

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

Extrazelluläres alveoläres 20S Proteasom in der
bronchoalveolären Lavage und im Plasma von
Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose

Dissertation

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

vorgelegt von

Matthias Schmidt

(2019)

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

gez.:

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

Erstgutachter: PD Dr. med. Stephan Sixt

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hug Aubin

für S.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bonella, F., Sixt, S.U., Thomassen, J., Schmidt, M., Cai, M.,
Mori, T., Guzman, J., Costabel, U. (2015)

*Extracellular 20S proteasome in BAL and serum of patients
with alveolar proteinosis*

Immunobiology 220, (3): 382-388

Zusammenfassung

Proteasomen sind komplexe Proteine mit enzymatischer Aktivität, die maßgeblich in den Abbau zellulärer Proteine involviert sind. Einzelne Unterformen bauen dabei spezifische Substrate ab.

Neuere Studien zeigen, dass das 20S Proteasom nicht nur intrazellulär existiert, sondern auch über spezifische Transportmechanismen in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Eine Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen konnte nachgewiesen werden und spezifische Proteasomenhemmer werden bereits therapeutisch genutzt.

Bei der pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) kommt es, verursacht durch eine gestörte Interaktion der Alveolarmakrophagen mit dem *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, zu einer Akkumulation von Surfactantproteinen in den Alveolen, was sich klinisch meist durch eine respiratorische Insuffizienz zeigt. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, inwiefern das extrazelluläre 20S Proteasom am Abbau der pathologisch erhöhten alveolären Proteine im Rahmen der PAP beteiligt ist. Dazu wurde zum einen der quantitative Nachweis des extrazellulären 20S Proteasoms mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Serum von PAP-Patienten (n=31) im Vergleich zu einer ebenfalls lungenkranken (COPD) Gruppe (n=14) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=18) analysiert. Zum anderen wurde die Enzymaktivität der drei katalytischen Zentren des 20S Proteasoms durch Spektralphotometrie fluorogener Substrate in Bezug auf die Krankheitsaktivität und das Rauchverhalten der Probanden untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die Proteasomkonzentration in der BAL bei PAP-Patienten im Vergleich zu den beiden Vergleichsgruppen bis auf das zehnfache erhöht war. In den Serumproben wurden sowohl bei den PAP- als auch bei den COPD-Patienten erhöhte Proteasomkonzentrationen gegenüber den gesunden Kontrollen gemessen. Hierbei wirkte Rauchen als verstärkender Faktor. Die Serum-Proteasomkonzentrationen korrelierten signifikant positiv mit der Krankheitsaktivität. Die Enzymaktivität in der BAL von PAP-Patienten wies, verglichen mit den gesunden Kontrollen, ebenfalls signifikant erhöhte Messwerte auf. Die Proteasomkonzentration zeigte sowohl mit der Enzymaktivität als auch mit der Schwere der respiratorischen Dysfunktion in der Lungenfunktionsprüfung eine positive Korrelation.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der PAP sowohl eine Hochregulation der Konzentration als auch der Enzymaktivität erfolgt. Die Sekretion des 20S Proteasoms in den Alveolarraum scheint eine spezifische Reaktion des Organismus zum Abbau der pathologisch erhöhten Proteinkonzentrationen in der Lunge zu sein. Das 20S Proteasom ist somit als möglicher Marker für die Beurteilung der Krankheitsaktivität und den Therapieverlauf der PAP einsetzbar. Ebenso bieten diese Erkenntnisse einen potenten Ansatzpunkt für zukünftige Therapiekonzepte, beispielsweise als inhalatives Proteasom zur Unterstützung des Proteinabbaus bei der PAP. Hier sind weitere Studien notwendig.

Summary

Proteasomes are complex proteins with enzymatic activity relevantly involved in the degradation of cellular proteins. Thereby diverse subunits degrade specific substrates.

Recent studies showed that 20S proteasome is not only intracellularly located but is secreted by specific transport mechanisms into the extracellular space.

A role in the pathophysiology of different diseases has been described and proteasome inhibitors are already used therapeutically.

Pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is characterized by an impaired interaction of alveolar macrophages with granulocyte-macrophage colony stimulating factor leading to an accumulation of surfactant proteins in the alveoli, which precipitates a respiratory insufficiency.

The central issue of this paper is to what extent the extracellular 20S proteasome is involved in the degradation of the pathologically increased alveolar proteins in PAP. To study this, we analyzed the quantitative amount of the 20S proteasome in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and in the serum of PAP patients (n=31) vs. a diseased control (COPD) group (n=14) vs. a healthy control group (n=18) with enzyme-linked immunosorbent assay. Furthermore, we examined the enzyme activity of the three catalytic centers of the 20S proteasome by using fluorogenic substrate cleavage and matched the results with the disease activity and smoking habits.

We could show that the 20S proteasome concentration in the BAL of PAP patients was increased up to ten times compared to both control groups. In the serum samples elevated proteasome concentration was found within the PAP as well as in COPD patients compared to the healthy subjects. Smoking acted as an amplifying factor. The serum concentration significantly positively correlated with the disease activity.

The enzyme activity in BAL of PAP patients was likewise significantly elevated compared to the healthy control. The proteasome concentration showed a positive correlation with the enzyme activity as well as with the severity of respiratory dysfunction measured with body plethysmography.

These results show that both enzyme concentration and activity are upregulated in the PAP. This leads to the assumption that secretion of the 20S proteasome into the alveolar space serves as a specific reaction of the organism to clear the pathologically increased protein concentration in the lung.

In conclusion, the 20S proteasome could possibly be used as a marker for the evaluation of the disease activity and the therapeutic process of PAP. These findings offer a potent approach for future therapies, e.g. inhalation of proteasome, to aid protein degradation in PAP. Here, further investigations are essential.

