insulin und HSA auch unter dem Gesichtspunkt verglichen, welche proteasomalen Schnittstellen *in vitro* tatsächlich auftreten und ob diese einem theoretisch vorhersagbaren Profil entsprechen. Um die real beobachteten Enzymaktivitäten klassifizieren und vergleichen zu können, ist eine eindeutige Definition von Aktivitätsklassen notwendige Voraussetzung. In der Literatur ist zur Klassifikation proteasomaler Enzymaktivität eine Einteilung in die sogenannten „drei klassischen Aktivitäten“ (trypsin-, chymotrypsin- und caspaseartige Aktivität) etabliert. Bei genauerer Betrachtung der Literatur ist diese Einteilung allerdings uneindeutig formuliert [71]. Zum einen gibt es Berichte über eine vierte und fünfte Aktivität des Proteasoms [75, 148], denen Experimente aus den 1990er Jahren zugrunde liegen: Bei Untersuchungen mit fluorogenen Peptidsubstraten konnte bevorzugte Schnittpräferenz hinter verzweigt-kettigen Aminosäuren (BrAAP= *branched chain amino acid preferring*) [147] und hinter kleinen neutralen Aminosäuren (SNAAP= *small neutral amino acid preferring*) [147] festgestellt werden. Zum anderen zeigen Groll und Arendt anhand von *in vitro*-Untersuchungen, dass das Proteasom die Möglichkeit besitzt, nahezu nach jeder Aminosäure zu spalten [63, 149]. Röntgenkristallstrukturanalysen des *Core*-Partikels haben allerdings bestätigt, dass lediglich drei Untereinheiten ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , und  $\beta_5$ ) ein proteolytisch aktives Zentrum besitzen [70]. Somit sind sämtliche festgestellte Aktivitäten als Funktionen der drei aktiven Zentren zu verstehen. Als Konsequenz daraus fokussiert sich die Literatur der letzten Dekade zwar wieder zunehmend auf eine Einordnung in drei Aktivitätsklassen, allerdings existieren keine eindeutigen Definitionen, welche Schnitte zu der jeweiligen Aktivitätsklasse gezählt werden. Es finden sich dazu nur unpräzise Zuordnungen: Als caspaseartiges Verhalten werden in der Literatur Schnitte „hinter sauren Aminosäuren“

bezeichnet, als trypsinartig Schnitte „hinter basischen Aminosäuren“ und als chymotrypsinartig Schnitte „hinter hydrophoben oder neutralen Aminosäuren“ [74, 150, 151].

Für die exakte Einordnung der Versuchsergebnisse im Rahmen dieser Arbeit wurde die Definition der „drei klassischen Aktivitäten“ des Proteasoms deshalb folgendermaßen vorgenommen: Als trypsinartiges Verhalten wurden Schnitte im Sinne der Protease Trypsin hinter Arginin (R) und Lysin (K) sowie zusätzlich noch hinter der basischen Aminosäure Histidin (H) betrachtet. Als caspaseartige Aktivität wurden Schnitte hinter den sauren Aminosäuren Glutamat (E) und Aspartat (D) eingestuft. Als chymotrypsinartige Aktivität zählten Schnitte hinter den hydrophoben Aminosäuren Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I), Methionin (M), Phenylalanin (F), Alanin (A), Prolin (P) und Glycin (G). Zusätzlich wurden auch noch Schnitte hinter Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) als chymotrypsinartig gewertet, da diese beiden Aminosäuren bei Nussbaum et al. im Zusammenhang mit der chymotrypsinartigen Aktivität genannt werden [152].

## 4.2 Proteinvorkommen im Alveolarraum bei PAP

### 4.2.1 Quantitative Untersuchung

Die quantitative Gesamtproteinbestimmung der beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Patientenproben (WLL4 und WLL48) ergab einen Gesamtproteingehalt von 4,0 bzw. 10,1 Milligramm Protein pro Milliliter BALF in der Suspension. Nach Zentrifugation der Probe WLL48 wurden in deren Überstand 5,8 Milligramm Protein pro Milliliter gemessen. In anderen Arbeiten werden Spannen von 0,8 bis 5,2 mg/ml genannt [4, 35, 36]. Insgesamt liegen die Messwerte der in dieser Arbeit exemplarisch untersuchten Proben in der Größenordnung der Literaturwerte. Was den Gesamtproteingehalt betrifft, können die hier untersuchten Proben als repräsentative Proben für die Krankheit PAP betrachtet werden. Die für die Probe WLL48 durchgeführte getrennte Gesamtproteinbestimmung für die Suspension und den Überstand ergab, dass sich im Überstand nur etwa 60 % der Proteine befanden. Onodera et al. hatten in den 1980er Jahren bereits berichtet, dass sich nach Zentrifugation der Hauptteil der Proteine im Überstand (83,1 %  $\pm$  8,4 %) und der Hauptteil der Phospholipide im Pellet (83,0 %  $\pm$  7,6 %) befanden [3]. Da in der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten exemplarischen BALF-Probe 40 % Proteine im Pellet nachgewiesen wurden, erfolgte die elektrophoretische Auftren-

nung zur nachfolgenden qualitativen Proteinuntersuchung getrennt nach Überstand und Pellet.

#### 4.2.2 Qualitative Untersuchung

Die Auftrennung der Proteine mittels 1D-Gelelektrophorese der PAP-BALF WLL48 getrennt nach Suspension und nach Zentrifugation erhaltenem Überstand sowie Pellet zeigte unterschiedliche Proteinmuster. Das Gesamtbild ähnelt den Versuchsergebnissen von Onodera et al. [3]. Die Pellet-Spur ließ sich durch Coomassie-Farbstoff allerdings insgesamt deutlich stärker anfärben, da hier etwa die fünffache Menge Gesamtprotein aufgetragen wurde. Im Vergleich der einzelnen Banden zwischen Pellet und Überstand ließen sich aber auch Banden erkennen, die nur im Pellet zu sehen sind, nicht aber im Überstand. Als Beispiel sei die Bande im Bereich von 30 kDa (Bande „30“) genannt, in der Surfactantprotein A identifiziert werden konnte (s. folgender Absatz). Die Beobachtung einer nur im Pellet auftretenden Bande im Bereich von 30 kDa wurde bereits 1983 von Onodera et al. [3] gemacht, auch wenn das betreffende Protein damals noch nicht identifiziert werden konnte.

**Identifikation der prominentesten Banden:** Aus dem vorliegenden Gel wurden die sieben prominentesten (am stärksten angefärbten) Banden ausgeschnitten und nach einem tryptischen In-Gel-Verdau massenspektrometrisch untersucht. Insgesamt wurden von 44 in den MS-Übersichtsspektren auftretenden Signalen die entsprechenden tryptischen Peptide identifiziert. Diese stammen aus acht verschiedenen Proteinen. Es handelt sich um sechs Serumproteine (Sero-Transferrin, humanes Serumalbumin, Ferritin, Immunglobulin gamma, Immunglobulin kappa, Immunglobulin Schwereketten) und um die lungenspezifischen, für die PAP pathophysiologisch bedeutsamen, Surfactantproteine A und B. Das gehäufte Auftreten von Serumproteinen und Immunglobulinen in der BALF von PAP-Patienten wurde bereits 1979 von Bell beschrieben [33]. Andere charakteristische Proteine, wie die Surfactantproteine, konnten allerdings erst in den Folgejahrzehnten identifiziert werden. Für Surfactantprotein A beispielsweise gelang die Strukturaufklärung [45] und die Messung der außergewöhnlich hohen Konzentration im Rahmen der PAP [36] aber erst Anfang der 1990er Jahren. Die SP-A-Bande erstreckte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit über einen auffällig breiten Molekulargewichtsbereich. Grund dafür könnte das Vorhandensein von SP-A-Isoformen, entstanden durch posttranslationale Modifikationen sein. Beschrieben sind in der Literatur für SP-A mindestens 16 Isoformen durch Glykosylierungen mit Molekulargewichten zwischen 20 und 42 kDa [46].

**Oxidationsstatus der identifizierten Proteine:** Von den identifizierten tryptischen Peptiden wurden bei einem Drittel oxidierte Aminosäuren nachgewiesen. Am häufigsten erfolgte die Oxidation an Methionin und in jeweils einem Fall auch an Cystein und Histidin. Methionin lag in 85 % der Fälle oxidiert vor.

Die Prädisposition von Methionin und Cystein für oxidative Modifikationen deckt sich mit Angaben aus der Literatur, wonach diese beiden Aminosäuren am empfänglichsten für Proteinoxidation sind [113]. Neben Methionin und Cystein werden in der Literatur auch Histidin, Tyrosin und Tryptophan als oxidierbare Aminosäuren beschrieben [153]. Methioninoxidation kann durch nahezu alle Oxidanzien leicht erfolgen [154]. Durch milden oxidativen Stress kommt es zunächst zu einfachen Methioninoxidationen (sog. Methionin-Sulfoxide, MetO), die unter stärkerem oxidativen Stress zu zweifach oxidierten Methionin-Sulfonen (MetO<sub>2</sub>) weiteroxidiert werden können [154]. Die einfache Oxidation von Cystein und Methionin ist reversibel. Die Reduktion von Cystein kann dabei enzymatisch mit Hilfe der Glutathion-Reduktase erfolgen [116], die Reduktion von Methionin mit Hilfe der Methionin-Sulfoxid-Reduktase [115]. Bestimmte oxidative Modifikationen sind jedoch irreversibel, so z. B. die zweifache Oxidation von Methionin [155], die Oxidation von Tyrosin, oxidative Protein-Protein-Querverbindungen, sowie die Carbonylierung von Lysin und Arginin [153]. Die reversible Oxidation bestimmter Aminosäuren wird von manchen Autoren als ein natürliches Redox-Puffersystem angesehen, um Proteine vor irreversibler oxidativer Beschädigung an anderen Aminosäuren zu schützen [156].

Mit Ausnahme von Ferritin sind von allen hier identifizierten Proteinen oxidativ modifizierte Peptide nachgewiesen worden. Das heißt, sieben von acht Proteinen in der vorliegenden PAP-BALF scheinen bereits *in vivo* oxidiert zu sein. Allerdings waren Methionin, Cystein und Histidin nicht in allen Fällen, in denen sie detektiert wurden oxidiert. Oxidiertes Methionin war dabei überwiegend einfach, in einem Falle zweifach oxidiert. Methioninoxidation spielt *in vivo* eine Rolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen [157, 158], kann aber auch ein Artefakt der Probenpräparation darstellen [144, 145], verursacht z. B. im Rahmen der Gelelektrophorese [146].

Sollte es sich bei den Aminosäureoxidationen nicht um Artefakte aus der Probenverarbeitung handeln, legt dieses Ergebnis nahe, dass eine *in vivo* schon bestehende Protein-Teiloxidation vorliegt. Wang und Starosta wiesen bei PAP eine bereits *in vivo* vorhandene Teiloxidation von Proteinen Anfang der 2000er Jahre nach, allerdings nur für SP-A [49, 159]. Mit Hilfe von Oxidanzien konnte Starosta darüber hinaus zeigen, dass sich Albumin, Transferrin, Immunglobulin-Ketten und andere Proteine *in vitro* problemlos

oxidieren lassen und dass *in vivo* teiloxidiertes SP-A *in vitro* weiter oxidiert werden kann. Schwer oxidierbar zeigte sich dagegen SP-D [49].

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung einer PAP-BALF weisen die Surfactantproteine SP-A und SP-B sowie HSA und vier weitere Plasmaproteine als prominente alveolär auftretende Proteine nach. Die Untersuchung des oxidativen Status der PAP-BALF Proteine legt nahe, dass bei pulmonaler Alveolarproteinose außer dem Surfactant-Protein A auch Albumin, Surfactantprotein B, Transferrin und Immunglobulin-Ketten *in vivo* bereits teiloxidiert sind. Dass ein erheblicher Anteil der alveolären Proteine des untersuchten PAP-Patienten oxidativ verändert zu sein scheint, ist ein Hinweis, dass in der Lunge dieses Patienten, zumindest zum Zeitpunkt der Probenentnahme oxidativer Stress herrschte. Die beobachtete Protein-Teiloxidation spricht für milden oxidativen Stress.

Ob möglicherweise auch Oxidationsartefakte aus der Probenvorbehandlung das Ergebnis beeinflussen, kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei zukünftigen Studien sollten deshalb präventive Maßnahmen zur Vermeidung artefizieller Proteinoxidation ergriffen werden, wie sie z. B. von Sun et al. [146] beschrieben werden. Die Autoren entgasten die Acrylamidlösung vor der Polymerisation, um molekularen Sauerstoff als mögliches Oxidationsmittel zu entfernen. Außerdem wurden als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies Flavin (zum Polymerisieren des Gels) und Thioglykolat (als Bestandteil des Elektrophoresepuffers) verwendet.

### 4.3 Enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Testsystem aufgebaut und angewandt, mit dem die enzymatische Aktivität von proteasomhaltigen Lösungen quantifiziert und dadurch verglichen werden kann (vgl. Abschnitt 3.2). Das Testsystem wurde zur Untersuchung von humanem Erythrozyten-Proteasom von Gesunden sowie einer exemplarischen BALF eines PAP-Erkrankten genutzt.

#### 4.3.1 Aktivität von 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten

Das hier untersuchte „Standard“ 20S Proteasom stammte aus humanen Erythrozyten und lag aufgereinigt vor.

**Quantifizierung der enzymatischen Aktivitäten:** Das Proteasom zeigte sich in den durchgeführten Versuchen enzymatisch aktiv in Bezug auf alle drei klassischen Enzymaktivitäten. Die höchste Aktivität lag für caspaseartiges Schnittverhalten (casp) vor, gefolgt von chymotrypsinartigem (ch-tr) und trypsinartigem (tr) Schnittverhalten ( $\text{casp} > \text{ch-tr} > \text{tr}$ ). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Dahlmann et. al, die ebenfalls hohe caspaseartige- und chymotrypsinartige Aktivitäten und niedrige trypsinartige Aktivitäten für das Standard 20S Proteasom gezeigt haben [96]. Die Autoren weisen darauf hin, dass sich, bedingt durch interindividuelle Variabilität, die Intensitäten der Aktivitäten teilweise um Faktor 10 voneinander unterscheiden. Genauso können die Werte der einzelnen Aktivitäten zueinander bis zu Faktor 10 voneinander abweichen. In der Arbeit von Gohlke et al. wird ebenfalls die enzymatische Aktivität von 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten untersucht in einem Assay, der dem hier verwendeten Assay ähnelt [160]. Die eigenen Messwerte sind mit den Messwerten von Gohlke et al. vergleichend in Tabelle 30 gegenübergestellt.

**Tabelle 30: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery beim Verdau fluorogener Testpeptide im Vergleich mit Literaturwerten**

Testpeptid	Enzymaktivität [pmol/ng/min]		
	BZ-VGR-AMC	Suc-LLVY-AMC	Z-LLE-AMC
klassische Aktivität	trypsinartig	chymotrypsinartig	caspaseartig
eigene Daten *	0,020 ±0,008	0,037 ±0,010	0,153 ±0,044
Gohlke et al. [160]	0,012 ±0,005	0,042 ±0,017	0,035 ±0,016

\* Daten aus der Messung an drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery (Chargen 1-3)  
Mittelwerte mit Standardabweichungen

Für die trypsinartige und die chymotrypsinartige Aktivität zeigen die eigenen Ergebnisse verglichen mit denen von Gohlke et al. ähnliche Werte. Bei der caspaseartigen Aktivität liegt die Aktivität bei den eigenen Chargen etwa um Faktor vier über der bei Gohlke et al. gemessenen. Damit werden die Ergebnisse von Gohlke et al. für die erstgenannten Aktivitäten bestätigt. Die Abweichung bei der caspaseartigen Aktivität ist mit den Ausführungen von Dahlmann am ehesten erklärbar, dass es interindividuell zu Schwankungen der einzelnen Intensitäten von bis zu Faktor 10 kommen kann. Beim Vergleich der drei Chargen der Proteasompräparation h-Ery untereinander zeigte sich, dass die gemessenen Werte derselben Aktivität zwischen den Chargen z. T. um Faktor 2 abweichen. Eine plausible Erklärung wären auch hier Schwankungen im Rahmen der interindividuellen Variabilität. Möglicherweise spielt auch das Alter der Präparation eine Rolle. Eventuell lässt die Aktivität nach längerer Lagerungsdauer nach.

**Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses:** In den eigenen Versuchen wurde Substratlösung mit stets gleicher Konzentration (200 bzw. 400  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit verschieden stark verdünnter h-Ery-Proteasompräparation inkubiert. Es zeigte sich unter den gewählten Bedingungen keine Abhängigkeit der Aktivität vom Enzym-Substratverhältnis (vgl. Abb. 20, S 42). Im untersuchten Bereich ist die spezifische Aktivität des Proteasoms also konstant, unabhängig davon, in welchem molaren Verhältnis Proteasom und Substrat zueinander stehen. Dahlmann et al. beschreiben dagegen (unter etwas abweichenden Versuchsbedingungen) eine Abhängigkeit vom Enzym-Substrat-Verhältnis [96]. Im Gegensatz zu den eigenen Versuchen inkubierten Dahlmann et al. die stets gleiche Menge Proteasom mit Substratlösungen aufsteigender Konzentration. Unter höheren Substratkonzentrationen steigt dabei die spezifische Aktivität des Proteasoms an, um sich irgendwann einem Plateau anzunähern, das bei Substratkonzentrationen von etwa 200 bis 400  $\mu\text{M}$  liegt. Substratkonzentrationen in dieser Größenordnung wurden auch in den eigenen Versuchen gewählt, aber stets konstant gehalten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Substratkonzentration in der Inkubationslösung die entscheidende Variable darstellt und nicht die Proteasomkonzentrationen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das hier untersuchte erythrozytäre 20S Proteasom unter den hier gewählten Versuchsbedingungen für fluorogene Peptide stabiles Degradationsverhalten mit Ausprägung aller drei klassischen enzymatischen Aktivitäten unabhängig vom Enzym-Substrat-Verhältnis zeigt. Am ausgeprägtesten war dabei die caspaseartige Aktivität. Mit Abstand folgte die chymotrypsinartige Aktivität, und am geringsten ausgeprägt war die trypsinartige Aktivität.

#### 4.3.2 Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP

Das hier untersuchte alveoläre Proteasom stammt aus einem Patienten mit PAP und lag nicht aufgereinigt vor, sondern war in der BALF enthalten (Probe WLL48).

**Quantifizierung der enzymatischen Aktivitäten:** Bei der Untersuchung der PAP-BALF WLL48 zeigten sich in den durchgeführten Versuchen alle drei klassischen enzymatischen Aktivitäten. Die ausgeprägteste Aktivität war die trypsinartige Aktivität und mit Abstand folgten die caspase- und die chymotrypsinartige Aktivität ( $\text{tr} > \text{casp} > \text{ch-tr}$ ).

Die einzige Studie, die sich bis dato mit der enzymatischen Aktivität von PAP-BALF beschäftigt hat, ist die von Bonella et al. aus dem Jahr 2015 [5]. Die Autoren untersuchten 25 BALF-Proben von PAP-Patienten und 10 BALF-Proben von gesunden Kontrol-



len, jeweils hinsichtlich der Proteasomkonzentration und der enzymatischen Aktivität beim Verdau fluorogener Testpeptide. Die spezifischen Enzymaktivitäten werden dort, anders als bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit, normiert auf das BALF-Volumen, in der Einheit [pkat/ml] angegeben und unterlagen außerdem einer hohen Varianz (trypsinartige Aktivität:  $1,86 \pm 1,15$  pkat/ml; chymotrypsinartige Aktivität:  $0,16 \pm 0,09$  pkat/ml; caspaseartige Aktivität:  $0,97 \pm 0,87$  pkat/ml). Die Proteasomkonzentrationen in den PAP-BALF-Proben zeigte bei Bonella et al. ebenfalls große interindividuelle Schwankungen ( $0,000566 \pm 0,000420$  mg/ml). Die unterschiedliche Normierung und die große statistische Schwankungsbreite in den Daten von Bonella et al. machte einen Vergleich mit der hier gemessenen Probe schwierig. Um dennoch eine orientierende Einordnung der eigenen Daten im Vergleich mit den Daten von Bonella et al. vornehmen zu können, wurden aus den Daten von Bonella et al. die spezifischen Aktivitäten umgerechnet und auf die enthaltene Masse an Proteasom als Bezugsgröße normiert. Dazu wurden jeweils die Mittelwerte der spezifischen Enzymaktivitäten [pkat/ml] dividiert durch den Mittelwert der Proteasomkonzentration [mg/ml], sodass sich spezifische Enzymaktivitäten in [pkat/mg] ergaben. Die Tabelle 31 stellt die eigenen Ergebnisse mit Bonellas Daten gegenüber:

**Tabelle 31: Spezifische enzymatische Aktivitäten einer exemplarischen PAP-BALF beim Verdau fluorogener Testpeptide im Vergleich mit Literaturwerten**

Testpeptid klassische Aktivität	Enzymaktivität [pkat/mg]		
	BZ-VGR-AMC trypsinartig	Suc-LLVY-AMC chymotrypsinartig	Z-LLE-AMC caspaseartig
eigene Daten *	3.137	374	878
Bonella et al. [5] **	3.286	283	1.713

\* n=1 Probe (WLL48), gemittelte Doppelproben; \*\* n=25 Proben; Mittelwerte der spezifischen Enzymaktivitäten [pkat/ml] dividiert durch Mittelwert der Proteasomkonzentrationen [mg/ml]

Für die trypsinartige und die chymotrypsinartige Aktivität zeigen die eigenen Ergebnisse der exemplarisch untersuchten PAP-BALF WLL48 verglichen mit den adaptierten Daten von Bonella et al. gute Übereinstimmung. Die caspaseartige Aktivität ist in der Studie von Bonella et al. etwa doppelt so hoch wie bei der eigenen exemplarischen Messung. Der Vergleich der eigenen Studie mit der Studie von Bonella et al. ist allerdings unter der Berücksichtigung der statistischen Schwankungsbreite der Daten von Bonella und des minimalen Stichprobenumfangs (Einzelstichprobe) auf Seiten der eigenen Daten zu betrachten.

**Potentieller Einfluss nicht-proteasomaler Enzyme:** Als verantwortliches Enzym für den Substratumsatz fluorogener Peptide innerhalb der untersuchten PAP-BALF wurde das Proteasom angesehen. Die Mitwirkung anderer nicht-proteasomaler Enzyme, die ebenfalls in der BALF enthalten sind, wäre denkbar. Um dies auszuschließen, wurden bei den Untersuchungen von Bonella et al. [5] auch Kontrollen unter Zugabe des Proteasominhibitors Epoxomicin durchgeführt, die eine signifikante Reduktion des Substratumsatzes fluorogener Peptide in PAP-BALF ergaben. Das heißt, die Enzymaktivität von PAP-BALF war in der Studie von Bonella et al. im Wesentlichen auf Proteasom zurückzuführen. Von Sixt et al. wurden gleichlautende Beobachtungen für die BALF von Lungengesunden publiziert [2]. Kontrollansätze mit Epoxomicin oder anderen proteasomalen Hemmstoffen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Aufgrund der vorgenannten Ergebnisse von Bonella et al. und Sixt et al. ist das Proteasom als Urheber der gemessenen Enzymaktivitäten im Rahmen dieser Arbeit hochwahrscheinlich. Dennoch kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass auch nicht-proteasomale Enzyme innerhalb der BALF am Verdau fluorogener Peptide zumindest mitbeteiligt waren. Bei zukünftigen Studien sollten daher Kontrollen mit Proteasominhibitoren durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss potentieller nicht-proteasomaler Enzyme auszuschließen, wäre es, Proteasom aus der BALF zu isolieren und separat zu untersuchen.

**Potentieller Einfluss eines Proteasominhibitors auf die Proteasomaktivität:** Die Verdünnung der PAP-BALF führte zu einer ausgeprägten Zunahme der spezifischen Aktivität um bis zu Faktor 30 im Vergleich zu unverdünnter BALF (vgl. Abb. 23, S 46). Ein möglicher Grund für dieses unerwartete Ergebnis könnte darin liegen, dass sich in der BALF ein *in vivo* vorkommender kompetitiver Proteasominhibitor befindet, der bei Verdünnung einen geringeren Einfluss auf das Proteasom nimmt. Die potentielle Existenz und der Einfluss eines endogenen Proteasominhibitors im Alveolarraum wird auch von Sixt et al. diskutiert und zwar im Rahmen der Lungenerkrankung Adult-Respiratory-Distress-Syndrom (ARDS) [52, 161]: In den Studien von Sixt et al. wurde BALF von Lungengesunden (*healthy controls*, HC) mit BALF von ARDS-Patienten im Verhältnis dreiviertel zu einviertel gemischt. Dadurch fiel die Enzymaktivität der HC-BALF auf nur noch 10 % des Ausgangswertes vor Zumischung der ARDS-BALF ab. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass sich in der ARDS-BALF ein endogener kompetitiver Inhibitor befinden muss. In Versuchen, bei denen zuvor erhitzte ARDS-BALF zugemischt worden war, trat kein Aktivitätsverlust auf. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass es sich bei dem unbekanntem Inhibitor um ein Protein handelt. Außerdem zeigte chromatographisch aufgereinigtes Proteasom aus ARDS-BALF verglichen mit dem aus HC-BALF keine wesentlichen Unterschiede in der Enzymaktivität,

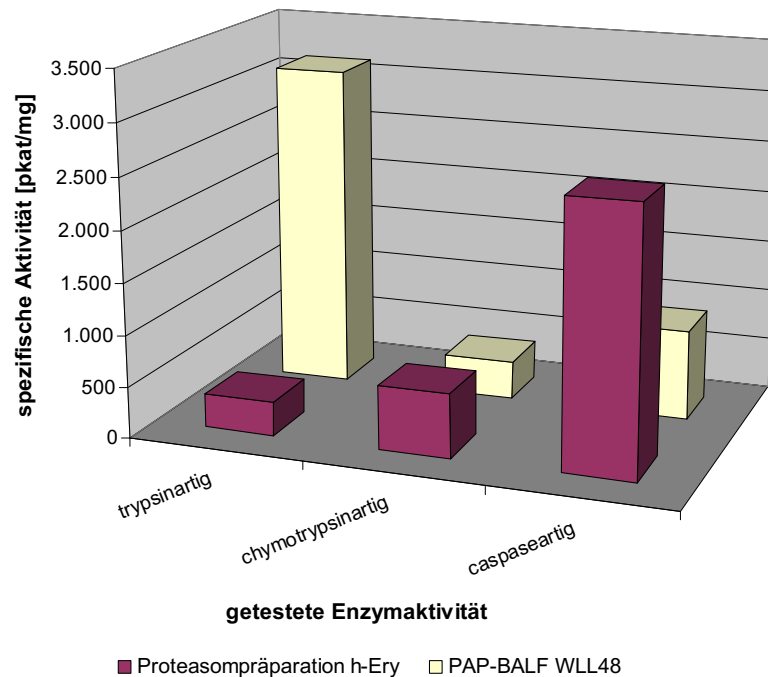
was durch Abwesenheit des potentiellen Inhibitors erklärbar ist. Derselbe oder ein ähnlicher Proteasominhibitor könnte auch im Rahmen der Krankheit PAP die durch Verdünnung beobachtete Zunahme der spezifischen Aktivität erklären, und zwar dadurch, dass mit der Verdünnung der Lavage auch eine Herabsetzung der Konzentration und damit der Wirksamkeit des Inhibitors einhergeht. Auch hier könnte im Rahmen zukünftiger Studien die Isolierung von Proteasom aus der BALF und dessen getrennte Untersuchung eindeutigere Ergebnisse liefern.

**Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses:** Die eigenen Untersuchungen zum Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses sind folgendermaßen zu werten: Erstaunlich ist die Zunahme der spezifischen Aktivität über die Dauer der Inkubation um bis zu Faktor 3. Am ausgeprägtesten war die Aktivitätszunahme bei der verdünnten BALF. Es wurde eigentlich erwartet, dass die spezifischen Aktivitäten zu allen Zeitpunkten gleich ausfallen, denn diese wurden auf die Inkubationszeit normiert. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Änderung der Enzym-Substrat-Verhältnisse, die sich im Lauf der Inkubationszeit ergaben, fördernden Einfluss auf die Proteasomaktivität nehmen.

#### 4.3.3 Vergleich der Aktivitäten von erythrozytärem und alveolärem Proteasom

Verglichen wurden die spezifischen Aktivitäten von erythrozytärem Proteasom mit dem in WLL48 enthaltenen extrazellulären alveolären Proteasom bei PAP. Für das untersuchte erythrozytäre Proteasom wurden dazu die Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten aus den drei gemessenen Chargen gebildet. Für die exemplarisch untersuchte PAP-BALF WLL48 wurden die gemessenen spezifischen Aktivitäten nach 90 min Inkubation gewählt, um bestmögliche Vergleichbarkeit mit den Versuchen an der Proteasompräparation h-Ery zu gewährleisten, die ebenfalls nach 90 min Inkubation betrachtet wurde. Bei der Probe WLL48 wurden die Messwerte aus dem Ansatz mit unverdünnten Lavage verwendet.

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, zeigte das Proteasom aus beiden Quellen jeweils alle drei klassischen enzymatischen Aktivitäten. Ein Aufsummieren der Einzelaktivitäten zu einer Gesamtaktivität ergäbe ähnliche Werte für die Proteasompräparation h-Ery und für die PAP-BALF WLL48. Die grafische Darstellung der Messwerte (vgl. Abb. 36) macht deutlich, dass sich die Gesamtaktivität von Proteasom aus den untersuchten Quellen deutlich unterschiedlich auf die drei klassischen Aktivitäten verteilt.



**Abb. 36: Spezifische Aktivitäten von erythrozytärem Proteasom im Vergleich zu alveolärem Proteasom bei PAP**

Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten von erythrozytärem Proteasom (Mittelwerte aus 3 gemessenen Chargen der Proteasompräparation h-Ery, rot) im Vergleich zu alveolärem Proteasom bei PAP (exemplarisch gemessen an einer PAP-BALF, Probe WLL48, gelb), bestimmt anhand des Verdauens fluorogener Peptide. Die Inkubation des Proteasoms mit den Testsubstraten erfolgte in allen Fällen bei 37°C für 90 Minuten in TEAD-Puffer.

Die chymotrypsinartigen Aktivitäten wichen nur gering voneinander ab. Die caspaseartige Aktivität lag bei der Proteasompräparation h-Ery um Faktor drei über der bei der PAP-BALF WLL48, die trypsinartige Aktivität lag bei der PAP-BALF WLL48 um etwa Faktor zehn über der Proteasompräparation h-Ery.

**Rückschlüsse der charakteristischen Aktivitätsprofile auf den Proteasomtyp:** Beim erythrozytären Proteasom der Präparation h-Ery handelt es sich um Standard 20S Proteasom [162]. Bei PAP ist bisher unklar, um welchen Proteasomtyp es sich handelt. Bonella et al. führten den Proteasomnachweis in PAP-BALF durch Einsatz eines spezifischen Antikörpers für die proteasomale  $\alpha_6$ -Untereinheit [5]. Da diese im *Core*-Partikel sämtlicher bekannter Proteasomtypen enthalten ist, kann dadurch kein Rückschluss auf einen spezifischen Proteasomtyp erfolgen. Im Rahmen der Lungenerkrankung ARDS konnten Sixt et al. mittels Western-Blot, Antikörper-Nachweis und Massenspektrometrie die Coexistenz von Standard- und Immunoproteasom-Untereinheiten nachweisen, wohingegen bei Gesunden ausschließlich 20S Proteasom-Untereinheiten nachgewiesen wurden [51]. Sixt et al. zeigten außerdem, dass die Enzymaktivität von alveolä-

rem Proteasom (bei ARDS) unabhängig von Ubiquitin ist [39], d. h. dass sie nicht von 26S oder i26S Proteasomtypen mit 19S Kappen generiert wird. Unter der Hypothese der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die PAP ist die Existenz von enzymatisch aktivem 20S, i20S oder von beiden im Alveolarraum von PAP-Patienten wahrscheinlich. Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wich das Aktivitätsprofil des PAP-Proteasoms von dem des erythrozytären 20S Proteasoms deutlich ab. Es ähnelte dem bei Dahlmann et al. beschriebenen Profil von i20S Proteasom, das (im Vergleich zu Standard 20S Proteasom) gesteigerte trypsinartige Aktivität und herabgesetzte chymotrypsinartige und caspaseartige Aktivitäten aufwies [96]). Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei dem Proteasom in der PAP-BALF WLL48 um Immuno-20S-Proteasom (i20S) handelt.

Die Ergebnisse der exemplarisch untersuchten PAP-BALF-Probe legen nahe, dass das dort enthaltene extrazelluläre alveoläre Proteasom enzymatisch aktiv ist. Die drei klassischen Aktivitäten wurden quantifiziert und stehen im Einklang mit Daten aus der einzigen bis dato veröffentlichten Studie zur enzymatischen Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP von Bonella et al. [5]. Die Gesamtaktivität des PAP-Proteasoms rangiert in der Größenordnung von 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten, allerdings ist diese Gesamtaktivität anders auf die drei klassischen Aktivitäten verteilt mit großer Präferenz für trypsinartiges Schnittverhalten. Das charakteristische Aktivitätsprofil von PAP-Proteasom gibt Anlass zur Vermutung, dass es sich dabei um i20S handelt.