Abkürzungen

AaDO₂	alveolo-arterielle Druckdifferenz	kDA	Kilodalton
ABCA 3	<i>ATP-binding cassette transporter</i>	LDH	Laktatdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat	LMP	<i>low molecular mass protein</i>
AK	Antikörper	LPS	Lipopolysaccharide
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin	MECL	<i>multicatalytic endopeptidase complex like</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ATP	Adenosintriphosphat	NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light- chain-enhancer</i>
BGA	Blutgasanalyse	ns	nicht signifikant
BMI	<i>body mass index</i>	O₂	Sauerstoff
BSA	Bovines Serumalbumin	PaO₂	Sauerstoffpartialdruck
ChTr	Chymotrypsin	PAP	Pulmonale alveoläre Proteinose
CO	Kohlenmonoxid	PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DLCO	<i>diffusing capacity of the lung for carbon monoxide</i>	PEG	Polyethylenglycol
DMSO	Dimethylsulfoxid	pkat	picokatal
E	Enzym	SA	Standardabweichung
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	TCA	Trichloressigsäure
FEV 1	forcierte Einsekundenkapazität	TLCO	<i>transfer factor of the lung for carbon monoxide</i>
FVC	forcierte Vitalkapazität	TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
g	Kraft	Try	Trypsin
GK	gesunde Kontrolle	TTF 1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>	UPS	Ubiquitin Proteasomen System
H₂SO₄	Schwefelsäure	WLL	<i>whole lung lavage</i>
Ig	Immunglobulin		
INF-γ	Interferon gamma		
KK	krankte Kontrolle		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungen.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Proteasomensystem	1
1.2 Aufbau der Proteasomen	3
1.2.1 Aufbau des 20S Proteasoms.....	3
1.2.2 Aufbau des 26S Proteasoms.....	5
1.2.3 Weitere Formen des 20S Proteasoms	9
1.3 Vorkommen von Proteasomen.....	11
1.3.1 Das intrazelluläre Proteasom	11
1.3.2 Das extrazelluläre Proteasom	11
1.4 Ausschleusung des 20S Proteasom in den extrazellulären Raum – Die Rolle von extrazellulären Vesikeln	13
1.5 Hemmung des Proteasoms.....	15
1.6 PAP - Pulmonale alveoläre Proteinose	19
1.6.1 Definition und Epidemiologie.....	19
1.6.2 Pathogenese und Einteilung	20
1.6.3 Diagnose	22
1.6.4 Therapie	25
1.6.5 Prognose	27
1.7 Ziele der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Studienkohorte	29
2.2 Bronchoalveoläre Lavage.....	31
2.3 Messung der Konzentration des 20S Proteasoms mittels ELISA.....	31
2.4 Bestimmung der Enzymaktivität	33
2.5 Messung der Proteinkonzentration nach Lowry	34
2.6 Lungenfunktionsprüfung und Blutgasanalyse.....	35
2.7 Diffusionskapazität der Lunge	35
2.8 Statistik.....	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Patientenkohorte	38
3.2	Proteinkonzentration	40
3.3	Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL	40
3.4	Konzentration des 20S Proteasoms im Serum	44
3.5	Enzymaktivität des 20S Proteasoms in der BAL	47
3.6	Lungenfunktionstest und Blutgasanalyse	51
4	Diskussion	53
4.1	Ursprung des extrazellulären 20S Proteasoms	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse	55
4.2.1	Proteinkonzentrationen in den BAL-Proben von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose und Lungengesunden	55
4.2.2	Erhöhte Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL von PAP-Patienten	56
4.2.3	Nachweis hoher Serum-Konzentrationen des 20S Proteasoms	57
4.2.4	Hohe Enzymaktivität in der BAL bei PAP-Patienten	59
4.2.5	Funktion des Proteasoms bei der PAP: Proteinabbau?	61
4.3	Variabilität der Proteasomkonzentrationen bei Gesunden in der Literatur	62
4.4	Limitationen	63
4.4.1	Studienpopulation	63
4.4.2	Nachweis unterschiedlicher Proteasom-Formen	64
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	64
	Literatur- und Quellenverzeichnis	67
	Abbildungsverzeichnis	75
	Tabellenverzeichnis	76
	Danksagung	77

1 Einleitung

1.1 Das Proteasomensystem

Proteasomen sind komplex aufgebaute Proteine mit enzymatischer Aktivität, die maßgeblich am Abbau von zellulären Proteinen beteiligt sind. Somit nehmen sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ein (Coux et al., 1996; Dahlmann, 2016; Rivett, 1993; Rock et al., 1994).

Der menschliche Organismus unterliegt auf zellulärer Ebene einem ständig andauernden Prozess der Regeneration. Konstant werden notwendige Proteine neu synthetisiert und unbrauchbare, sowie defekte oder fehlgefaltete Proteine abgebaut. Dabei stellen die Proteasomen neben den Lysosomen eine bedeutende funktionelle Gruppe dar (Dahlmann, 2016; Rock et al., 1994).

Lysosomen enthalten verschiedene Proteasen, die in saurem Milieu aktiviert werden. Sie verdauen jegliches Substrat, das von ihnen aufgenommen wurde (Dice et al., 1990). Im Gegensatz zu den lysosomalen Proteasen baut das Proteasom, abhängig von dessen Unterform, ganz spezifische Substrate ab. Außerdem dissoziiert das Proteasom nicht nach jedem Schnittvorgang, sondern bleibt an das Substrat gebunden und schneidet mehrfach hintereinander. Daraus resultieren insgesamt kleinere Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von acht bis zwölf Aminosäuren (Dahlmann, 2016; Kisselev et al., 1999; Luciani et al., 2005).

Durch die Degradation von Proteinen beeinflussen Proteasomen verschiedene physiologische Vorgänge. So sind sie zum Beispiel an der Steuerung des Zellzyklus durch die Interaktion mit regulatorischen Proteinen beteiligt (Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1998; Takeuchi and Toh-e, 1997). Die generierten Oligopeptide dienen außerdem der Antigenpräsentation mittels *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-I-Moleküle, wodurch sie eine wichtige Aufgabe bei der Modulation der Immunantwort einnehmen (Gaczynska et al., 1993). Ein Zusammenhang bezüglich der Funktion des Proteasomensystems konnte auch bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Alzheimer (de Diego-García et

al., 2017; Fergusson et al., 1996), Parkinson (Kwak et al., 1991) und Tumorerkrankungen (Wada et al., 1993) nachgewiesen werden.