#### 4.4 Schnittverhalten des 20S Proteasoms

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schnittverhalten von erythrozytärem Proteasom bei der Degradation von Insulin als Modellsubstanz und humanem Albumin als potentiell alveolärem Substratprotein untersucht. Beide Proteine besitzen eine komplexe 3D-Struktur. Insulin und HSA konnten durch das 20S Proteasom unter ausreichend denaturierenden Bedingungen (vgl. Abschnitt 4.5) degradiert werden. Alle Verdauersuche wurden mit 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten (h-Ery) durchgeführt. Aus den Schnittkarten (vgl. Abb. 27, S 55 und Abb. 35, S 74) kann abgelesen werden, inwieweit das Proteasom die drei klassischen Aktivitäten trypsinartig, chymotrypsinartig und caspaseartig zeigt und welche anderen Schnittstellen darüber hinaus noch auftraten.

#### 4.4.1 Schnittverhalten beim Verdau von Insulin und HSA

**Schnittverhalten beim Verdau von Insulin:** Es konnte gezeigt werden, dass 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten in der Lage ist, Insulin zu verdauen. Aufgrund seiner Tertiärstruktur kann Insulin aber nur dann degradiert werden, wenn es vorher denaturiert, das heißt in seine beiden Untereinheiten zerlegt wurde. Der entscheidende Schritt war das Aufbrechen der Disulfidbrücken zwischen den Insulin-Untereinheiten. Dies gelang *in vitro* durch Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol. Die eigenen Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit den Ergebnissen aus der Studie von Büren [163]. Beim Verdau der solitären Insulinketten zeigt das 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten alle drei „klassischen“ Enzymaktivitäten (vgl. Abschnitt 3.3.1), die es auch beim Verdau fluorogener Peptide gezeigt hat (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die experimentell im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptide hatten eine Länge von 6 bis 15 Aminosäuren mit einer Häufung im Bereich von 8 bis 13 Aminosäuren. Außerdem zeigte sich eine Präferenz für den Verdau der B-Kette. Von den 22 identifizierten Peptiden konnten 20 der B-Kette und nur zwei der A-Kette zugeordnet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Versuchen von Rivett et al. gemacht, bei denen ausschließlich Degradation der B-Kette festgestellt wurde [164]. Auch in der Studie von Büren [163] waren Degradationsprodukte der A-Kette unterrepräsentiert im Vergleich zur B-Kette. Betrachtet man die 29 potentiellen Schnittstellen der B-Kette, so bietet diese 17 Chymotrypsinschnittstellen (58 % aller möglichen Schnittstellen), vier Trypsinschnittstellen (14 %) und zwei Caspaseschnittstellen (7 %) sowie sechs sonstige Schnittstellen (21 %), die keiner klassischen Aktivität zugeordnet werden können und als atypisch bezeichnet werden. Im Experiment zeigt sich, dass Proteasom *in vitro* in 47 % der Fälle an atypischen Schnittstellen, in 45 % an chymotrypsinartigen und in 7 bzw. <1 % an trypsin- bzw. caspaseartigen Schnittstellen schneidet.

**Tabelle 32: Schnittstellen des 20S Proteasoms beim Verdau der Insulin B-Kette**

	Schnittstellen des 20S Proteasoms beim Verdau der Insulin B-Kette	
	theoretische Schnittstellen [%]	identifizierte Schnittstellen [%]
chymotrypsinartig	58	45
trypsinartig	14	7
caspaseartig	7	<1
atypisch	21	47

Das erythrozytäre 20S Proteasom führt in über der Hälfte der Fälle atypische Schnitte aus, obwohl nur etwa ein Fünftel der 29 potentiellen Schnittstellen innerhalb der B-Kette atypische Schnittstellen darstellen. Insgesamt bietet die B-Kette sechs Aminosäu-

re-Paarungen, die potentielle atypische Schnittstellen darstellen. Die atypischen Schnitte werden allerdings gehäuft an zwei dieser potentiellen sechs Schnittstellen beobachtet, nämlich zwischen der Aminosäure-Paarung Cystein-Glycin (C-G), die in der B-Kette an Position 7/8 und 19/20 vorkommt. Nach Auflösung der Disulfidbrücken durch DTT zeigen sich die Cysteine offenbar besonders anfällig für die proteasomale Degradation. Eine Präferenz des Proteasoms für kleine neutrale Aminosäuren, wie sie hier zu erkennen war, wurde an anderer Stelle ebenfalls beschrieben [147]. Die übrigen Schnitte erfolgen fast ausschließlich an chymotrypsinartigen Schnittstellen, von denen die B-Kette zahlreiche bietet. Aber auch hier ist eine Häufung bestimmter Schnittstellen ablesbar, nämlich bei 15/16 (L/Y), 17/18 (L/V) und 6/7 (L/C), d. h. jeweils hinter der verzweigt-kettigen Aminosäure Leucin. Eine Präferenz des Proteasoms für verzweigt-kettige Aminosäuren wurde an anderer Stelle ebenfalls beschrieben [147].

**Schnittverhalten beim Verdau von HSA:** Beim Verdau von denaturiertem und oxidiertem HSA wurden acht Peptide detektiert und identifiziert. Die am häufigsten detektierten Schnitte entsprachen caspaseartiger Aktivität (8 Stellen, 50 %). Dahinter folgen chymotrypsinartige (5 Schnittstellen, 30 %) und trypsinartige Schnitte (2 Schnittstellen, 7 %). Nur ein einziger Schnitt konnte keiner klassischen Aktivität zugeordnet werden. Die Peptidlänge betrug 7 bis 14 Aminosäuren, wobei mehr als dreiviertel (78 %) der Peptide eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren zeigten.

#### 4.4.2 Substratabhängigkeit des Schnittverhaltens

Das aus humanen Erythrozyten isolierte 20S Proteasom zeigte beim Verdau von Insulin und HSA alle drei klassischen enzymatischen Aktivitäten. Bei HSA produzierte es fast ausschließlich Schnittstellen, die den drei klassischen Aktivitäten zuzuordnen waren. Bei der Insulin B-Kette entsprach nur etwa die Hälfte der Schnitte den drei klassischen Aktivitäten, die andere Hälfte waren atypische Schnitte. Beim Vergleich zwischen Insulin und HSA in Bezug auf die Auftretenshäufigkeit von Schnittstellen der drei klassischen Aktivitäten wird deutlich, dass der Hauptteil der Schnitte bei HSA caspaseartige Schnitte sind (50 %), die bei Insulin fast nicht vorkommen (<1 %). Chymotrypsinartige Schnitte sind bei Insulin häufig (45 %) und treten bei HSA seltener auf (30 %). Die meisten Peptide beim Insulin-Verdau haben eine mittlere Länge von 8 bis 13 Aminosäuren, wobei die Peptide beim Verdau von HSA mit 8 bis 10 Aminosäuren etwas kürzer ausfallen.

Das Schnittverhalten von erythrozytärem Proteasom der Präparation h-Ery zeigt, dass ein und dieselbe Proteasompräparation unterschiedliches Verhalten zeigen kann, je

nachdem welches Substrat gerade verdaut wird. Das Schnittverhalten des 20S Proteasoms erwies sich als substratabhängig. Aufgrund dieser Substratabhängigkeit wird die begrenzte Aussagekraft der Charakterisierung proteasomaler Aktivität mittels fluorogener Peptide erkennbar. Mit Hilfe kleiner fluorogener Testpeptide wurde eine Quantifizierung der drei klassischen Enzymaktivitäten vorgenommen (s. Abschnitt 3.2), aus der eine Rangfolge der Enzymaktivitäten abgeleitet wurde. Das experimentell *in vitro* tatsächlich beobachtete Schnittverhalten des erythrozytären 20S Proteasoms beim Verdau von Insulin und HSA zeigte aber vielmehr, dass das Aktivitätsprofil, das aus dem Verdau fluorogener Peptide abgeleitet wurde, keine verallgemeinerbare konstante Größe darstellt und wahrscheinlich *in vivo* keinen Bestand behalten wird. Die Degradationscharakteristik, die beim Verdau von Proteinen tatsächlich auftritt, hängt maßgeblich davon ab, welches Substrat verdaut wird.

## 4.5 Substratspezifität des 20S Proteasoms

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits die Substratabhängigkeit des Schnittverhaltens von 20S Proteasom aufgezeigt. Im Folgenden soll die Frage diskutiert werden, welche substratspezifischen Eigenschaften ein Protein haben muss, um ein geeignetes Substrat für das 20S Proteasom darzustellen. Bei komplexen Proteinen ist dabei insbesondere der Faltungszustand bedeutsam. Primäre Substrate für das ATP- und ubiquitin-unabhängige 20S Proteasomsystem sind ungefaltete Proteine [102]. *In vivo* modulieren denaturierende Stressoren den nativen Faltungszustand. Neben anderen Stressoren ist dabei oxidativer Stress von besonderer Bedeutung [102]. Für bestimmte Proteine ist außerdem eine proteasomale Degradation von der Unterstützung durch Chaperone abhängig [128].

Um die Eigenschaften zu studieren, die ein Protein zum geeigneten Substrat für das 20S Proteasom werden lassen, werden im Folgenden die Verdau-Versuche von Insulin und HSA betrachtet, die beide unter bestimmten Bedingungen *in vitro* Substrate des 20S Proteasoms darstellen.

### 4.5.1 Einflüsse von Umgebungsbedingungen und Probenvorbehandlung

Die Umgebungsbedingungen beim Verdau, bzw. auch schon bei der reinen Lagerung von Substratproteinen in Lösung und noch deutlicher die durchgeführten Vorbehandlungen der Substrate nahmen Einfluss auf die Ergebnisse. Insbesondere die Auswirkun-



gen von Pufferlösungen, Ionen, reduzierenden Bedingungen, Temperatur und Lagerungsbedingungen werden an dieser Stelle diskutiert.

**Einfluss auf die Substratproteine:** Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass Insulin und HSA bereits ohne Anwesenheit von Proteasom teilweise degradiert werden, abhängig von den Umgebungsbedingungen (Puffer, Temperatur, reduzierende und oxidierende Agenzien). Natives Insulin zeigte sich in Lösung stabil, jedoch führte der Zusatz von DTT zur Aufspaltung in die A- und B-Ketten. Die B-Ketten zeigten sich im zeitlichen Verlauf nicht stabil, sondern unterlagen spontaner Degradation. Natives HSA erwies sich in wässriger Lösung bereits ohne Anwendung weiterer Maßnahmen über der Zeit als instabil. Wurde das native HSA dagegen in einer HEPES-Pufferlösung gelagert, zeigte es sich stabil und wies keine Degradationsprodukte auf.

Durch Hitze bzw. noch ausgeprägter durch Hitze in Kombination mit DTT konnte HSA denaturiert werden und zeigte bereits direkt nach Ende des Denaturierungsschrittes eine teilweise Degradation in HSA-Fragmente.

Höhere Temperaturen, bzw. höhere DTT-Konzentrationen führten in Anwesenheit des HEPES-Puffers zu einer Gelbildung. Das heißt, die Gelbildung wurde durch Hitze einwirkung und die Anwesenheit von Ionen gefördert. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde nicht näher untersucht und bleibt unklar. Eine Hypothese wäre die Bildung von Fibrillen unter Hitze einwirkung mit anschließender Wasseranlagerung an die Fibrillen. Fibrillierung von HSA unter Hitze einwirkung wurde von verschiedenen Autoren beschrieben [165, 166]. In den Studien von Juarez et al. [166] wird die Fibrillenbildung *in vitro* bei Temperaturen von  $> 65^{\circ}\text{C}$  beobachtet, wobei bereits ab Temperaturen von  $56^{\circ}\text{C}$ , wie sie auch in den eigenen Versuchen angewandt wurden, eine sequenzielle Entfaltung des HSA-Proteins stattfand. Außerdem wird die Fibrillenbildung durch Anwesenheit von Ionen begünstigt [166]. Es kommt dabei zu einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls. Die eigenen Ergebnisse sind konform mit dieser Hypothese, denn sie zeigen im Einklang mit Juarez et. al, dass die Gelbildung abhängig von der Temperatur ( $\geq 56^{\circ}\text{C}$ ), der Anwesenheit von Ionen (bereitgestellt im HEPES-Puffer) und einer vorbestehenden Destabilisierung der 3D-Struktur (DTT-Einfluss) ist.

Durch Wasserstoffperoxid konnte denaturiertes HSA erfolgreich oxidiert werden. Es wurde eine Teiloxidation des HSA-Moleküls unter 4 bzw. 19  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg HSA}$  erreicht. Oxidiertes HSA zeigte sich über der Zeit zunehmend instabil und wies eine zunehmende Anzahl an Degradationsprodukten auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits die Umgebungsbedingungen, die durch den HEPES-Puffer hergestellt wurden (konstanter pH-Wert von 7,8 sowie die Anwesenheit von Ionen, u. a. Natrium und Magnesium), Einfluss auf die nativen Proteine nehmen. Einerseits stabilisiert der Puffer die Proteine Insulin und HSA in Lösung und schützt sie vor spontaner Degradation. Andererseits fördert er die Anlagerung von Wasser an das HSA-Molekül, möglicherweise durch Fibrillenbildung. Dithiothreitol und Hitze dagegen denaturieren das HSA-Molekül und führen zu dessen teilweiser Degradation, die sich mit ansteigender Invasivität der Vorbehandlung (zunehmende Temperaturen, zunehmende DTT-Konzentrationen) verstärkt. Wasserstoffperoxid ist in der Lage, denaturiertes HSA zu oxidieren, was ebenfalls dazu führt, dass es über der Zeit zunehmend in HSA-Fragmente degradiert. Es zeigt sich, dass alle genannten Vorbehandlungsschritte zur teilweisen Degradation von Insulin und HSA führen. Dies stellt für *in vitro* Verdauversuche von 20S Proteasom mit diesen Substraten ein Problem dar, weil dann nicht mehr zwischen proteasomaler und vorbehandlungsbedingter Degradation unterschieden werden kann.

**Einfluss auf den proteasomalen Verdau:** Natives HSA in HEPES-Puffer zeigte sich im Kontrollansatz strukturell stabil und konnte im Verdauansatz nicht durch 20S Proteasom verdaut werden. Denaturiertes HSA und zusätzlich oxidiertes HSA dagegen zeigte in Anwesenheit von 20S Proteasom in der Massenspektrometrie neu aufgetretene Signale, deren Anzahl mit zunehmender Invasivität der Vorbehandlung (denaturiertes HSA, verglichen mit HSA nach zusätzlicher starker Oxidierung) anstieg. Diese sogenannten differenziellen Signale der Gruppe 1 repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit proteasomale Degradationsprodukte und implizieren damit die Aktivität des 20S Proteasoms im Rahmen dieser Versuchsanordnungen. Als nachteilig erwies sich, dass sich in den Verdauansätzen auch viele nicht-proteasomale Degradationsprodukte befanden, erkennbar als Signale in den Kontrollansätzen. Diese nicht-proteasomalen Fragmente der Substratproteine konnten dadurch zwar von „echten“ proteasomalen Verdauprodukten abgegrenzt werden, stellten aber ihrerseits geeignete Substrate für das Proteasom dar. Dass Proteasom neben dem Verdau des intakten Substratproteins auch tatsächlich den „Weiterverdau“ von nicht-proteasomalen Fragmenten des Substratproteins vornimmt, war an Signalen aus den Kontrollen zu erkennen, dadurch dass diese in den Verdauansätzen nicht wieder auftraten (sogenannten differenziellen Signalen der Gruppe 2).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass 20S Proteasom HSA degradieren kann, sobald es denaturiert oder oxidiert ist. Oxidation war dabei der größte Stimulus zur Steigerung der proteasomalen Aktivität. Natives HSA dagegen wurde nicht verdaut.

**Umgang mit nicht-proteasomalen Degradationsprodukten:** Nicht-proteasomale Degradationsprodukte, die bei der Probenvorbereitung entstanden sind, stellen offensichtlich auch geeignete Substrate für das 20S Proteasom dar, sodass es parallel zum Verdau von intaktem Protein und auch von dessen Fragmenten kommt. Um den Verdau des intakten Proteins ohne den Einfluss nicht-proteasomaler Degradationsprodukte untersuchen zu können, wurde deshalb das methodische Ziel formuliert, die Substratlösung möglichst frei von Proteinfragmenten dem 20S Proteasom zum Verdau anzubieten. Zur Realisierung dieses Ziels wurde eine Größenausschlusszentrifugation als Reinigungsverfahren zwischen die Probenvorbereitung und den Verdau geschaltet (vgl. Ergebnisse in Abschnitt 3.3.3.2). Nach dem Aufreinigungsschritt lag das Substratprotein in vielfach höherer Konzentration und hoher Reinheit vor. Dies belegt die Eignung der Größenausschlusszentrifugation zur Aufreinigung der Substratlösung. Derart aufgereinigte Substratlösungen zeigten jedoch über der Zeit erneutes Auftreten nicht-proteasomaler Degradationsprodukte. Deren Konzentration war zwar gering, trotzdem mussten sie bei der Auswertung nachfolgender Verdauversuche mitberücksichtigt werden. Bemerkenswerterweise zeigten sich bei oxidiertem HSA weniger dieser nachträglichen Degradationsprodukte als bei denaturiertem HSA. Das heißt, oxidiertes HSA verhält sich während der Inkubationszeit offensichtlich stabiler als nicht-oxidiertes HSA (vgl. Ergebnisse in Abschnitt 3.3.3.2).