Eine kürzlich publizierte Studie verdeutlichte die Zusammenhänge der neuroprotektiven Effekte des Proteasoms bei neuropathologischen Erkrankungen wie Neuroinflammation, oxidativem Stress und neurodegenerativen Erkrankungen. Diese Erkrankungen gehen meist einher mit der Akkumulation einer Vielzahl fehlgefalteter intrazellulärer Proteine (de Diego-García et al., 2017). Die Arbeitsgruppe von Garcia konnte nachweisen, dass extrazelluläre Nukleotide, wie sie bei Pathologien des zentralen Nervensystems freigesetzt werden, durch die Aktivierung des sogenannten P2Y₂-Rezeptors in hohem Maße das Ubiquitin-Proteasom-System aktivieren. Infolgedessen konnte eine Hochregulierung der Enzymaktivität des Proteasoms, vermittelt durch verstärkte Expression der β_1 -Untereinheiten und der β_5 -Untereinheiten, beobachtet werden. Diese physiologische Reaktion ist der Versuch des menschlichen Organismus, die pathologisch erhöhten intrazellulären Proteine abzubauen (de Diego-García et al., 2017).

Welchen Anteil Proteasomen bei anderen Krankheiten haben, die durch eine Akkumulation von Proteinen gekennzeichnet sind, wird zunehmend erforscht.

Es existieren verschiedene Proteasomen, welche zum Teil einzeln vorkommen oder in Komplexen interagieren. Bezeichnet werden die Proteasomen nach ihrer Sedimentationskonstante in Svedberg Einheiten (S) (Ciechanover, 1998).

Man unterscheidet übergeordnet abhängig von der Funktionsweise ein energieverbrauchendes, Adenosintriphosphat-(ATP)-Ubiquitin-abhängiges Proteasomensystem (UPS) von einem System, das ATP-Ubiquitin-unabhängig ist. Bei letzterem erfolgt der Proteinabbau durch das 20S Proteasom allein (Asher et al., 2006). Im Zentrum des UPS hingegen steht das 26S Proteasom, das ein Komplex aus einem 20S Proteasom mit zwei verbundenen regulatorischen 19S Kappen ist. Das Ubiquitin reguliert dabei den Proteinabbau, indem es die entsprechenden Proteine in Abhängigkeit von ATP markiert und diese somit für das 26S Proteasom zugänglich macht (Ciechanover, 1998). Innerhalb dieser zwei

Gruppen existieren unterschiedliche Subtypen von Proteasomen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Untergruppen unterscheiden, was die enzymatischen Eigenschaften sowie die abgebauten Substrate beeinflusst (Dahlmann, 2016). Auf sie wird an späterer Stelle noch einmal eingegangen.

1.2 Aufbau der Proteasomen

1.2.1 Aufbau des 20S Proteasoms

Wie bereits beschrieben kommt das 20S Proteasom, welches auch als *constitutive 20S* oder *core particle* bezeichnet wird, solitär oder als Komplex mit anderen Proteasomen vor. Es hat eine zylindrische Form und eine Größe von etwa 700 kDa (Kilodalton) (Coux et al., 1996; Kopp et al., 1993, 1997). Geformt wird dieser Zylinder aus vier Ringen, welche sich wiederum aus sieben Proteinuntereinheiten zusammensetzen. Dabei bestehen die beiden äußeren Ringe aus je sieben alpha (α 1- α 7)-Untereinheiten und die beiden in der Mitte gelegenen Ringe aus je sieben beta (β 1- β 7)-Untereinheiten (Kloetzel, 2001; Kopp et al., 1997) (Abb. 1).

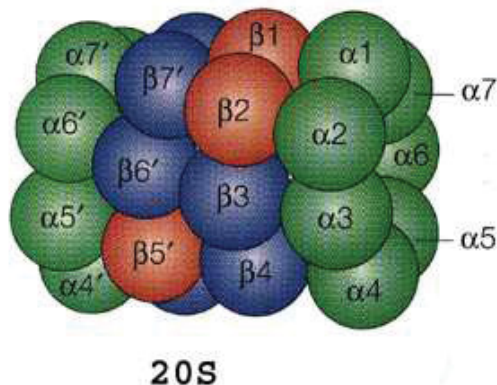


Abb. 1: Aufbau des 20S Proteasoms

Dargestellt ist eine schematische Grafik des 20S Proteasoms. Zu erkennen die alpha- und beta-Untereinheiten des 20 S Proteasom in entsprechender Anordnung. Modifiziert nach Kloetzel (Kloetzel, 2001).

Die α -Untereinheiten bilden mit Hilfe von ineinandergreifenden amino-terminalen Segmenten einen Verschluss des Zylinders zu beiden Seiten aus. Diese

Eigenschaft bietet einen Schutz der Zelle vor unkontrolliertem Abbau von Proteinen durch das Proteasom (Groll et al., 2000; Jung et al., 2009). Wird das Proteasom aktiviert, so kommt es mittels einer Konformationsänderung der α -Untereinheiten zu einer Erweiterung des Ringes und die Proteine können in das Proteasom hineingelangen. Dieser bei Lysosomen ähnlich vorbeschriebene Mechanismus zum Schutz der Zelle vor Autolyse wird auch Selbstkompartimentierung genannt (Baumeister et al., 1998; Lupas et al., 1997). Die oben beschriebene Konformationsänderung der α -Untereinheiten wird zum einen erreicht durch die Bindung von regulatorischen Kappen wie der 11S- und der 19S-Einheit, was eine Steigerung der Enzymaktivität um das bis zu 100-fache bewirken kann (Chu-Ping et al., 1994; DeMartino et al., 1994). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass fehlgefaltete Proteine auch ohne die vorherige Aktivierung durch die regulatorischen Kappen, über die Interaktion mit den α -Untereinheiten, in das Proteasom gelangen können, wo sie anschließend verdaut werden (Liu et al., 2003). Insbesondere durch oxidativen Stress, der unter anderem Fehlfaltungen induziert, werden hydrophobe Regionen in den Proteinen freigelegt, die direkt mit dem Proteasom interagieren können (Shringarpure et al., 2001). Ein weiterer Ubiquitin-unabhängiger Mechanismus zur Erkennung von Proteinen durch das 20S Proteasom ist der durch Oxidation verursachte Verlust der Sekundärstrukturen. So konnte im in vitro-Versuchsansatz mit Calmodulin-Molekülen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Abnahme von Sekundärstrukturen der Proteine und der Zunahme der Ubiquitin-unabhängigen Degradation des Calmodulin durch das 20S Proteasom nachgewiesen werden (Ferrington et al., 2001). Zusätzlich konnten in früheren Arbeiten mit Hilfe eines Elektronenmikroskopes seitliche Öffnungen am 20S Proteasom nachgewiesen werden. Durch diese sogenannten *side windows* können kleine entfaltete Peptide in den katalytischen Zylinder gelangen (Groll et al., 1997).

Die β -Untereinheiten bilden auf der Innenseite der mittleren beiden Ringe die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms. Die Spaltung von Proteinen erfolgt ATP-unabhängig mit Hilfe der Aminogruppen von N-terminalen Threonin

Proteasen (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997). Von den sieben β -Untereinheiten besitzen allerdings nur drei die Fähigkeit Proteine, zu spalten.

- Die β_1 -Untereinheit besitzt eine Caspase-ähnliche Aktivität und spaltet hinter den sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat.
- Die β_2 -Untereinheit spaltet hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin mit Hilfe einer Trypsin-ähnlichen Aktivität.
- Die β_5 -Untereinheit hingegen weist eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf, die hinter Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin schneidet.

(Groll et al., 1997; Nussbaum et al., 1998)

Untersuchungen ergaben eine unterschiedlich stark ausgeprägte proteolytische Aktivität der drei katalytischen Untereinheiten, wobei die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität die höchste Aktivität aufweist, gefolgt von der Trypsin-ähnlichen und der Caspase-ähnlichen Aktivität (Heinemeyer et al., 1997; Jäger et al., 1999).

1.2.2 Aufbau des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom ist, wie bereits erwähnt, ein 2500 kDa großer Komplex aus einem zentral gelegenen 20S Proteasom, an das auf beiden Seiten je ein 700 kDa großer endständiger 19S Regulator (PA700) angelagert ist (Löwe et al., 1995) (Abb. 2).

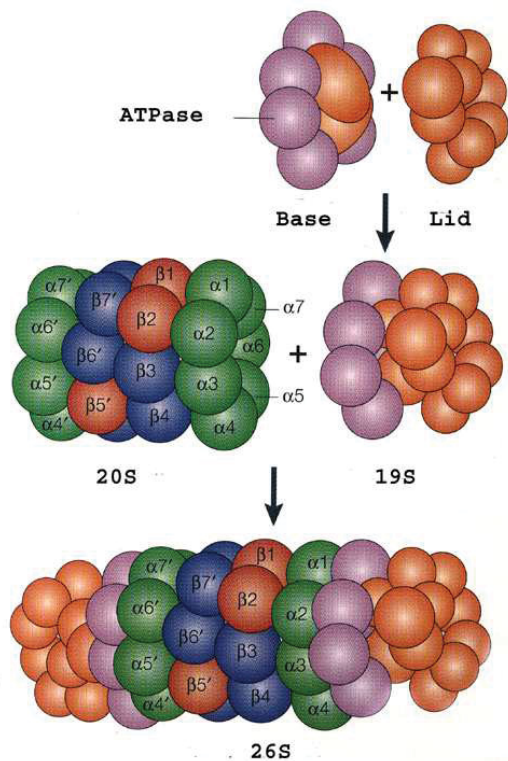


Abb. 2: Aufbau des 26S Proteasoms

Dargestellt ist eine schematische Grafik des 26S Proteasoms. Zu erkennen sind die alpha- und beta-Untereinheiten des 20 S Proteasom in entsprechender Anordnung. An beiden Enden des 20S Proteasoms sitzen die 19S Regulator-Kappen mit einem *Lid*- und einem *Base*- Anteil. Modifiziert nach Kloetzel (Kloetzel, 2001).

Mit Hilfe dieser Regulator-Kappen werden polyubiquitinylierte, also mit mehreren Ubiquitin-Molekülen markierte, Proteine erkannt und unter Verbrauch von ATP in das Proteasom eingeschleust.

Die 19S Kappen bestehen aus einem Deckel (*lid*) und einer Basis (*base*), die beide spezifische Aufgaben in der Interaktion von Proteinen mit dem 26S Proteasom haben (Glickman et al., 1998). Die Basis enthält neun Untereinheiten, wovon sechs Untereinheiten aus homologen ATPasen der AAA-Familie (*ATPases associated with various cellular activities*) bestehen. Diese ATPasen haben eine Chaperon-Aktivität und interagieren mit den äußeren α -Untereinheiten des 20S Proteasoms, wobei sie unter Verbrauch von ATP zu einer Öffnung des Zylinders führen (Köhler et al., 2001). Des Weiteren ist die Basis beteiligt an der Entfaltung der zu

verdauenden Proteine, wodurch diese erst durch die schmale Öffnung ins Innere des *core particle* gelangen können (Benaroudj and Goldberg, 2000).

Der Deckel, bestehend aus acht Untereinheiten, hat keine ATPase-Aktivität. Er ist beteiligt an der ATP-unabhängigen Bindung und Abspaltung der Polyubiquitinketten markierter Zielproteine (Deveraux et al., 1994).

Das zuvor erwähnte Ubiquitin-Proteasom-System schützt die Zelle vor einem unkontrollierten Proteinabbau, indem es den Zugang zum 26S Proteasom und somit dessen Aktivität reguliert (Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996).