Die Ergebnisse aus dem Verdauversuch von denaturiertem HSA mit 20S Proteasom nach vorausgegangener Aufreinigung des Substrats sprechen für proteasomalen Verdau. Dies belegen die zahlreichen differenziellen Signale der Gruppe 1 mit hohen Signalintensitäten. Außerdem ist ein parallel dazu stattfindender proteasomaler Verdau von HSA-Fragmenten sehr wahrscheinlich, die hauptsächlich während der Inkubationszeit neu entstanden sein dürften, erkennbar an der hohen Anzahl differenzieller Signale der Gruppe 2. Die hohe Anzahl neu aufgetretener intensitätsstarker Verdausignale bei gleichzeitigem Verschwinden von Kontrollsignalen mit lediglich geringer Signalintensität spricht für ein Überwiegen der proteasomalen Degradation von intaktem HSA gegenüber der von HSA-Fragmenten (vgl. Ergebnisse in Abschnitt 3.3.3.2). Das heißt, 20S Proteasom degradiert denaturiertes HSA, jedoch nicht natives HSA.

#### 4.5.2 Einfluss der räumlichen Struktur des Substrats

Beim Verdau von Insulin (vgl. Abschnitt 3.3.1) wurde gezeigt, dass 20S Proteasom Insulin nur dann degradieren kann, wenn es vorher in seine beiden Teilketten A und B zerlegt wird. Wird dagegen das native Insulinmolekül, bei dem die A- und B-Kette über Disulfidbrücken (S-S-Brücken) verbunden sind, als Substrat angeboten, findet keine

Degradation statt. Bei dem vergleichsweise kleinen Insulin (5,8 kDa, 51 Aminosäuren) verhindert schon das Vorhandensein zweier Disulfidbrücken den Verdau. Die Versuche zum Verdau mit HSA zeigten, dass das 20S Proteasom natives HSA nicht degradieren kann (vgl. Abschnitt 3.3.3.1). Nach denaturierender Vorbehandlung in Kombination mit Hitzevorbehandlung (vgl. Abschnitt 3.3.3.2), das heißt, nach Öffnen der Disulfidbrücken, ist 20S Proteasom durchaus in der Lage, auch das vergleichsweise große Protein HSA (66 kDa, 609 Aminosäuren) zu degradieren.

Die eigenen Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Wenzel und Baummeister, die ebenfalls zeigen konnten, dass verschiedene Peptide und Proteine erst nach Aufspaltung sämtlicher Disulfidbrücken zum Substrat für das Proteasom wurden [167]. Die Autoren postulierten, dass die Größe des Proteins darüber entscheidet, ob es in den Proteasomzylinder eintreten kann oder nicht. Sie zeigten die Größenabhängigkeit, anhand der freien Insulin B-Kette, die nicht mehr degradiert werden konnte, sobald ein Nanogold-Partikel mit einem Durchmesser von 2 nm daran gebunden worden war [167]. Spätere Untersuchungen zum „Gating-Mechanismus“ des Proteasoms bestätigten diese These, indem sie nachwiesen, dass der Eintritt in den Hohlzylinder des 20S Core-Partikels (im nicht-aktivierten Zustand) nur einen Durchmesser von 9 Å (= 0,9 nm) besitzt [56].

Die eigenen Ergebnisse sind somit konsistent mit den Angaben in der Literatur, wonach das Proteasom aufgrund seines begrenzten Innendurchmessers nur Proteine einschleusen kann, die in Form entfalteter Einzelketten vorliegen. Ein gefaltetes Protein wird nur dann zum geeigneten Substrat für das 20S Proteasom, wenn dessen intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken vorher aufgelöst wurden. Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurden Disulfidbrücken *in vitro* durch Zugabe des Reduktionsmittels DTT geöffnet. Es stellt sich die Frage, ob auch *in vivo* Mechanismen existieren, um Disulfidbrücken zu spalten. Tatsächlich wird das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beschrieben, das Bestandteil eines Systems zur Qualitätskontrolle neusynthetisierter Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist. Die PDI ist in der Lage Disulfidbrücken von fehlgefalteten Proteinen je nach Bedarf zu oxidieren, zu reduzieren und umzulagern [168]. Fagioli et al. zeigten, dass die PDI des ER intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Immunglobulin-Ketten reduziert [169]. Die dabei entstandenen Einzelketten sind dann klein genug, um über die Membran des ER hinweg ins Zytosol transportiert zu werden. Dort werden sie vom Proteasom degradiert. Die Existenz der PDI, auch in anderen zellulären Kompartimenten über das ER hinaus, wurde gezeigt [168], ebenso die Exkretion von PDI in den Extrazellularraum [170]. Es ist denkbar,

dass die PDI *in vivo* Disulfidbrücken von Proteinen mit komplexer 3D-Struktur gezielt reduziert, um die Proteine dem 20S Proteasom zum Verdau zugänglich zu machen.

#### 4.5.3 Einfluss von oxidativem Stress

Oxidativer Stress entsteht physiologisch im Rahmen des aeroben Stoffwechsels und der oxidativen Phosphorylierung. Erhöhter oxidativer Stress wird u. a. im Rahmen inflammatorischer Lungenerkrankungen beobachtet. Bei der Lungenerkrankung ARDS beispielsweise wird eine diffuse Inflammation der Lunge beschrieben, in deren Folge verschiedene Zellen des Respirationstraktes vermehrt reaktive Spezies produzieren [171]. Die therapeutische Verabreichung von Sauerstoff verstärkt dies zusätzlich. Im Rahmen der Lungenerkrankung PAP herrscht ebenfalls erhöhter oxidativer Stress, erkennbar an *in vivo* bereits teiloxidiertem SP-A [49]. Die in Abschnitt 3.1.2 dargestellten Versuchsergebnisse geben auch bei weiteren alveolären Proteinen, u. a. bei HSA, Hinweise auf eine *in vivo* bereits bestehende Oxidation. HSA sollte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* oxidiert werden, um dessen Eignung als Substrat für das 20S Proteasom *in vitro* zu untersuchen.

HSA konnte *in vitro* mittels Wasserstoffperoxid erfolgreich oxidiert werden (s. Abschnitte 3.3.2.3 und 3.3.3.2). Die Zugabe von Wasserstoffperoxid in Anlehnung an die Versuche von Whittier et al. [128] führte konzentrationsabhängig zu einem stärkeren Oxidationsgrad des HSA. In der Literatur werden teilweise noch höhere Wasserstoffperoxidkonzentrationen verwendet, z. B. von Finch et al. [172]. In den eigenen Versuchen konnte die Anlagerung von 8 bzw. 21 Sauerstoffmolekülen an das HSA massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Im HSA-Molekül befinden sich 35 Cysteine und 6 Methionine, sodass sich 41 potentielle Oxidationsstellen ergeben. Bezieht man weitere potentiell oxidierbare Aminosäuren mit in Betracht, oder auch die Möglichkeit der Mehrfachoxidation von Methioninen und Cysteinen, dann ergibt sich theoretisch die Möglichkeit, das HSA-Molekül mehr als 100-fach zu oxidieren. Somit stellte die im Experiment generierte 8-, bzw. 21-fache Sauerstoffanlagerung eine vergleichsweise milde Oxidation dar. Dennoch entsteht bei der hier verwendeten höchsten Dosis von 50  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg HSA}$  bereits eine weiße Trübung und nach Zentrifugation ein deutliches weißes Pellet, das vermutlich HSA-Aggregate darstellt.

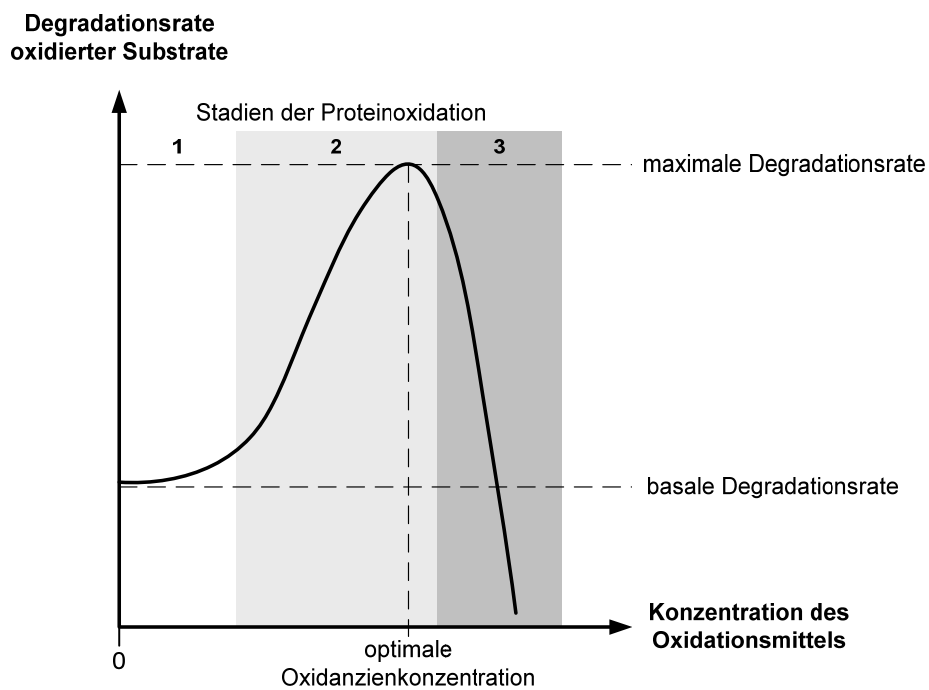
Bei der Inkubation des so hergestellten oxidierten HSA mit 20S Proteasom zeigten sich in den eigenen Versuchen viele Degradationsprodukte in hoher Intensität, verglichen mit dem Verdau von nicht-oxidiertem HSA (vgl. Ergebnisse in Abschnitt 3.3.3.2). Mit steigendem Oxidationsgrad des Substrats stiegen die Signalintensitäten der Verdaupro-

dukte an. Dies belegt erstens die Aktivität des 20S Proteasoms und zeigt zweitens eine deutliche Steigerung der Proteasomaktivität durch Oxidation des HSA sowie eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Oxidationsgrad des Substrats und Enzymaktivität des 20S Proteasoms. Im Vergleich zu nicht-oxidiertem HSA treten kaum differenzielle Signale der Gruppe 2 auf, woraus geschlossen wird, dass der größte Anteil der enzymatischen Aktivität des 20S Proteasom auf den Verdau von intaktem HSA fällt und nur ein untergeordneter Anteil auf Verdau nicht-proteasomaler HSA-Fragmente. Von den Verdauprodukten des oxidierten HSA traten 56 % ausschließlich im Zusammenhang mit der oxidativen Vorbehandlung auf, das heißt über die Hälfte der Verdauprodukte war charakteristisch für den Kontext der Oxidation. Von den Degradationsprodukten konnten 9 Peptide eindeutig als HSA-Abkömmlinge identifiziert werden und dadurch eine Aussage zum Schnittverhalten und der mittleren Peptidlänge von oxidiertem HSA getroffen werden (vgl. dazu Diskussion Abschnitt 4.4).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich 20S Proteasom beim Verdau von oxidiertem HSA deutlich potenter als beim Verdau von nicht-oxidiertem HSA erweist. Außerdem generiert das Proteasom dabei überwiegend charakteristische Peptide, das heißt, es schneidet unter dem Einfluss der Proteinoxidation an anderen Schnittstellen. Die Oxidation von HSA verbessert also dessen Eignung als Substrat für das 20S Proteasom. Ähnliche Beobachtungen beim Verdau von Albumin wurden bereits 1988 von Davies und Lin gemacht [173]. Sie inkubierten oxidiertes und nicht-oxidiertes bovines Serumalbumin (BSA) in Zellextrakten von *Escherichia coli*, die Proteasom enthielten. Natives, nicht-oxidiertes BSA wurde fast nicht verdaut. Wurde das globuläre BSA allerdings vorher dem Einfluss von Oxidanzien ausgesetzt (u. a.  $H_2O_2$ ), so wurde es zu einem geeigneten Substrat des im Zellextrakt vorhandenen Proteasoms. Für BSA verhielt sich der Grad der proteasomalen Degradation im untersuchten Bereich linear zum Grad der oxidativen Denaturierung [173].

Die Abhängigkeit der proteasomalen Degradationsrate vom Grad der Substratoxidation zeigte in nachfolgenden Studien allerdings kein lineares Verhalten (vgl. [107, 120, 174] und s. Abb. 37, 101). Bei schwacher Oxidation mit erhaltenem Faltungszustand des Proteins (Stadium 1 nach Jung et al. [105]) ist zunächst nur ein geringer Anstieg der Degradationsrate erkennbar, der bei mittlerer Oxidation mit entfalteter Proteinstruktur (Stadium 2) stark zunimmt, um dann ein Degradationsoptimum zu erreichen. Wird das Maximum bei starker Oxidation mit Proteinaggregatbildung (Stadium 3) erst einmal überschritten, fällt die Degradationsrate rapide auf nahezu null ab. Die Versuche von Davies und Lin [173] zeigten ferner, dass sich auch andere Proteine mit komplexer 3D-Struktur vergleichbar zum BSA verhielten (z. B. Superoxiddismutase, Hämoglobin oder

Katalase). Im oxidierten Zustand wurden sie zu geeigneten Substraten des Proteasoms. Im Rahmen der eigenen Versuche wurde eine Steigerung der Degradationsrate von HSA mit zunehmender Oxidationsstufe gezeigt, das heißt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Oxidationsgrad des Substrats und Enzymaktivität des 20S Proteasoms. Es ist denkbar, dass das Degradationsoptimum durch die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 50  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg HSA}$  noch nicht erreicht war und dass die Degradationsrate durch noch stärkere Oxidation möglicherweise weiter steigerbar ist.



**Abb. 37: Abhängigkeit der proteasomalen Degradation vom Grad der Substratoxidation**

Jung et al. [104] beschreiben eine nicht-lineare Kinetik der proteasomalen Degradation von Proteinen, abhängig vom Grad der Proteinoxidation. Dabei wird in drei Stadien der Oxidation eingeteilt [105]: Stadium 1: schwach oxidiertes gefaltetes Protein, Stadium 2: schwach oxidiertes aber bereits entfaltetes Protein, Stadium 3: stark oxidiertes Protein mit Aggregatbildung. Nach einem sprunghaften Anstieg der Degradation mit steigendem Oxidationsgrad zeigt sich im Oxidationsstadium 2 ein Degradationsmaximum sowie bei weiterer Oxidation und dem Erreichen des Stadiums 3 ein rapider Abfall bis unterhalb der basalen Degradationsrate von nicht-oxidierten Proteinen. Abb. modifiziert in Anlehnung an Jung et al. [105].

Die besondere Eignung von oxidierten Proteinen als Substrate wird in der Literatur folgendermaßen begründet. Im Oxidationsstadium 2 nach Jung [105] liegt das Protein (teil-) entfaltet vor. Dadurch bekommt das Protein ein Erkennungsmotiv, das es zum Substrat für das Proteasom macht. Es wird vermutet, dass hydrophobe Abschnitte dieses Erkennungsmotiv darstellen [175]. Oxidativ beschädigte, teilentfaltete Proteine kehren hydrophobe Aminosäuren nach außen, die sich beim unbeschädigten und korrekt gefalteten Protein normalerweise im Inneren der globulären Struktur befinden [176]. Diese interagieren mit den  $\alpha$ -UE am Eintritt des Proteasomzylinders und dienen somit als Erkennungsmotiv. Bedeutsam ist demnach ein Verlust der nativen Tertiärstruktur. Mögli-

cherweise sind hydrophobe Abschnitte aber nicht das einzige Erkennungsmotiv. Kurepa und Smalle berichten von oxidierten Proteinen ohne hydrophobe Abschnitte, die trotzdem bevorzugte Substrate für das Proteasom sind [177]. Oxidiertes Calmodulin (CaM) zeigt dabei einen antiproportionalen Zusammenhang zwischen der Anzahl von  $\alpha$ -Helices und der proteasomalen Degradation [178]. In diesem Fall macht die aufgebrochene Sekundärstruktur das CaM zum bevorzugten Substrat. Asher et al. postulieren dabei, dass unstrukturierte Bereiche als Erkennungssignal für das Proteasom dienen [179]. Es handelt sich um Bereiche, bei denen das Protein partiell gestreckt vorliegt [177]. Insbesondere milder oxidativer Stress scheint in der Lage zu sein, unstrukturierte Bereiche zu erzeugen. Native Proteine hingegen, die keine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen, wie z. B. Tau-Protein, Alpha-Synuclein oder Casein, sind auch ohne Oxidation potente Substrate für das 20S Proteasom [180, 181]. Die Substratoxidation hat also nur dann einen günstigen Einfluss auf die proteasomale Degradation, wenn es sich um große Proteine mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur handelt.