Das für diese Abläufe benötigte Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, welches wie der Name verdeutlichen soll, in allen eukaryotischen Zellen, also ubiquitär, vorkommt. Es bindet an fehlgefaltete und nicht benötigte Proteine, die vom Proteasom abgebaut werden sollen. Eine Bindung des markierten Proteins an das Proteasom erfolgt, wenn mindestens vier Ubiquitin-Moleküle angehängt sind. Dabei steigt die Bindungsaffinität zur regulatorischen 19S Einheit mit der Menge an gebundenen Ubiquitin-Molekülen (Deveraux et al., 1994; Thrower et al., 2000).

Die Markierung mit mehreren Ubiquitinketten (= Polyubiquitylierung) wird durch drei Enzyme katalysiert (Abb. 3):

E1 ist das Ubiquitin-aktivierende Enzym, welches unter Verbrauch von ATP die Aktivierung von Ubiquitin katalysiert. In dieser Reaktion bildet sich eine Thioether-Bindung zwischen einem Cystein-Rest des Enzym E1 und dem C-terminalen Ende des Ubiquitin (Ciechanover et al., 1981; Glickman and Ciechanover, 2002).

In einem weiteren Schritt erfolgt mittels des Ubiquitin-konjugierenden Enzymes E2 die Übertragung des Ubiquitin von E1 auf einen Cystein-Rest des E2. Zu erwähnen ist die Tatsache, dass es im menschlichen Organismus viele verschiedene Subtypen des E2 gibt (Ciechanover, 1998).

Darauffolgend überträgt die Ubiquitin-Ligase E3 das aktivierte Ubiquitin auf das Zielprotein. Dazu bindet diese das Zielprotein und katalysiert dann eine Amid-Verbindung zwischen Letzterem und dem Ubiquitin. Auch vom E3 existierten mehrere hundert unterschiedliche Subtypen (Ciechanover, 1998).

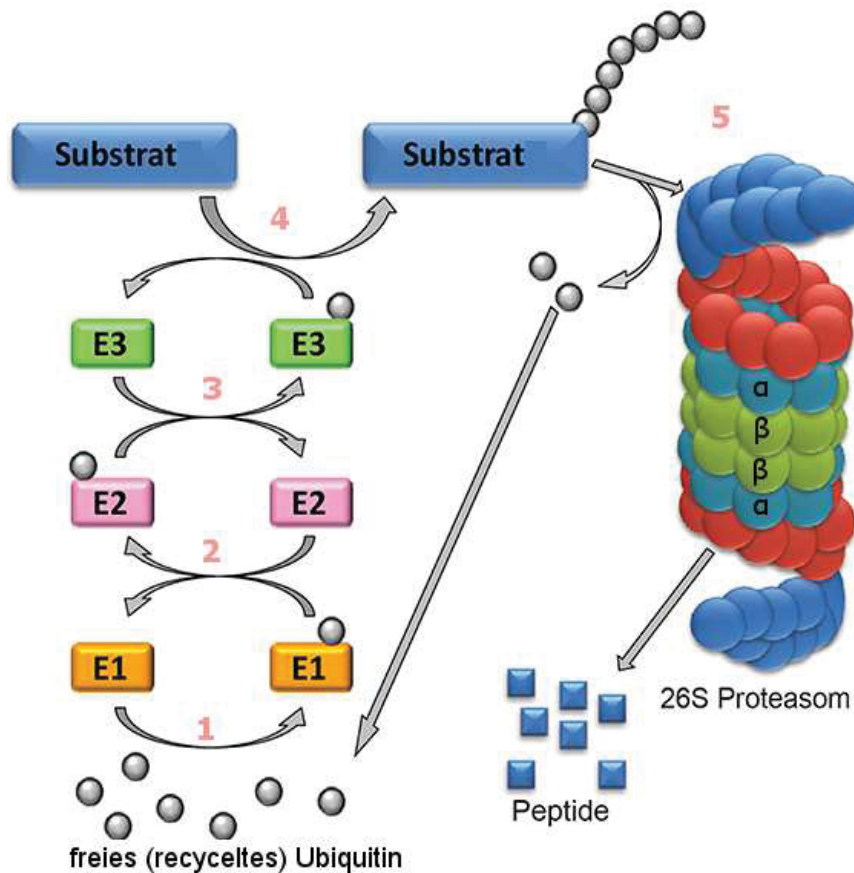


Abb. 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System

Dargestellt ist der Ablauf der Protein-Ubiquitylierung und der anschließende Abbau durch das Proteasom. 1) Aktivierung des Ubiquitin (hier grau dargestellt) unter Verbrauch von ATP (Adenosin-Triphosphat) zu AMP (Adenosin-Monophosphat) (nicht dargestellt). 2) Übertragung des Ubiquitin von E1 auf E2. 3) Übertragung des Ubiquitin von E2 auf E3. 4) Bindung des E3-Ubiquitin-Moleküls an das Zielprotein. 5) Bindung des polyubiquitylierten Substrates an die 19S Regulatoreinheit des 26S Proteasoms und Abbau durch das 20S Proteasom in kurze Peptide und recyceltes Ubiquitin.

Abk.: E1 = Enzym1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E2 = Enzym2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym, E3 = Enzym3: Ubiquitin-Ligase

Modifiziert nach Massaly (Massaly et al., 2015)

1.2.3 Weitere Formen des 20S Proteasoms

Neben dem klassischen 20S Proteasom existieren noch weitere Formen mit zum Teil unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten. Dazu gehören das 20S Immunoproteasom und sogenannte Intermediärproteasomen, welche Mischformen der oben genannten Proteasomen darstellen (Dahlmann, 2016). Diese Subtypen des Proteasoms entsprechen gänzlich eigenständigen Proteasom-Entitäten mit unterschiedlichen Untereinheiten. Sie werden unter dem Einfluss von Zytokinen neu synthetisiert (Dahlmann, 2016).