Die Integrität bzw. Dysintegrität der Sekundär- und Tertiärstrukturen eines Proteins scheint eine entscheidende Variable zu sein, ob ein Protein zum Substrat für das 20S Proteasom wird. Strukturell beeinträchtigte Proteine sind bevorzugte Substrate des 20S Proteasoms. Aufgrund des begrenzten Innendurchmessers des 20S *Core*-Partikels von 9 bis max. 20 Å müssen diese allerdings als entfaltete Protein-Einzelketten vorliegen, um in den Proteasomzylinder eintreten zu können. Damit komplexe Proteine zu Substraten werden, müssen sie denaturiert werden, um ihre 3D-Struktur (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen) aufzubrechen. Dies kann *in vitro* und *in vivo* geschehen.

- 1. Aufbrechen der Tertiär- und Quartärstrukturen durch Auflösung von Disulfidbrücken oder durch Oxidation:** *In vitro* lassen sich S-S-Brücken durch Reduktionsmittel (z. B. DTT) auflösen oder durch Oxidation. So konnte z. B. für SP-A gezeigt werden, dass Oxidation die Quartärstruktur aufbricht und das Molekül in seine Untereinheiten zerlegt [182]. *In vivo* könnte das Enzym PDI eine Rolle spielen beim Auflösen von S-S-Brücken. Der Verlust der Tertiär- und Quartärstruktur führt einerseits zur (Teil-) Entfaltung, sodass die Polypeptidkette in den Proteasomzylinder eintreten kann und andererseits zur Ausbildung hydrophober Strukturen als Erkennungsmotiv für das 20S Proteasom.
- 2. Aufbrechen der Sekundärstruktur durch Oxidation der Aminosäurekette:** *In vivo* und *in vitro* führt oxidativer Stress zum Verlust von Sekundärstrukturen. Dadurch entstehen die unstrukturierten Bereiche, die ebenfalls als Erkennungsmotiv für das 20S Proteasom dienen.



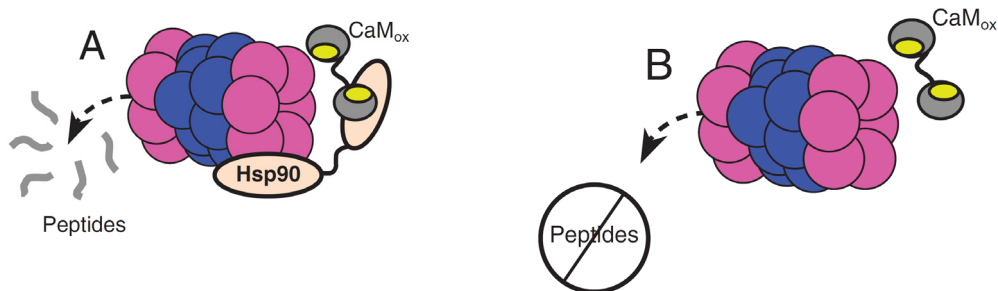
#### 4.5.4 Einfluss von Chaperonen

Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) wurde von Sixt et al. im Überstand von BALF nachgewiesen [2]. Die Autoren konnten dadurch zeigen, dass Hsp90 und 20S Proteasom im Alveolarraum eine Koexistenz führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch ein funktioneller Zusammenhang von Hsp90 und 20S Proteasom besteht. Dafür wurden Versuche zum Verdau von HSA durch 20S Proteasom jeweils in An- und Abwesenheit von Hsp90 durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.2). Bei der Inkubation von HSA mit 20S Proteasom in Anwesenheit von Hsp90 zeigte sich in den eigenen Versuchen zunächst ein ähnliches Bild wie bei den Versuchen ohne Hsp90. Die Anwesenheit von Hsp90 beeinflusste die Anzahl an differenziellen Signalen nur geringfügig, allerdings war die Konzentration der entsprechenden Peptide niedriger. Dies belegt zwar die Aktivität des 20S Proteasoms auch in Anwesenheit von Hsp90, zeigt aber, dass diese geringer ausfällt als ohne Hsp90. Wie bei den Versuchen ohne Hsp90, zeigte das 20S Proteasom auch in Anwesenheit von Hsp90 gesteigerte Verdauaktivität für oxidiertes HSA. Hier wurde das Degradationsoptimum allerdings bei schwach oxidiertem HSA beobachtet. Von den Verdauprodukten des HSA in Anwesenheit von Hsp90 traten etwa 60 % ausschließlich im Zusammenhang mit Hsp90 auf, das heißt über die Hälfte der Verdauprodukte war charakteristisch für den Kontext mit Hsp90. Besonders hervorzuheben ist, dass unter Anwesenheit von Hsp90 andere Signale detektiert werden als ohne Hsp90. Das heißt, 20S Proteasom wird durch Hsp90 offenbar in seinem Schnittverhalten beeinflusst. Einschränkend muss beachtet werden, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei Signalen, die lediglich in Versuchen mit Hsp90 auftreten, um Fragmente von Hsp90 handeln könnte.

Die Ergebnisse aus den eigenen Versuchen legen nahe, dass ein Verdau von HSA auch in Anwesenheit von Hsp90 stattfindet, allerdings mit eingeschränkter Aktivität. Außerdem generiert das 20S Proteasom dabei überwiegend charakteristische Peptide, das heißt, es scheint durch Hsp90 in seiner Präferenz für bestimmte Schnittstellen innerhalb des HSA-Moleküls beeinflusst zu werden.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Beschreibungen zum Einfluss von Hsp90 auf die Proteindegradation durch Proteasom. Unter physiologischen Bedingungen, in denen die Zelle keinem oxidativen oder anders gearteten Stress ausgesetzt ist, wirkt Hsp90 als negativer Regulator der Proteasomfunktion [103, 126]. Wird die Zelle dagegen (oxidativem) Stress ausgesetzt, kehrt sich die Rolle von Hsp90 scheinbar um: Zunächst werden Hsp90 und andere Hitzeschockproteine in ihrer Expression hochreguliert [123,

124]. Hsp90 interagiert dann mit Proteinen oder Proteasom, um oxidative Schäden zu vermeiden oder schnellstmöglich zu beseitigen. Hsp90 kann auf Proteine dergestalt einwirken, dass der Faltungszustand denaturierter Proteine soweit aufrechterhalten wird, dass sie keine Aggregate bilden [183]. Für diesen Vorgang wird kein ATP verbraucht [183]. Auf das Proteasom kann Hsp90 einwirken, indem die Suppression der drei klassischen enzymatischen Aktivitäten, die unter oxidativem Stress typischerweise auftritt, in Anwesenheit von Hsp90 teilweise wieder aufgehoben wird [122, 127]. Darüber hinaus sind Hsp90-Interaktionen beschrieben, die gleichzeitig an Proteasom und Substrat stattfinden [128]. So konnte für oxidiertes Calmodulin (CaM) gezeigt werden, dass es erst in Anwesenheit von Hsp90 zum Substrat für das 20S Proteasom wird [128]. Squier et al. zeigen in ihren Versuchen, dass für den erfolgreichen Verdau von CaM zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein müssen [123]. Erstens muss die 3D-Struktur von CaM ausreichend aufgebrochen werden. Dies geschieht durch die Oxidation von CaM, wodurch die Sekundärstruktur beeinflusst und das Protein gestreckt wird. Bemerkenswert war, dass ein ganz bestimmtes Methionin (Methionin an Position 145 im CaM-Molekül) oxidiert vorliegen musste, um den nachfolgenden Verdau zu ermöglichen [123]. Zweitens muss CaM vom Proteasom als Substrat erkannt werden. Dies geschieht durch die Anwesenheit von Hsp90, das gleichzeitig an Proteasom und an CaM bindet. Erst dadurch ist das Proteasom in der Lage, CaM als Substrat zu erkennen und zu verdauen (vgl. Abb. 38). Die Bindung von Hsp90 am 20S Proteasom erfolgt an den gleichen  $\alpha$ -Untereinheiten, die auch die 19S- und 11S-Kappen binden können [78].



**Abb. 38: Einfluss von Hsp90 auf den proteasomalen Verdau von oxidiertem Calmodulin**

Squier et al. [123] beschreiben den Einfluss von Hsp90 folgendermaßen: A: Hsp90 tritt in Interaktion mit oxidiertem Calmodulin (CaM<sub>ox</sub>) und mit Proteasom, sodass der proteasomale Verdau von CaM<sub>ox</sub> ermöglicht wird. B: CaM<sub>ox</sub> wird in Abwesenheit von Hsp90 nicht zum Substrat für Proteasom und unterliegt keiner proteasomalen Degradation. Abbildung entnommen aus Squier et al. [123].

Somit nimmt Hsp90 über zwei Hauptmechanismen Einfluss auf die proteasomale Degradation unter oxidativem Stress. Erstens steigert Hsp90 durch Wirkung am Proteasom dessen Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress, indem es die Herabsetzung seiner proteolytischen Aktivität verhindert. Zweitens steigert Hsp90 durch gleichzeitige Bindung am 20S Proteasom und am Substrat die selektive Erkennung und Degradation be-

stimmter Proteine. Abhängig von den Umgebungsbedingungen kann Hsp90 die Proteasomfunktion also hemmen oder fördern, indem es mit Substrat oder Proteasom, oder sogar gleichzeitig mit beiden interagiert.

Diese Erkenntnisse erschweren die Einordnung der eigenen Versuchsergebnisse zum Verdau von HSA in An- und Abwesenheit von Hsp90. Bei dem Verdau von HSA wurde das Hsp90 zu Beginn der Inkubation gleichzeitig mit dem 20S Proteasom zugegeben. Es wäre denkbar, dass eine Vorinkubation von Hsp90 mit Proteasom oder Substrat einen Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Im Rahmen der Untersuchungen von Büren [163] konnte beim Verdau von Surfactantprotein A durch 20S Proteasom kein Einfluss einer Vorinkubation von Proteasom bzw. von Hsp90 nach 24-stündiger Inkubation festgestellt werden. Auch der Einfluss von oxidativem Stress auf die Funktion von Hsp90 sollte noch genauer untersucht werden. Denn bei den eigenen Versuchen mit oxidiertem HSA war das Oxidationsmittel  $H_2O_2$  zu Beginn der Inkubation, als Hsp90 und Proteasom zugegeben wurden, bereits aus der Lösung entfernt. Das heißt, Hsp90 und Proteasom waren keinem oxidativen Stress ausgesetzt. Um den Einfluss von Hsp90 auf die Funktion des 20S Proteasoms besser zu verstehen, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen auch Proteasom und Hsp90 oxidativem Stress ausgesetzt werden.

#### 4.6 Potentielle Rolle des alveolären Proteasoms bei der Pathophysiologie der PAP

Die pulmonale Alveolarproteinose wird nach dem aktuellen Stand der Forschung als eine Erkrankung des Alveolarmakrophagen betrachtet. Durch unterschiedliche Auslöser wird eine (in den meisten Fällen autoimmune) Reaktion ausgelöst, in deren Folge die Konzentration und die Funktion des Alveolarmakrophagen dauerhaft beeinträchtigt werden. Die Funktionseinschränkung der Alveolarmakrophagen hat eine schwere Dysbalance der Surfactanthomöostase zur Folge, wobei Surfactant und andere Proteine (v. a. Plasmaproteine) in den Alveolen kumulieren. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion bis hin zum Lungenversagen.

**Extrazelluläres alveoläres Proteasom bei PAP:** Erst vor wenigen Jahren wurde extrazelluläres Proteasom in den Alveolen von PAP-Patienten nachgewiesen, das außerdem in deutlich höheren Konzentrationen auftritt als bei Lungengesunden [5, 68].

Die Ergebnisse aus der exemplarischen Untersuchung der BALF eines Patienten mit PAP sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine enzymatische Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP. Die eigenen Daten stehen dabei im Einklang mit den Untersuchungen von Bonella et. al, die ebenfalls enzymatische Aktivität messen konnten [5]. Welche physiologische Rolle das Proteasom im Alveolarraum wahrnimmt, bzw. welche potentielle Rolle es in der Pathogenese der PAP spielt, ist noch weitgehend unklar.

**Alveoläre Proteine bei PAP:** Ein Leitsymptom der PAP ist die massiv erhöhte alveoläre Proteinkonzentration, die mehr als zehnfach über der von Lungengesunden liegt [4, 5, 26, 36]. Vergleichbar hohe Proteinkonzentrationen wurden auch in den eigenen Versuchen an zwei exemplarischen PAP-BALF-Proben gemessen. Wie bereits von Bell und Honda gezeigt [33, 36], handelt es sich dabei vorrangig um Serumproteine, Immunglobuline und Surfactantprotein A. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die Analyse der Proteinzusammensetzung einer exemplarisch untersuchten PAP-BALF im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Aus der hohen Gesamte Proteinkonzentration in der Alveole ergeben sich Beeinträchtigungen der Lungenfunktion: Zum einen steigt der alveoläre kolloidosmotischen Druck durch hohe Proteinkonzentrationen an. Zum anderen können erhöhte alveoläre Konzentrationen von Serumproteinen zu einer Inhibierung des Surfactant-systems führen, was am Beispiel der Lungenerkrankung ARDS gezeigt werden konnte [184]. Dysfunktionaler Surfactant ist dann nicht mehr in der Lage, die alveoläre Oberflächenspannung ausreichend zu senken, was zum Kollaps von Alveolen und schließlich zur weiteren Beeinträchtigung der Lungenfunktion führt.

**Oxidativer Stress bei PAP:** Die pulmonale Alveolarproteinose ist außerdem gekennzeichnet durch verstärkten oxidativen Stress in der Alveole. Als Nachweisverfahren für oxidativen Stress eignet sich die Bestimmung des Oxidationsstatus alveolärer Proteine. Anhand dessen konnten Wang und Starosta bereits vor etwa 15 Jahren in nativer PAP-BALF eine bereits *in vivo* bestehende Proteinoxidation nachweisen, allerdings nur für das Protein SP-A [49, 159]. Die Untersuchungen an einer exemplarischen PAP-BALF im Rahmen der vorliegenden Arbeit lieferte ebenfalls Hinweise auf eine SP-A-Oxidation *in vivo*. Als Neuerung ergaben sich bei den Untersuchungen der genannten Probe auch Hinweise auf eine *in vivo* existente Teil-Oxidation von Surfactantprotein B, von HSA, von Transferrin und von Immunglobulinen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der These von (mildem) oxidativem Stress im Rahmen der Krankheit PAP. Für andere Lungenerkrankungen (z. B. für die zystische Fibrose) wurde von Starosta et al. gezeigt, dass der Oxidationsgrad des alveolären Proteoms mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert und deshalb einen geeigneten Biomarker darstellt [49]. Oxidativer Stress hat Auswirkungen auf alveoläre Proteine, alveoläre Zellen und das

alveoläre Proteasom, die im Zusammenhang mit der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf der pulmonalen Alveolarproteinose stehen könnten.

**Einfluss von oxidativem Stress auf alveoläre Proteine:** Eine hinreichende Dosis an oxidativem Stress beeinflusst Proteine in ihrer Struktur und Funktion bis hin zum vollständigen Struktur- und Funktionsverlust. Wird beispielsweise das alveoläre Protein SP-A dem Einfluss von Oxidanzien (z. B.  $H_2O_2$ ) ausgesetzt, so führt dies zum Zusammenbruch der hexameren Tertiärstruktur aufgrund oxidativer Degradation von Disulfidbrücken. Das in seine Untereinheiten zerfallene SP-A verliert dadurch seine Funktion [182]. Das heißt, dass pulmonaler oxidativer Stress das Surfactantsystem in dessen physiologischer Funktion kompromittiert. Im Hinblick auf kumulierende überalterte Surfactantproteine im Rahmen der PAP könnte die oxidative Degradation allerdings auch hilfreich sein, indem sie unbrauchbares SP-A zum geeigneten Substrat für das 20S Proteasom werden lässt [163]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel des alveolär in hoher Konzentration auftretenden Proteins HSA bestätigt, dass Proteine durch Oxidation zu besonders geeigneten Substraten für das 20S Proteasom werden. Dies wurde auch an anderer Stelle bereits für verschiedene Proteine berichtet [104, 174]. Die oxidative Modifikation eines Proteins muss allerdings nicht in jedem Fall eine Markierung zum Abbau des Proteins durch das 20S Proteasom bedeuten, sondern kann auch andere Funktionen darstellen: Dalle-Donne et al. postulierten die Existenz eines alveolären Redoxsystems, gebildet von reversibel oxidierbaren alveolären Proteinen, das in der Lage ist, Lungengewebe vor irreversibler oxidativer Beschädigung zu bewahren [153, 171].

**Einfluss von oxidativem Stress auf alveoläre Zellen:** Durch oxidativen Stress werden pulmonale Zellen in ihrer Struktur und ihrer Funktion beeinträchtigt. Tasaka et. al, sowie Kratzer et al. berichten bei ARDS, dass Mikrotubuli, die maßgeblich für die Stabilität des intrazellulären Zytoskeletts verantwortlich sind, unter oxidativem Stress zerstört werden [171, 185]. In der Folge kommt es zur Destruktion der Lungenstruktur mit konsekutiver Störung der Blut-Luft-Schranke. Tran et al. berichten bei COPD), dass Alveolarmakrophagen, die bei PAP *per se* bereits dysfunktional sind, unter oxidativem Stress in ihrer Phagozytosefähigkeit weiter eingeschränkt werden [186].