Das Immunoproteasom zeichnet sich dadurch aus, dass die drei katalytisch aktiven β -Untereinheiten, β_1 , β_2 und β_5 durch die Untereinheiten *low molecular mass protein 2* (LMP2, auch β_{1i}), *multicatalytic endopeptidase complex like 1* (MECL-1, auch β_{2i}) und *low molecular mass protein 7* (LMP7, auch β_{5i}) ausgetauscht werden. Dabei können sowohl alle, als auch nur einzelne der β -Untereinheiten ausgetauscht werden (Dahlmann, 2016; Groettrup et al., 1996; Kloetzel, 2004) (Abb. 4).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der oben beschriebene Umbau zu veränderten katalytischen Aktivitäten beim Immunoproteasom führt, wobei unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Veränderungen der einzelnen Enzymaktivitäten vorliegen. So wird beim Immunoproteasom die Trypsin-ähnliche Aktivität hochreguliert, wohingegen die Chymotrypsin- und die Caspase-ähnliche Aktivität herunterreguliert werden (Boes et al., 1994; Dahlmann et al., 2000; Eleuteri et al., 1997; Ustrell et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen beschreiben interessanterweise jedoch eine erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Aki et al., 1994; Gaczynska et al., 1993, 1994).

Induziert werden diese strukturellen und funktionellen Veränderungen durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie Interferon Gamma (INF- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Lipopolysaccharide (LPS) (Aki et al., 1994; Beninga et al., 1998; Boes et al., 1994; Dahlmann et al., 2000; Loukissa et al., 2000; Ustrell et al., 1995).

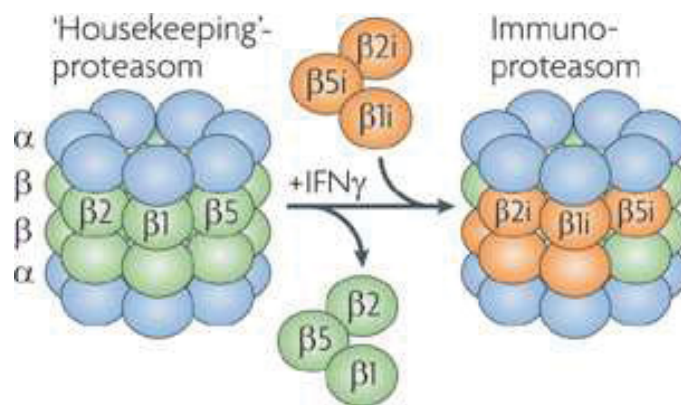


Abb. 4: Transformation des Immunoproteasoms

Schematische Darstellung der Transformation des 20S Proteasoms (*housekeeping proteasom*) in das 20S Immunoproteasom durch den Interferon- γ -induzierten Austausch der β_1 -, β_2 - und β_5 -Untereinheiten.

Abk.: IFN γ = Interferon Gamma

Modifiziert nach Klein et al. 2009 (Klein et al., 2009)

Durch seine besondere Struktur generiert das Immunoproteasom kürzere Peptidfragmente mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren (Kuckelkorn et al., 1995). Diese Peptide haben eine optimale Größe, um nach der Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum als Antigene über MHC I-Moleküle auf zytotoxischen T-Zellen präsentiert zu werden (Kisselev et al., 1999; Kuckelkorn et al., 2002; Sijs et al., 2011). Kongruent dazu ließ sich das Immunoproteasom besonders häufig in lymphatischem Gewebe wie der Milz, dem Thymus und in Lymphknoten nachweisen (Eleuteri et al., 1997; Stohwasser et al., 1997, 2000). Aber auch in den Lungen von Patienten mit einer Sarkoidose oder einem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) konnte das Immunoproteasom identifiziert werden (Sixt et al., 2012, 2014).

Bei den proteasomalen Mischformen sind sowohl β -Untereinheiten des regulären 20S Proteasoms verbaut als auch die anderer Proteasomen, so zum Beispiel β_i -Untereinheiten des Immunoproteasomes. Dies führt zu ganz unterschiedlichen

enzymatischen Eigenschaften mit variierenden Schnittpräferenzen (Dahlmann et al., 2000).

1.3 Vorkommen von Proteasomen

1.3.1 Das intrazelluläre Proteasom

Nach der Entdeckung des Proteasomensystems (Hershko and Ciechanover, 1998; Orłowski, 1990) konnten Studien Proteasomen in den unterschiedlichen Kompartimenten menschlicher Zellen nachweisen. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass sowohl das 26S- als auch das 20S Proteasom zusammen mit den regulatorischen 19S Kappen frei im Zytoplasma und im Nukleus von Zellen vorkommen (Peters et al., 1994; Rivett and Knecht, 1993). Zuvor hatte Rivett in diesem Zusammenhang bereits die Beschreibung eines an der Erythrozytenmembran haftenden Hohlzylinders veröffentlicht, ohne jedoch die genaue Funktion der Protease zu kennen (Rivett, 1989).

In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass das hauptsächlich für die Synthese des Proteasoms und seine Untereinheiten zuständige Kompartiment das endoplasmatische Retikulum ist (Enenkel et al., 1998; Fricke et al., 2007).

1.3.2 Das extrazelluläre Proteasom

Über einen langen Zeitraum nach der Erstbeschreibung des Proteasoms ging man davon aus, dass das Proteasom ausschließlich intrazellulär lokalisiert sei.

Diese Annahme wurde in den letzten Jahren jedoch durch viele Studien widerlegt, die das Proteasom in der extrazellulären Flüssigkeit verschiedenster Kompartimente nachweisen konnten.

So wurden in kultivierten C6-Astrozytomzellen Proteasom-ähnliche Enzyme nachgewiesen, die klassische Proteasom-typische Substrate wie Kollagen IV, α -Casein und β -Insulin abbauen. Diese Enzyme konnten auch extrazellulär im Umfeld intakter C6-Astrozytomzellen nachgewiesen werden (Vaithilingam et al., 1995).

Ebenso wurden extrazelluläre Proteasomen im Kopfteil von Spermien nachgewiesen, wo sie anscheinend maßgeblich an der Akrosomenreaktion im Rahmen der Befruchtung beteiligt sind (Morales et al., 2004). Auch im menschlichen Liquor wurde bereits extrazelluläres Proteasom gefunden (Mueller et al., 2012). Im Serum von gesunden Probanden konnten sogenannte „zirkulierende Proteasomen“ nachgewiesen werden, die Zoeger et al. als 20S Proteasom identifizierten (Wada et al., 1993; Zoeger et al., 2006).

Durch den Nachweis von extrazellulärem Proteasom ist dessen Rolle und Funktion bei unterschiedlichen Erkrankungen in den wissenschaftlichen Fokus geraten. So konnten sowohl bei soliden Tumoren als auch bei malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems deutlich erhöhte Proteasomkonzentrationen im Serum nachgewiesen werden, die interessanterweise zum Teil abhängig vom Krankheitsstadium und Therapiestatus variierten (Lavabre-Bertrand et al., 2001; Stoebner et al., 2005; Wada et al., 1993). Beispielsweise zeigte sich bei erfolgreicher Therapie von Tumorerkrankungen eine Abnahme der Menge an gemessenem Proteasom und umgekehrt (Lavabre-Bertrand et al., 2001). Somit kann die Proteasomkonzentration unter Umständen als eine Art Tumormarker diskutiert werden.

Eine Gruppe aus brasilianischen und deutschen Forschern konnte kürzlich einen Subtyp des extrazellulären 20S Proteasoms als verantwortliches Enzym für die Abspaltung von Endostatin aus Kollagen XVIII in maligne entarteten Zellen nachweisen (Reiss-Pistilli et al., 2017). Endostatin ist ein sehr potenter, endogener Inhibitor der tumorinduzierten Angiogenese und hemmt nachhaltig die Tumorprogression ohne Bildung von Resistenzen. Diese Erkenntnisse könnten möglicherweise Grundlage einer gezielten Einsetzung des 20S Proteasoms in der Therapie von malignen Tumoren sein (O'Reilly et al., 1997).

Auch bei vielen Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel dem Lupus erythematoses, der rheumatoiden Arthritis und der Autoimmunmyositis konnten nicht nur deutlich erhöhte Proteasomspiegel im Serum nachgewiesen werden, sondern ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Proteasomkonzentration nachgewiesen werden (Egerer et al., 2002; Feist et al.,

2000). Ebenso wurden bei diesen Autoimmunerkrankungen Proteasom-Autoantikörper gefunden, deren Konzentration mit der vorliegenden Krankheitsaktivität in Verbindung standen (Feist et al., 2000).

Bei zerebralen Ischämien korrelieren hohe Konzentrationen des 20S Proteasoms mit erhöhten neurologischen Schäden, was auf vermehrten oxidativen Stress, vermehrte Einwanderung von Leukozyten und höherer Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist (Berti et al., 2003; Doeppner et al., 2012). Versuche mit einer ischämischen Postkonditionierung führten interessanterweise zu einer Reduktion des Hitze-Schock-Protein 70, infolge dessen auch die Proteasomkonzentration gesenkt war. Dadurch ergab sich ein zumindest kurzzeitig messbarer neuro-protektiver Effekt (Doeppner et al., 2016).

Weitere vielversprechende Forschungsergebnisse konnten erstmals auch im Liquor und bei Lungenerkrankungen wie dem ARDS extrazelluläres Proteasom, sowie Immunoproteasom in der Alveolarflüssigkeit nachweisen (Backhaus, 2013; Mueller et al., 2012; Sixt et al., 2012).

1.4 Ausschleusung des 20S Proteasom in den extrazellulären Raum – Die Rolle von extrazellulären Vesikeln

Ziel intensiver Forschung ist derzeit die Frage, auf welchem Wege das Proteasom in den Extrazellularraum gelangt. Ein geringer Teil mag durch Zelllyse dorthin gelangen, aber es gibt viele Forschungsergebnisse, die für einen direkten Transport über die Zellmembran sprechen (Bochmann et al., 2014; Cocucci et al., 2009; Sixt et al., 2012).

Sixt et al. konnten in Studien bei Patienten mit einem ARDS mehrere Argumente für diese Vermutung liefern. Zum einen zeigten sich in den untersuchten Zellpellets aus den Proben der bronchoalveolären Lavage dieser Patienten fast ausschließlich intakte Zellen trotz hoch-positivem Proteasom-Titer, so dass eine Freisetzung aus zerstörten Zellen nicht anzunehmen ist (Sixt et al., 2012). Ebenso fand sich keine Korrelation zwischen einer hohen gemessenen Proteasomkonzentration und der Höhe der Lactatdehydrogenase im Serum, welche unter anderem ein Maßstab für Zelllyse ist (Sixt et al., 2012). Unterstützt wird diese These auch durch den

fehlenden Nachweis von PA28 in der BAL erkrankter Personen, einer weiteren, intrazellulär vorkommenden, regulatorischen Kappe (Sixt et al., 2012). Besonders aussagekräftig ist auch die Entdeckung, dass es sich bei den nachgewiesenen Proteasomen aus der Alveolarflüssigkeit von ARDS-Patienten um andere Subklassen handelt als bei der intrazellulären Form, nämlich um Intermediär- und Immunoproteasomen (Sixt et al., 2012). Dies widerspricht der Überlegung, das Proteasom sei durch Zellzerstörung dorthin gelangt.

In T-Lymphozyten konnte experimentell bereits ein gerichteter Export von 20S Proteasom durch Mikrovesikel über die Zellmembran gezeigt werden (Bochmann et al., 2014). Nicht zuletzt sind bereits vor längerer Zeit mit dem Elektronenmikroskop Vesikel mit einer Größe von mehr als 130 nm im Alveolarepithel gezeigt worden (Williams, 1984). Betrachtet man die Größe des Proteasoms von 11 x 16 nm, sind die Voraussetzungen für einen Transport über die alveoläre Zellmembran ohne Weiteres gegeben (Kopp et al., 1986).

Andere Arbeitsgruppen konnten auch bei Patienten mit einem Prostatakarzinom sogenannte *prostate extracellular vesicles* mit einer Größe von 100-1000 nm im Serum nachweisen. Dabei zeigte sich, dass diese Vesikel möglicherweise ein sensibler Marker für die Detektion eines Prostatakarzinoms, sowie dessen Verlaufskontrolle sind. Auch gelang es mittels der Messung oben genannter Vesikel effektiv Rezidive oder postoperativ verbliebene Tumorrreste aufzuzeigen (Biggs et al., 2016; Duijvesz et al., 2011).