**Einfluss von oxidativem Stress auf das Proteasom:** Auch das Proteasom ist in seiner Konzentration, seiner Struktur und seiner Funktion beeinflussbar durch oxidativen Stress: Ding, Keller und Conconi berichten von einer anfänglichen Inhibition des Proteasoms unter oxidativem Stress [122, 127]. Nach einer Adaptationszeit von etwa 24 Stunden unter anhaltendem oxidativem Stress beobachteten Pickering et al. allerdings

eine Steigerung der proteasomalen Aktivität. Dabei führte anhaltender oxidativer Stress kompensatorisch zu einer *de novo* Synthese von 20S, i20S und 11S-Regulatorikappen [99]. Die bereitgestellten 20S und i20S Proteasomtypen sind im Gegensatz zum 26S Proteasom wesentlich potenter beim Abbau oxidierter Proteine [99, 120]. Diese Fähigkeit kann nochmals erheblich gesteigert werden, indem sich unter oxidativem Stress, freie 11S Kappen an 20S bzw. i20S Proteasom binden. Diese 11S-(i)20S-11S Immunoproteasom-Formation zeigt sich hochpotent beim Verdau oxidierter Proteine [100]. Außerdem disassembliert Standard-26S Proteasom unter oxidativem Stress in sein 20S Core-Partikel und zwei freie 19S Kappen, um mehr 20S Proteasom zur Verfügung zu stellen [119]. Das im Rahmen dieser Arbeit gemessene Aktivitätsprofil des Proteasoms in PAP-BALF zeigt große Ähnlichkeit zum Aktivitätsprofil von Immunoproteasom, was mit den o. g. Berichten über gesteigerte Konzentrationen von i20S nach Induktion durch oxidativen Stress im Einklang steht.

**Konzentration und enzymatische Aktivität des alveolären Proteasoms bei PAP:** Hohe Protein- und Proteasomkonzentrationen sind ein Charakteristikum der PAP. Wird ein Quotient aus Proteasomkonzentration pro Proteinkonzentration in der PAP-BALF gebildet und mit gesunden Kontrollen verglichen, zeigt sich Proteasom im Rahmen der PAP trotz seiner absolut gesehen hohen Konzentration relativ betrachtet unterrepräsentiert [5]. Bonella et al. vermuten eine ungenügende Hochregulierung der Proteasomsynthese bei PAP [5]. Die Enzymaktivität von Proteasom in PAP-BALF wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit exemplarisch an einer Patientenprobe gemessen und ist im Einklang mit den Ergebnissen von Bonella et al. [5]. Normiert auf die vorhandene Masse an Proteasom zeigen die Daten von Bonella et al. eine eingeschränkte spezifische Enzymaktivität des alveolären Proteasoms bei PAP. Ähnliche Beobachtungen machten auch Sixt et al. im Rahmen der Krankheit ARDS, bei der auch aktivitätsgemindertes Proteasom nachgewiesen wurde [51]. Für das ARDS wurde ein endogener Inhibitor in der BALF für die erniedrigte Aktivität verantwortlich gemacht. Die Existenz eines solchen Inhibitors ist auch für die Krankheit PAP vorstellbar. Die eigenen Daten zur Abhängigkeit der spezifischen Enzymaktivität von der Verdünnung der PAP-BALF sind vereinbar mit der Existenz eines endogenen Inhibitors in der BALF.

**Potentielle Funktionen des alveolären Proteasoms bei PAP:** Eigene Ergebnisse, die im Einklang mit der Literatur stehen, bestätigen die enzymatische Aktivität von alveolärem Proteasom bei PAP anhand der Degradation fluorogener Peptide. Das Aktivitätsprofil legt nahe, dass es sich bei PAP um Immuno-20S Proteasom (i20S) handelt. Weitere eigene Ergebnisse sowie Ergebnisse von Büren [163], die allerdings jeweils unter Verwendung von 20S Proteasom aus dem humanen Erythrozyten generiert wurden, konnten

zeigen, dass die beiden Proteine HSA und SP-A, die bei PAP in hohen Konzentrationen im Alveolarraum vorliegen, durch 20S Proteasom verdaut werden können. Voraussetzung dafür war die ausreichende Denaturierung der 3D-Struktur. Substratoxidation führte darüber hinaus zu einer erheblich gesteigerten Aktivität des 20S Proteasoms beim Verdau von HSA. In Anwesenheit von Hsp90, das im Alveolarraum eine Koexistenz mit 20S Proteasom führt, konnte HSA ebenfalls verdaut werden. Sowohl der Einfluss von Proteinoxidation, als auch von Hsp90 ging bemerkenswerterweise mit einer abweichenden Schnittstellenpräferenz des Proteasoms einher. Mit Blick auf die genannten eigenen Ergebnisse sowie auf Daten aus der Literatur können folgende Hypothesen zur Funktion des alveolären (i)20S Proteasoms im Rahmen der Pulmonalen Alveolarproteinose abgeleitet werden:

- Der Abbau kumulierter alveolärer Proteine, um dadurch degradative Funktionen des insuffizienten Alveolarmakrophagen zu kompensieren.
- Die Aufrechterhaltung der alveolären kolloidosmotischen Druck-Homöostase durch Verdau von HSA.
- Die Beseitigung beschädigter und funktionslos gewordener Proteine, die unter dem Einfluss von oxidativem Stress entstanden sind.
- Die Wahrnehmung immunologischer Funktionen in Zusammenarbeit mit Hsp90 durch Degradation von Antigenen und Produktion von geeigneten Antigen-Peptiden zur Präsentation an spezialisierte Immunzellen.

## 4.7 Synthese und Ausblick

Angesichts des alveolären Vorkommens von Proteasom und eingedenk seiner zentralen Rolle im intrazellulären Proteinstoffwechsel stellt sich die Frage nach der physiologischen Funktion des extrazellulären Proteasoms im Alveolarraum Lungengesunder. Noch eindrücklicher imponiert diese Frage bei Lungenerkrankungen wie der pulmonalen Alveolarproteinose, weil hier massenhaft Proteine und funktionsloser „Proteinschrott“ (*protein waste*) zusammen mit Massen an Proteasom gefunden werden, dessen potentielle Aufgabe bislang völlig im Dunkeln liegt.

Das extrazelluläre alveoläre Proteasom bei PAP ist enzymatisch aktiv. Dies zeigen die eigenen Ergebnisse im Einklang mit der Arbeit von Bonella et al. [5]. Alveoläres Proteasom ist *in vitro* in der Lage kleine Peptide zu verdauen. Im Vergleich mit Lungenge-

sunden zeigt alveoläres Proteasom bei PAP jedoch eingeschränkte Enzymaktivität. Vermutlich steht es unter dem negativen Einfluss eines endogenen, in der BALF vorhandenen, Proteasominhibitors. Es gibt Hinweise darauf, dass es sich beim alveolären Proteasom im Rahmen der PAP um Immunoproteasom (i20S) handelt. Oxidativer Stress, Beschädigungen der nativen Struktur potentieller alveolärer Substratproteine sowie die Anwesenheit von Chaperonen nehmen Einfluss auf den proteasomalen Verdau. In diesem Zusammenhang sollte an einer repräsentativen Probenanzahl bestätigt werden, dass PAP-BALF regelhaft enzymatische Aktivität aufweist. Bei allen zukünftigen Untersuchungen sollte durch Einsatz proteasomaler Inhibitorsubstanzen (z. B. Epoxomicin) sichergestellt werden, dass gemessene Enzymaktivitäten rein proteasomalen Ursprungs sind. Ein weiteres Ziel wäre die Suche nach einem endogenen Inhibitor, der die enzymatische Aktivität des Proteasoms einschränkt. Hierbei sei auf Versuche von Sixt et al. verwiesen, die sich im Rahmen der Lungenkrankung ARDS mit der Identifikation eines endogenen Inhibitors beschäftigt haben [161, 187]. Zukünftige Studien sollten sich mit der Struktur des alveolären Proteasoms bei PAP beschäftigen und aufklären, welche Proteasomsubtypen bei PAP eine Rolle spielen. Ob die Lungenkrankheit PAP regelhaft mit alveolärem oxidativen Stress einhergeht und wenn ja, welchen Einfluss dies auf die potentiellen alveolären Substratproteine hat, ist eine weitere interessante Fragestellung für zukünftige Studien. Bei solchen Untersuchungen sollte artefizielle Oxidation während des Analyseprozesses ausgeschlossen werden. Hierbei sei auf Versuche von Sun et al. verwiesen, die Maßnahmen zur Verhütung artefizieller Proteinoxidation beschreiben [146].

Über den Verdau von kleinen Peptiden hinaus wurde gezeigt, dass 20S Proteasom auch große Proteine mit komplexer Tertiärstruktur verdauen kann. Am Beispiel von HSA zeigen dies die eigenen Ergebnisse. Am Beispiel von Surfactantprotein A wurde dies in einer Studie von Büren [163] beschrieben. Voraussetzungen waren die Oxidation bzw. die Denaturierung der Tertiärstruktur der Substratproteine. Dabei zeigte das 20S Proteasom Schnittverhalten, das nicht vollumfassend mit dem Modell der „drei klassischen Aktivitäten“ des Proteasoms im Einklang steht und das durch Substratoxidation sowie durch das Chaperon Hsp90 moduliert wird. In zukünftigen Studien sollten anhand weiterer alveolär vorkommender Proteine die Einflüsse der Substratoxidation und von Chaperonen eingehender untersucht werden. Die Ergebnisse zum Verdau komplexer Proteine *in vitro* wurden allerdings an einem Modellsystem aus isoliertem 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten generiert.

Aus der Tatsache, dass der Verdau alveolärer Proteine durch 20S Proteasom unter bestimmten Rahmenbedingungen *in vitro* gezeigt wurde, ergibt sich die Frage, ob ein sol-



cher Verdau tatsächlich auch *in vivo* im Alveolarraum von PAP-Patienten stattfindet. Ein großer Erkenntnisgewinn auf dem Weg zur Beantwortung dieser Frage wäre durch eine weitere Annäherung an die *in vivo* Bedingungen zu erwarten. Dies könnte erreicht werden, wenn zukünftige Studien zum Verdau alveolärer Proteine tatsächlich an alveolärem Proteasom aus PAP-Patienten durchgeführt werden. Daraus ergibt sich die Isolation von Proteasom aus PAP-BALF als gewichtiges zukünftiges Ziel. Als Substratproteine für weitere Studien sollten ebenfalls aus PAP-BALF isolierte Proteine verwendet werden.

Vor diesem Hintergrund erscheinen weitere systematische Untersuchungen zur Rolle des extrazellulären Proteasoms bei PAP, bei anderen Lungenerkrankungen und ebenso bei Lungengesunden äußerst relevant.

# 5 Verzeichnisse

## 5.1 Literaturverzeichnis

1. Jung T, Catalgol B, Grune T (2009) The proteasomal system. *Mol. Aspects Med* 30(4): 191–296. doi: 10.1016/j.mam.2009.04.001
2. Sixt SU, Beiderlinden M, Jennissen HP et al. (2007) Extracellular proteasome in the human alveolar space: a new housekeeping enzyme? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 292(5): 8. doi: 10.1152/ajplung.00140.2006
3. Onodera T, Nakamura M, Sato T et al. (1983) Biochemical characterization of pulmonary washings of patients with alveolar proteinosis, interstitial pneumonitis and alveolar cell carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 139(3): 245–263. doi: 10.1620/tjem.139.245
4. Alberti A, Luisetti M, Braschi A et al. (1996) Bronchoalveolar lavage fluid composition in alveolar proteinosis. Early changes after therapeutic lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 154(3 Pt 1): 817–820. doi: 10.1164/ajrccm.154.3.8810625
5. Bonella F, Sixt SU, Thomassen J et al. (2015) Extracellular 20S proteasome in BAL and serum of patients with alveolar proteinosis. *Immunobiology* 220(3): 382–388. doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.010
6. Rosen SH, Castelman B, Liebow AA (1958) Pulmonary alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med* 258(23): 1123–1142. doi: 10.1056/NEJM195806052582301
7. Bonella F, Costabel U (2016) Pulmonale Alveolarproteinose. *Pneumologie* 13(1): 4–12. doi: 10.1007/s10405-015-0011-4
8. Babiacyk WI, Bonella S, Ciccotti G et al. (2012) Silver self aggregation in a nanodevice for enhanced Raman spectroscopy: experiments vs. simplified modeling via molecular dynamics. *Nanoscale* 4(7): 2362–2371. doi: 10.1039/c2nr30145h
9. Griese M (2002) Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 99(15): A1013-A1023
10. Bonella F, Bauer PC, Griese M et al. (2011) Pulmonary alveolar proteinosis: new insights from a single-center cohort of 70 patients. *Respiratory Medicine* 105(12): 1908–1916. doi: 10.1016/j.rmed.2011.08.018
11. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R et al. (2008) Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 177(7): 752–762. doi: 10.1164/rccm.200708-1271OC
12. Carey B, Trapnell BC (2010) The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol* 135(2): 223–235. doi: 10.1016/j.clim.2010.02.017

13. Davidson JM, Macleod WM (1969) Pulmonary alveolar proteinosis. *British Journal of Diseases of the Chest* 63(1): 13–28. doi: 10.1016/S0007-0971(69)80040-9
14. Ladeb S, Fleury-Feith J, Escudier E et al. (1996) Secondary alveolar proteinosis in cancer patients. *Support Care Cancer* 4(6): 420–426. doi: 10.1007/BF01880639
15. Patiroglu T, Akyildiz B, Patiroglu TE et al. (2008) Recurrent pulmonary alveolar proteinosis secondary to agammaglobulinemia. *Pediatr Pulmonol* 43(7): 710–713. doi: 10.1002/ppul.20818
16. Ruben FL, Talamo TS (1986) Secondary pulmonary alveolar proteinosis occurring in two patients with acquired immune deficiency syndrome. *The American Journal of Medicine* 80(6): 1187–1190. doi: 10.1016/0002-9343(86)90683-2
17. Uzmezoglu B, Simsek C, Gulgosteren S et al. (2017) Does dust-associated pulmonary alveolar proteinosis represent an autoimmune disorder? *Am J Ind Med* 60(6): 591–597. doi: 10.1002/ajim.22702
18. Ghio AJ, Stonehuerner JG, Richards JH et al. (2008) Iron homeostasis and oxidative stress in idiopathic pulmonary alveolar proteinosis: a case-control study. *Respir Res* 9: 10: 1-8. doi: 10.1186/1465-9921-9-10
19. Huizar I, Kavuru MS (2009) Alveolar proteinosis syndrome: pathogenesis, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* 15(5): 491–498. doi: 10.1097/MCP.0b013e32832ea51c
20. Dirksen U (2003) Die Rolle des Granulozyten-Makrophagen Wachstumsfaktors für die Pathogenese der Alveolarproteinose. Düsseldorf, Univ., Habil.-Schr., 2004
21. Bonella F, Wiebel M, Costabel U (2016) Pulmonale Alveolarproteinose. In: Kreuter M, Costabel U, Herth F et al. (eds) *Seltene Lungenerkrankungen*, 1. Aufl. 2016. Springer Berlin; Springer, Berlin, pp 237–245
22. Uchida K, Nakata K, Carey B et al. (2014) Standardized serum GM-CSF autoantibody testing for the routine clinical diagnosis of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *J. Immunol. Methods* 402(1-2): 57–70. doi: 10.1016/j.jim.2013.11.011
23. Bauer PC, Bonella F, Tötsch M et al. (2009) Die bronchoalveoläre Lavage aus klinischer Sicht. *Pneumologe* 6(4): 233–242. doi: 10.1007/s10405-008-0304-y
24. Tokura S, Akira M, Okuma T et al. (2017) A Semiquantitative CT Grading System for Evaluating Therapeutic Response in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Ann Am Thorac Soc* 14(9):1403-1411. doi: 10.1513/AnnalsATS.201607-574OC
25. Costabel U, Guzman J, Bonella F et al. (2007) Bronchoalveolar lavage in other interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* 28(5): 514–524. doi: 10.1055/s-2007-991525
26. Bonella F, Bauer PC, Griese M et al. (2012) Wash-out kinetics and efficacy of a modified lavage technique for alveolar proteinosis. *European Respiratory Journal* 40(6): 1468–1474. doi: 10.1183/09031936.00017612
27. Seymour JF, Begley CG, Dirksen U et al. (1998) Attenuated hematopoietic response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with acquired pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 92(8): 2657–2667

28. Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD et al. (2001) Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 163(2): 524–531
29. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y et al. (2010) Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 181(12): 1345–1354. doi: 10.1164/rccm.200906-0978OC
30. Ohkouchi S, Akasaka K, Ichiwata T et al. (2017) Sequential GM-CSF Inhalation after Whole Lung Lavage for Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Report of Five Intractable Cases. *Ann Am Thorac Soc.* 14(8):1298-1304. doi: 10.1513/AnnalsATS.201611-892BC
31. Kavuru MS, Malur A, Marshall I et al. (2011) An open-label trial of rituximab therapy in pulmonary alveolar proteinosis. *Eur. Respir. J* 38(6): 1361–1367. doi: 10.1183/09031936.00197710
32. Borie R, Danel C, Laine C et al. (2015) Traitement de la protéinose alvéolaire par transplantation intrapulmonaire de macrophages (Treatment of alveolar proteinosis by intrapulmonary transplantation of macrophages). *Med Sci (Paris)* 31(3): 241–244. doi: 10.1051/medsci/20153103005
33. Bell DY, Hook GER (1979) Pulmonary Alveolar Proteinosis - Analysis of Airway and Alveolar Proteins. *American Review of Respiratory Disease* 119(6): 979–990
34. Bell DY, Haseman JA, Spock A et al. (1981) Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124(1): 72–79
35. Paschen C, Reiter K, Stanzel F et al. (2005) Therapeutic lung lavages in children and adults. *Respir Res* 6: 138. doi: 10.1186/1465-9921-6-138
36. Honda Y, Takahashi H, Shijubo N et al. (1993) Surfactant protein-A concentration in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 103(2): 496–499
37. Lenz AG, Jorens PG, Meyer B et al. (1999) Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *European Respiratory Journal* 13(1): 169–174
38. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I et al. (1998) Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS - Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Medicine* 24(4): 296–303
39. Sixt SU, Adamzik M, Spyrcak D et al. (2009) Alveolar extracellular 20S proteasome in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 179(12): 1098–1106. doi: 10.1164/rccm.200802-199OC
40. Wattiez R, Hermans C, Bernard A et al. (1999) Human bronchoalveolar lavage fluid: Two-dimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins. *Electrophoresis* 20(7): 1634–1645. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990601)20:7<1634:AID-ELPS1634>3.0.CO;2-J

41. Lindahl M, Ståhlbom B, Tagesson C (1995) Two-dimensional gel electrophoresis of nasal and bronchoalveolar lavage fluids after occupational exposure. *Electrophoresis* 16(7): 1199–1204
42. Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P et al. (2001) Proteomics as the Tool to Search for Lung Disease Markers in Bronchoalveolar Lavage. *Disease Markers* 17(4): 271–284. doi: 10.1155/2001/607263
43. Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P et al. (2002) Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences* 771(1-2): 221–236
44. Wattiez R, Falmagne P (2005) Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 815(1-2): 169–178
45. Voss T, Schäfer KP, Nielsen PF et al. (1992) Primary structure differences of human surfactant-associated proteins isolated from normal and proteinosis lung. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1138(4): 261–267. doi: 10.1016/0925-4439(92)90002-5
46. He C (2003) Proteomic analysis of human bronchoalveolar lavage fluid: expression profiling of surfactant-associated protein A isomers derived from human pulmonary alveolar proteinosis using immunoaffinity detection. *Proteomics* 3(1): 87–94. doi: 10.1002/pmic.200390013
47. Bai Y, Galetskiy D, Damoc E et al. (2004) High resolution mass spectrometric alveolar proteomics: identification of surfactant protein SP-A and SP-D modifications in proteinosis and cystic fibrosis patients. *Proteomics* 4(8): 2300–2309. doi: 10.1002/pmic.200400855
48. Bai Y, Galetskiy D, Damoc E et al. (2007) Lung alveolar proteomics of bronchoalveolar lavage from a pulmonary alveolar proteinosis patient using high-resolution FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389(4): 1075–1085. doi: 10.1007/s00216-007-1403-z
49. Starosta V (2004) Oxidative Modifikationen des bronchoalveolären Proteoms und der Surfactant-Proteine A und D bei chronischen Lungenerkrankungen. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität, München
50. Harayama T, Shindou H, Kita Y et al. (2015) Establishment of LC-MS methods for the analysis of palmitoylated surfactant proteins. *J. Lipid Res* 56(7): 1370–1379. doi: 10.1194/jlr.D060236
51. Sixt SU (2012) Distinct Proteasome Subpopulations in the Alveolar Space of Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Mediators Of Inflammation* (2012): 204250–204259. doi: 10.1155/2012/204250
52. Sixt SU, Peters J (2010) Extracellular alveolar proteasome: possible role in lung injury and repair. *Proc Am Thorac Soc* 7(1): 91–96. doi: 10.1513/pats.200906-035JS
53. Harris JR (1968) Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* 150(3): 534–537

54. Harris JR (1969) The Isolation and Purification of a Macromolecular Protein Component from Human Erythrocyte Ghost. *Biochimica et Biophysica Acta* 188(1): 31–41
55. Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L et al. (1989) The Multicatalytic Proteinase (Prosome) is Ubiquitous from Eukaryotes to Archaeobacteria. *FEBS Letters* 251(1-2): 125–131
56. Löwe J, Stock D, Jap B et al. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268(5210): 533–539
57. Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. (1994) Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of most Cell-Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class-I Molecules. *CELL* 78(5): 761–771
58. Grimm S, Höhn A, Grune T (2010) Oxidative protein damage and the proteasome. *Amino Acids* 42(1): 23-38. doi: 10.1007/s00726-010-0646-8
59. Kocaturk NM, Gozuacik D (2018) Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front Cell Dev Biol* 6: 128; 1–27
60. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* 65: 801–847
61. Scharlt M (2009) *Lehrbuch Biochemie*. Urban & Fischer in Elsevier, München
62. Peters JM (1994) Proteasomes - protein-degradation machines of the cell. *Trends in Biochemical Sciences* 19(9): 377–382
63. Groll M (2004) Strukturelle und funktionelle Zusammenhänge und Unterschiede archaeobakterieller und eukaryontischer 20S-Proteasome. Habilitationsschrift, Charité, Universitätsmedizin Berlin
64. Wada M, Kosaka M, Saito S et al. (1993) Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J. Lab. Clin. Med* 121(2): 215–223
65. Morales P, Kong M, Pizarro E et al. (2003) Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Human Reproduction* 18(5): 1010–1017
66. Mueller O, Anlasik T, Wiedemann J et al. (2011) Circulating Extracellular Proteasome in the Cerebrospinal Fluid: A Study on Concentration and Proteolytic Activity. *Journal of molecular neuroscience* 46(3): 509-15. doi: 10.1007/s12031-011-9631-2
67. Sixt SU, Dahlmann B (2008) Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1782(12): 817–823. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.06.005
68. Bonella F, Sixt S, Anlasik T et al. (2011) Extrazelluläres Proteasom in der BAL von Patienten mit Alveolarproteinose. *Pneumologie* 65 - P343. doi: 10.1055/s-0031-1272154
69. Rabl J, Smith DM, Yu Y et al. (2008) Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell* 30(3): 360–368. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.004
70. Groll M, Ditzel L, Lowe J et al. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *NATURE* 386(6624): 463–471

71. Klare N (2005) Strukturelle und biochemische Analyse der 20S-Proteasom-Subtypen aus humanen Zellen. Dissertation, Institut für Biochemie, Charité, Universitätsmedizin Berlin
72. Rivett AJ (1989) The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* 264(21): 12215–12219
73. Orłowski M (1990) The Multicatalytic Proteinase Complex, a Major Extralysosomal Proteolytic System. *BIOCHEMISTRY* 29(45): 10289–10297
74. Loidl G, Groll M, Musiol HJ et al. (1999) Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96(10): 5418–5422
75. Orłowski M, Wilk S (2000) Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383(1): 1–16
76. Luciani F, Keşmir C, Mishto M et al. (2005) A mathematical model of protein degradation by the proteasome. *Biophys. J* 88(4): 2422–2432. doi: 10.1529/biophysj.104.049221
77. Köhler A, Cascio P, Leggett DS et al. (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* 7(6): 1143–1152
78. Groll M, Bajorek M, Köhler A et al. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol* 7(11): 1062–1067. doi: 10.1038/80992
79. Liu C-w (2002) Conformational Remodeling of Proteasomal Substrates by PA700, the 19 S Regulatory Complex of the 26 S Proteasome. *Journal of biological chemistry* 277(30): 26815–26820. doi: 10.1074/jbc.M201782200
80. Adams GM, Crotchett B, Slaughter CA et al. (1998) Formation of Proteasome–PA700 Complexes Directly Correlates with Activation of Peptidase Activity. *Biochemistry* 37(37): 12927–12932. doi: 10.1021/bi981482i
81. Groll M, Bochtler M, Brandstetter H et al. (2005) Molecular Machines for Protein Degradation. *ChemBioChem* 6(2): 222–256. doi: 10.1002/cbic.200400313
82. Smith DM, Chang S-C, Park S et al. (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27(5): 731–744. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.033
83. Fabre B, Lambour T, Garrigues L et al. (2014) Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *J. Proteome Res.* 13(6): 3027–3037. doi: 10.1021/pr500193k
84. Ciechanover A (1994) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *CELL* 79(1): 13–21
85. Guo X, Huang X, Chen MJ (2017) Reversible phosphorylation of the 26S proteasome. *Protein Cell* 8(4): 255–272. doi: 10.1007/s13238-017-0382-x
86. Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3): 181–191. doi: 10.1038/nrm1052

87. Shang F, Taylor A (2011) Ubiquitin–proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 51(1): 5–16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.031
88. Aki M, Shimbara N, Takashina M et al. (1994) Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* 115(2): 257–269
89. Akiyama K, Yokota K, Kagawa S et al. (1994 Aug 26) cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* 265(5176): 1231–1234
90. Hisamatsu H, Shimbara N, SAITO Y et al. (1996 Apr 1) Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *Journal of Experimental Medicine* 183(4): 1807–1816
91. Llovera M, García-Martínez C, Agell N et al. (1997) TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 230(2): 238–241
92. Nelson JE, Loukissa A, Altschuller-Felberg C et al. (2000) Up-regulation of the proteasome subunit LMP7 in tissues of endotoxemic rats. *J. Lab. Clin. Med* 135(4): 324–331. doi: 10.1067/mlc.2000.105615
93. Angeles A, Fung G, Luo H (2012) Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 1904–1916
94. Chasan A, Kurts C, Burgdorf S (2009) Molekulare und zellbiologische Mechanismen der Kreuzpräsentation. *BIOspektrum* 15(6): 606–608
95. Strehl B, Textoris-Taube K, Jäkel S et al. (2008) Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *J. Biol. Chem.* 283(26): 17891–17897. doi: 10.1074/jbc.M710042200
96. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L et al. (2000) Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J. Mol. Biol* 303(5): 643–653. doi: 10.1006/jmbi.2000.4185
97. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL (1993) Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *NATURE* 365(6443): 264–267
98. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F et al. (2010) Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *CELL* 142(4): 613–624. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.036
99. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY et al. (2010 Dec 15) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alphabeta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochemical Journal* 432(3): 585–594
100. Pickering AM, Davies KJA (2012) Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alphabeta, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 523(2): 181–190. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.018
101. Cui Z, Hwang SM, Gomes AV (2014) Identification of the immunoproteasome as a novel regulator of skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 34(1): 96–109. doi: 10.1128/MCB.00622-13



102. Raynes R, Pomatto LCD, Davies KJA (2016) Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol. Aspects Med* 50: 41–55. doi: 10.1016/j.mam.2016.05.001
103. Aiken CT, Kaake RM, Wang X et al. (2011) Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 10(5): 6924,1-11. doi: 10.1074/mcp.M110.006924
104. Jung T, Grune T (2008) The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life* 60(11): 743–752. doi: 10.1002/iub.114
105. Jung T, Bader N, Grune T (2007) Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 462(2): 231–237. doi: 10.1016/j.abb.2007.01.030
106. Grune T, Merker K, Sandig G et al. (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305(3): 709–718
107. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ (1996) Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 271(26): 15504–15509
108. Pacifici RE, Salo DC, Davies KJ (1989) Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radic. Biol. Med* 7(5): 521–536
109. Castro JP, Reeg S, Botelho V et al. (2014) HSP90 cleavage associates with oxidized proteins accumulation after oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med* 75 Suppl 1: S24-5. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.743
110. Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82(2): 291–295
111. Briviba K (2008) Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin" (Oxidative stress and the possibilities of measuring it for environmental medicine: Report of the Commission "Methods and Quality Assurance in Environmental Medicine"). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 51(12): 1464–1482. doi: 10.1007/s00103-008-0720-5
112. Stadtman ER (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 797–821. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.004053
113. Mary J, Vouquier S, Picot CR et al. (2004) Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp. Gerontol.* 39(8): 1117–1123
114. Grune T, Klotz LO, Gieche J et al. (2001) Protein oxidation and proteolysis by the non-radical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med* 30(11): 1243–1253
115. Cabreiro F, Picot CR, Friguet B et al. (2006) Methionine sulfoxide reductases: relevance to aging and protection against oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067: 37–44. doi: 10.1196/annals.1354.006

116. Fernandes AP, Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6(1): 63–74. doi: 10.1089/152308604771978354
117. Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S et al. (2009) A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell* 33(4): 505–516. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020
118. Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O et al. (1998) Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J* 335 (Pt 3): 637–642
119. Wang X, Yen J, Kaiser P et al. (2010) Regulation of the 26S Proteasome Complex During Oxidative Stress. *Science Signaling* 3(151): ra88. doi: 10.1126/scisignal.2001232
120. Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83(3-4): 301–310
121. Höhn A, Weber D, Jung T et al. (2017) Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol* 11: 482–501. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.001
122. Ding Q, Keller JN (2001) Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *Journal of Neurochemistry* 77(4): 1010–1017. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00302.x
123. Squier TC (2006) Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. *Antioxid. Redox Signal* 8(1-2): 217–228. doi: 10.1089/ars.2006.8.217
124. Kästle M, Reeg S, Rogowska-Wrzesinska A et al. (2012) Chaperones, but not oxidized proteins, are ubiquitinated after oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med* 53(7): 1468–1477. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.039
125. Wigley C (1999) Dynamic Association of Proteasomal Machinery with the Centrosome. *The Journal of Cell Biology* 145(3): 481–490. doi: 10.1083/jcb.145.3.481
126. Wagner BJ, Margolis JW (1995) Age-dependent association of isolated bovine lens multicatalytic proteinase complex (proteasome) with heat-shock protein 90, an endogenous inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 323(2): 455–462. doi: 10.1006/abbi.1995.0067
127. Conconi M, Friguet B (1997 Mar) Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Molecular Biology Reports* 24(1-2): 45–50
128. Whittier JE, Xiong Y, Rechsteiner MC et al. (2004) Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem* 279(44): 46135–46142. doi: 10.1074/jbc.M406048200
129. Ramirez J, Schultz R, Dutton R (1963) Pulmonary Alveolar Proteinosis: A new Technique and Rationale for Treatment. *Arch Intern Med* 112: 419–431
130. Lowry OH (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry Baltimore*, 193(1):265-75.

131. Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal Of Biological Chemistry* (73(2)): 627–650
132. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *NATURE* 227(5259): 680–685. doi: 10.1038/227680a0
133. Dyballa N, Metzger S (2012) Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 893: 47–59. doi: 10.1007/978-1-61779-885-6\_4
134. Kang DH, Gho YS, Suh MK et al. (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*(23(11)): 1511–1512
135. Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC et al. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 203(1): 173–179
136. Squires G (1998) Francis Aston and the mass spectrograph. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*(23): 3893–3900. doi: 10.1039/a804629h
137. Wilm M, Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem* 68(1): 1–8
138. Lottspeich F, Engels JW (2006) *Bioanalytik*, 2nd edn. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg
139. Roepstorff P, Fohlman J (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom* 11(11): 601. doi: 10.1002/bms.1200111109
140. Eggers M, Boes-Fabian B, Ruppert T et al. (1995) The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med* 182(6): 1865–1870
141. Ossendorp F, Eggers M, Neisig A et al. (1996) A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 5(2): 115–124
142. Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U et al. (1998) The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J. Exp. Med* 188(6): 1017–1028
143. Matthews W, Driscoll J, Tanaka K et al. (1989) Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86(8): 2597–2601
144. Granvogel B (2008) *Entwicklung neuer Methoden zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Membranproteinen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
145. Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem* 272(33): 20313–20316
146. Sun G, Anderson VE (2004) Prevention of artifactual protein oxidation generated during sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis. *Electrophoresis* 25(7-8): 959–965. doi: 10.1002/elps.200305800

147. Orłowski M, Cardozo C, Michaud C (1993) Evidence for The Presence of 5 Distinct Proteolytic Components in the Pituitary Multicatalytic Proteinase Complex - Properties of 2 Components Cleaving Bonds on the Carboxyl Side of Branched-Chain and Small Neutral Amino-Acids. *Biochemistry* 32(6): 1563–1572
148. Farout L, Lamare MC, Cardozo C et al. (2000) Distribution of proteasomes and of the five proteolytic activities in rat tissues. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 374(2): 207–212
149. Arendt CS, Hochstrasser M (1997) Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 94(14): 7156–7161
150. Groll M, Huber R (2003) Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35(5): 606–616
151. Goldberg AL, Cascio P, Saric T et al. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol* 39(3-4): 147–164
152. Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W et al. (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95(21): 12504–12509
153. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D et al. (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 24(1): 55–99. doi: 10.1002/mas.20006
154. Vogt W (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med* 18(1): 93–105
155. Pennington MW, Byrnes ME (1995) Evaluation of TiCl<sub>4</sub>-mediated reduction of methionine sulfoxide in peptides with oxidizable or reducible residues. *Peptide research* 8(1): 39–43
156. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1-2): 23–38
157. Levine R. L, Mosoni L, Berlett B S et al. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93(26): 15036–15040
158. Hoshi T, Heinemann S (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol (Lond)* 531(Pt 1): 1–11
159. Wang G, Umstead TM, Phelps DS et al. (2002) The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production. *Environ. Health Perspect* 110(1): 79–84
160. Gohlke S, Kloss A, Tsokos M et al. (2014) Adult human liver contains intermediate-type proteasomes with different enzymatic properties. *Ann Hepatol* 13(4): 429–438
161. Sixt SU (2014) Die Bedeutung des extrazellulären Proteasomsystems beim kritisch Kranken. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

162. Zoeger A, Blau M, Egerer K et al. (2006) Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin. Chem* 52(11): 2079–2086. doi: 10.1373/clinchem.2006.072496
163. Büren C (2016) Die Rolle des 20S Proteasoms in Bezug auf den Abbau pulmonaler Proteine und in der Pathogenese des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Dissertationsschrift, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
164. Rivett AJ (1985) Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J. Biol. Chem* 260(23): 12600–12606
165. Mazaheri M, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA et al. (2015) Curcumin mitigates the fibrillation of human serum albumin and diminishes the formation of reactive oxygen species. *Protein Pept Lett* 22(4): 348–353
166. Juárez J, Taboada P, Mosquera V (2009) Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophys. J* 96(6): 2353–2370. doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3901
167. Wenzel T, Baumeister W (1995) Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 2(3): 199–204
168. Wilkinson B, Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics* 1699(1-2): 35–44
169. Fagioli C (2001) Reduction of Interchain Disulfide Bonds Precedes the Dislocation of Ig-micro Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol for Proteasomal Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 276(44): 40962–40967. doi: 10.1074/jbc.M107456200
170. Turano C, Coppari S, Altieri F et al. (2002) Proteins of the PDI family: Unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell. Physiol.* 193(2): 154–163. doi: 10.1002/jcp.10172
171. Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S et al. (2008) Roles of Oxidants and Redox Signaling in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Antioxidants & Redox Signaling* 10(4): 739–754. doi: 10.1089/ars.2007.1940
172. Finch JW, Crouch RK, Knapp DR et al. (1993) Mass spectrometric identification of modifications to human serum albumin treated with hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys* 305(2): 595–599. doi: 10.1006/abbi.1993.1466
173. Davies KJ, Lin SW (1988) Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 5(4): 215–223
174. Grune T, Merker K, Sandig G et al. (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305(3): 709–718
175. Pacifici RE, Kono Y, Davies KJ (1993) Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 268(21): 15405–15411

176. Lasch P (2000) Hydrogen Peroxide-induced Structural Alterations of RNase A. *Journal of Biological Chemistry* 276(12): 9492–9502. doi: 10.1074/jbc.M008528200
177. Kurepa J, Smalle JA (2008) To misfold or to lose structure?: Detection and degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Plant Signal Behav* 3(6): 386–388
178. Ferrington DA, Sun H, Murray KK et al. (2001) Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem* 276(2): 937–943. doi: 10.1074/jbc.M005356200
179. Asher G, Reuven N, Shaul Y (2006) 20S proteasomes and protein degradation “by default”. *Bioessays* 28(8): 844–849. doi: 10.1002/bies.20447
180. Jeganathan S, Bergen M von, Mandelkow E-M et al. (2008) The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* 47(40): 10526–10539. doi: 10.1021/bi800783d
181. Dorval V, Fraser PE (2006) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem* 281(15): 9919–9924. doi: 10.1074/jbc.M510127200
182. Stuart GR, Sim RB, Malhotra R (1996 Jul-Aug) Characterization of radioiodinated lung surfactant protein A (SP-A) and the effects of oxidation on SP-A quaternary structure and activity. *Experimental Lung Research* 22(4): 467–487
183. Picard D (2002 Oct) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular & Molecular Life Sciences* 59(10): 1640–1648
184. Walmrath D (2000) Das alveoläre Surfactantsystem, seine pathogenetische Bedeutung für das akute Lungenversagen (ARDS) und therapeutische Perspektiven. *Intensivmedizin und Notfallmedizin Band* 37(4): 307–317
185. Kratzer E, Tian Y, Sarich N et al. (2012) Oxidative Stress Contributes to Lung Injury and Barrier Dysfunction via Microtubule Destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47(5): 688–697. doi: 10.1165/rcmb.2012-0161OC
186. Tran HB, Ahern J, Hodge G et al. (2014) Oxidative stress decreases functional airway mannose binding lectin in COPD. *PLoS ONE* 9(6): e98571. doi: 10.1371/journal.pone.0098571
187. Sixt S, Rastan A, Schwarzwald U et al. (2008) Long term outcome after balloon angioplasty and stenting of subclavian artery obstruction: a single centre experience. *Vasa* 37(2): 174–182

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ultrastruktur des 20S Proteasoms.....	5
Abb. 2:	Häufigkeitsverteilung der Peptidlänge proteasomaler Verdauungsprodukte.....	6
Abb. 3:	Formen des Immunoproteasoms.....	8
Abb. 4:	Stadieneinteilung der Proteinoxidation .....	10
Abb. 5:	Schematische Übersicht der intrazellulären Abbauwege von Proteinen .....	11
Abb. 6:	Funktionsprinzip der Größenausschlusszentrifugation.....	17
Abb. 7:	Funktionsprinzip des Enzymassays zur Messung der Proteasom-Aktivität.....	18
Abb. 8:	Aufbau des Massenspektrometers QSTAR XL.....	25
Abb. 9:	Funktionsprinzip des Elektrospray-Ionisations-Prozesses (ESI-Prozess).....	26
Abb. 10:	Funktionsprinzip des Massenspektrometers QSTAR XL zur Aufnahme eines Übersichtsspektrums.....	27
Abb. 11:	Massenspektrum zur Bestimmung der Peptidmasse anhand des Isotopenmusters.....	28
Abb. 12:	Funktionsprinzip des Massenspektrometers QSTAR XL zur Aufnahme eines MS-MS-Fragmentspektrums .....	30
Abb. 13:	Nomenklatur für Peptidfragmente aus massenspektrometrischen Analysen.....	30
Abb. 14:	Arbeitsablauf der massenspektrometrischen Proteinanalyse.....	32
Abb. 15:	Arbeitsablauf zur Charakterisierung der PAP-BALF WLL48 .....	34
Abb. 16:	1D-Elektrophorese-Gel der PAP-BALF WLL48 .....	34
Abb. 17:	MS-Spektrum der Bande „30“ aus dem Elektrophoresegel der PAP-BALF WLL48 .....	35
Abb. 18:	MS/MS-Fragmentspektrum aus der PAP-BALF WLL48 .....	36
Abb. 19:	Fluoreszenz nach Inkubation des fluorogenen Peptids Z-LLE-AMC mit verschieden stark verdünnter Proteasompräparation h-Ery .....	40
Abb. 20:	Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Charge 1) in Abhängigkeit vom Enzym-Substrat-Verhältnis .....	42
Abb. 21:	Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Chargen 1-3).....	43
Abb. 22:	Spezifische chymotrypsinartige Aktivität der PAP-BALF WLL48 in Abhängigkeit der BALF-Verdünnung und der Inkubationszeit .....	46
Abb. 23:	Spezifische Aktivitäten der PAP-BALF WLL48 in Abhängigkeit der BALF-Verdünnung.....	46
Abb. 24:	Struktur von Insulin.....	48

Abb. 25:	MS-Übersichtsspektren der Kontrollansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin .....	49
Abb. 26:	MS-Übersichtsspektren der Versuchsansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin .....	51
Abb. 27:	Schnittkarte der Insulin B-Kette .....	55
Abb. 28:	Längenverteilung der Verdauprodukte des Insulins .....	56
Abb. 29:	MS-Übersichtsspektren von nativem HSA .....	57
Abb. 30:	MS-Dekonvolutionsspektrum von nativem HSA .....	58
Abb. 31:	MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses der Vorbehandlung auf HSA .....	60
Abb. 32:	Arbeitsablauf zur Untersuchung des Einflusses von Proteinoxidation und Hsp90 auf den Verdau von HSA und 20S Proteasom .....	65
Abb. 33:	MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses unterschiedlich starker Oxidation auf HSA .....	66
Abb. 34:	MS-Übersichtsspektren zur Darstellung des Einflusses der Aufreinigung von oxidiertem HSA durch Größenausschlusszentrifugation .....	67
Abb. 35:	Schnittkarte von HSA nach dem Verdau durch 20S Proteasom .....	74
Abb. 36:	Spezifische Aktivitäten von erythrozytärem Proteasom im Vergleich zu alveolärem Proteasom bei PAP .....	90
Abb. 37:	Abhängigkeit der proteasomalen Degradation vom Grad der Substratoxidation (Abbildung in Anlehnung an [104]) .....	101
Abb. 38:	Einfluss von Hsp90 auf den proteasomalen Verdau von oxidiertem Calmodulin (Abbildung in Anlehnung an [123]) .....	104



### 5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des HEPES-Puffers .....	14
Tabelle 2:	Zusammensetzung des TEAD-Puffers .....	14
Tabelle 3:	Zusammensetzung des TRIS-Puffers .....	14
Tabelle 4:	Reagenzien für den Assay nach Lowry .....	17
Tabelle 5:	Fluorogene Testsubstrate zur Messung der enzymatischen Aktivität von Proteasom .....	19
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Stopp-Lösung für den Enzymassay zur Messung der Proteasom-Aktivität .....	19
Tabelle 7:	Reagenzien für den In-Gel-Verdau.....	22
Tabelle 8:	Massenspektrometrisch identifizierte Peptide aus der PAP-BALF WLL48. ....	36
Tabelle 9:	Massenspektrometrisch identifiziert Proteine aus der PAP-BALF WLL48 .....	38
Tabelle 10:	Konzentrationen der Proteasom-Präparation h-Ery vor und nach Dialyse.....	39
Tabelle 11:	Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses des Enzym-Substrat-Verhältnisses auf die caspaseartige Aktivität der Proteasompräparation h-Ery .....	39
Tabelle 12:	Versuchsbedingungen zur Quantifizierung der drei enzymatischen Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery .....	41
Tabelle 13:	Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery (Chargen 1-3).....	43
Tabelle 14:	Versuchsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses des Enzym-Substrat-Verhältnisses und der Inkubationszeit auf die chymotrypsinartige Aktivität der PAP-BALF WLL48 .....	45
Tabelle 15:	Versuchsansätze zum proteasomalen Verdau von Insulin.....	49
Tabelle 16:	Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von nativem Insulin mit und ohne DTT-Zugabe .....	50
Tabelle 17:	Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von Insulin in Anwesenheit von DTT mit und ohne 20S Proteasom-Zugabe .....	51
Tabelle 18:	Theoretische Schnittstellen der drei klassischen Aktivitäten des Proteasoms.....	54
Tabelle 19:	Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Untersuchung von nativem HSA .....	58
Tabelle 20:	Makroskopische Strukturveränderungen von gelöstem HSA in Abhängigkeit von Temperatur, DTT-Konzentration und Pufferlösung .....	59
Tabelle 21:	Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale von HSA in Abhängigkeit von Temperatur und DTT-Konzentration.....	61

Tabelle 22: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale von HSA nach Hitze-Denaturierung und Oxidation (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in Abhängigkeit der Inkubationszeit .....	62
Tabelle 23: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Untersuchung von HSA nach Vorbehandlung unter stark denaturierenden Bedingungen .....	63
Tabelle 24: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale aus der Inkubation von unterschiedlich vorbehandeltem HSA mit 20S Proteasom (Verdau) und ohne 20S Proteasom (Kontrolle) .....	64
Tabelle 25: Massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewichte von HSA in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung mittels H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	66
Tabelle 26: Versuchsansätze zum Verdau von HSA durch 20S Proteasom .....	68
Tabelle 27: Massenspektrometrisch ermittelte Signale aus der Inkubation von HSA in An- und Abwesenheit von 20S Proteasom in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung und der An- bzw. Abwesenheit von Hsp90 nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C (Ansätze 1.1-3.3) .....	69
Tabelle 28: Anzahl massenspektrometrisch ermittelter Signale aus der Inkubation von HSA in An- und Abwesenheit von 20S Proteasom in Abhängigkeit der oxidativen Vorbehandlung und der An- bzw. Abwesenheit von Hsp90 nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C .....	71
Tabelle 29: Massenspektrometrisch identifizierte Peptide und Schnittstellen aus dem Verdau von oxidiertem HSA durch 20S Proteasom .....	74
Tabelle 30: Spezifische enzymatische Aktivitäten der Proteasompräparation h-Ery beim Verdau fluorogener Testpeptide im Vergleich mit Literaturwerten .....	85
Tabelle 31: Spezifische enzymatische Aktivitäten einer exemplarischen PAP-BALF beim Verdau fluorogener Testpeptide im Vergleich mit Literaturwerten .....	87
Tabelle 32: Schnittstellen des 20S Proteasoms beim Verdau der Insulin B-Kette .....	92

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mich auf meinem akademischen Weg unterstützend begleitet haben.

Ich danke dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen, für die Möglichkeit an seiner Klinik zu forschen.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Stephan Sixt, dem Initiator meines Forschungsprojektes, der viele Ideen und Inspirationen lieferte.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer gebührt großer Dank für ihren guten Zuspruch und ihre geduldige Begleitung, die stets von wertschätzender konstruktiver Kritik geprägt war. Danke für Dein anhaltendes Vertrauen und Zutrauen in mich und meine Arbeit.

Danke an die Kollegen und das Team im Labor. Besonderer Dank gebührt Frau Dr. rer. nat. Sabine Metzger. Sie war meine Lehrerin und Motivatorin während der achtmonatigen Experimentalphase im Biologisch Medizinischen Forschungszentrum. Liebe Sabine, vielen Dank für die vielen guten und offenen Worte. Du gabst mir nicht nur Anschub und große gestalterische Freiheit, sondern auch eine versöhnliche Stütze und neue Motivation, wenn mal wieder einer meiner akribisch durchdachten geistigen Höhenflüge im Abfalleimer für erfolglose Experimente landete und meine Moral drohte hinterher zu wandern. Danke für Deine Freundschaft.

Außerordentlicher Dank gebührt meiner Familie. Allen voran meinen Eltern, die mit großem Zutrauen und uneingeschränkter Unterstützung all die Jahre den Wunsch nach einem guten Ausgang mit Glück und Erfolg aufrecht erhalten haben. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Meinen Schwiegereltern danke ich herzlich fürs Mitfiebern und fürs Babysitting.

In herausragendem Maß danke ich meiner Frau Sarah. Ich habe manches bewusst von Dir erbeten und manches unbewusst vorausgesetzt, was beileibe nicht selbstverständlich ist. Vor allem während des zehrenden Schreib- und Abgabeprozesses hast Du mich an den entscheidenden Wendepunkten in überragender Weise gehalten, meine Launen geduldet und unersetzliche Hilfen gegeben.

Meinem Freund Michael Winter und seiner Frau Karen verdanke ich zwei Monate Obdach mit Schreibtisch, Bett und warmem Essen, sowie Familienanschluss, der mir half den Kontakt an die Lebensrealität nicht zu verlieren. All meinen Freunden, namentlich seien hier Jakob Frey und Tatjana Schenk erwähnt, danke ich für ihre Zuwendung, ihr Dasein und die Geduld mich anzuhören.

An den Punkten, an denen ich nicht klar war, wie und ob es mit meinem Promotionsprojekt weitergeht gab es Gott sei Dank eherne Leuchttürme, die mir halfen auf dem Weg zu bleiben. Allen voran Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Winter, dem es gelang, meinen Glauben an mich als Wissenschaftler und an meine Doktorarbeit wiederzubeleben. Ebenso an die Medical Research School Düsseldorf, namentlich Frau Olympia Grazia Glomb, die mit mir mitfieberte und mir mehrfach Wege aufzeigte, wo es für mich keine mehr zu geben schien. Meinem Chefarzt Herrn Dr. med. Stephan Oehmen gebührt Dank für sein väterliches Verständnis und den Raum, den er mir für die Realisierung der Promotion eingeräumt hat.

Dr. rer. nat. Daniel Schlieper und Mirjam Stammer haben diese Arbeit Buchstaben für Buchstaben gelesen. Danke für Euer Mitdenken und Euer schnelles und hochwertiges Feedback. Danke auch an einen weiteren wissenschaftlichen Berater für seine fachliche Expertise und unkomplizierte Hilfsbereitschaft.