Intensive Untersuchungen konnten zwei Formen an extrazellulären Vesikeln identifizieren: Zum einen die Exosomen, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von 40-100nm aufweisen und durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust werden. Zum anderen die Mikrovesikel, welche mit einem durchschnittlichem Durchmesser von 100-1000nm deutlich größer sind und direkt durch sogenanntes *budding* aus der Plasmamembran austreten (Heijnen et al., 1999).

Bei der näheren Betrachtung dieser Vesikel zeigten sich unterschiedliche Zusammensetzungen des Inhaltes (Haraszti et al., 2016). Besonders im Hinblick auf die enthaltenen Proteine ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen

Exosomen und Mikrovesikeln in Abhängigkeit von der Zellart, aus der sie stammen. So wiesen die Exosomen aus maligne entarteten Zellen des Glioblastoms und des hepatozellulären Karzinoms völlig andere Proteine auf als die Exosomen aus Stammzellen des Knochenmarks und gaben Hinweise auf die Dysregulationen der Ursprungszelle. Die Mikrovesikel eben dieser drei Zellarten zeigten hingegen kaum Unterschiede der enthaltenen Proteine und spiegeln somit scheinbar eher die Physiologie der Ursprungszelle wider (Haraszti et al., 2016). Die Bestimmung des Inhaltes von Exosomen, vor allem unter Betrachtung von Konzentration und Aktivität von Proteasomen, könnte somit einen entscheidenden Beitrag zur Diagnostik maligner Tumorerkrankungen leisten.

In der Zusammenschau dieser und anderer Ergebnisse kann es als erwiesen angesehen werden, dass es eine kontrollierte Ausschleusung des 20S Proteasom aus der Zelle in den Extrazellularraum gibt. Dabei sind nach wie vor die genauen Regulationsmechanismen dieses Transportes nicht bekannt und Bestandteil weiterer Forschungen.

Welche konkreten Aufgaben das extrazelluläre Proteasom wahrnimmt und wie es pathophysiologische Prozesse beeinflusst, ist bislang nicht ausreichend geklärt. Es lassen sich derzeit lediglich Vermutungen im Hinblick auf die Beteiligung am Proteinstoffwechsel bei z.B. Lungenerkrankungen anstellen.

1.5 Hemmung des Proteasoms

Wie bereits zuvor beschrieben, besteht das katalytische Zentrum des Proteasoms aus drei verschiedenen N-terminalen Threonin Proteasen (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997).

Es konnten in der Vergangenheit die verschiedensten reversiblen und irreversiblen Proteasom-Inhibitoren identifiziert werden. Diese hemmen auf unterschiedlich ausgeprägte Weise eines oder mehrere der katalytische Zentren des Proteasoms (Lee and Goldberg, 1998; Rock et al., 1994). Da die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität die am stärksten proteolytische Wirkung des 20S Proteasoms ausmacht, bewirkt deren Hemmung auch den stärksten Effekt auf die Proteindegradation (Heinemeyer et al., 1997).

Die meisten der identifizierten Proteasom-Inhibitoren haben allerdings die Eigenschaft, dass sie sehr unspezifisch reagieren und somit auch andere physiologisch vorkommende Proteasen hemmen. So konnte gezeigt werden, dass Peptid-Aldehyde zu einer reversiblen Hemmung von Proteasomen führen, aber ebenso auf lysosomale und Calcium-abhängige Proteasen wie das Calpain wirken (Mellgren, 1997; Read et al., 1995; Rock et al., 1994). Gleiches gilt für die Gruppe der synthetisch hergestellten Peptid-Vinyl-Sulfone und dem natürlich vorkommenden Lactacystin, welche neben dem Proteasom auch intrazelluläre Cathepsine irreversibel blockieren (Bogyo et al., 1997; Brömme et al., 1996; Craiu et al., 1997; Ostrowska et al., 1997).

Ein weiterer, ebenfalls natürlich vorkommender, selektiver Proteasom-Inhibitor ist das Epoxomicin (Meng et al., 1999). Es gehört zur Gruppe der Epoxyketone und wurde erstmals im Rahmen der Tumorforschung aus einem Bakterienstamm der Actinomyceten isoliert (Hanada et al., 1992). Epoxomicin hemmt alle drei katalytischen Zentren des Proteasoms am N-terminalen Threonin, wobei die Wirkung am deutlichsten bei der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität feststellbar ist (Meng et al., 1999). Seine Wirkung entfaltet das Molekül über eine kovalente und irreversible Bindung sowohl an die β_2 - und β_5 -Untereinheiten als auch die β_2i (MECL 1)- und β_5i (LMP 7)-Untereinheiten (Meng et al., 1999). Das bedeutet, das 20S Proteasom sowie das Immunoproteasom werden gleichermaßen gehemmt. Diese Eigenschaften des Epoxomicin erlauben es, gezielt *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen im Hinblick auf die Wirkweise des Proteasomensystems durchzuführen.

Ein weiterer selektiver, reversibler und gut zellgängiger Proteasom-Inhibitor ist das Bortezomib, welches nach seiner Entdeckung ursprünglich den Namen PS-341 trug (Adams et al., 1998; Teicher et al., 1999). Der Wirkstoff wird bereits klinisch in der Krebstherapie beim Multiplen Myelom, bei der chronisch lymphatischen Leukämie sowie dem Prostata- und Pankreaskarzinom angewandt, wo er wichtige Stoffwechsel-Vorgänge der Tumorzellen hemmt (Adams et al., 1999; Adams and Kauffman, 2004; Hideshima et al., 2001; Richardson et al., 2005; Teicher et al., 1999).

Beim Multiplen Myelom konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die Wirkung von Bortezomib besonders ausgeprägt ist bei Myelomzellen, die innerhalb des Knochenmarkes wachsen, da dort auch eine deutlich höhere Proteasomaktivität gemessen werden konnte als bei extramedullären Myelomzellen (Edwards et al., 2009). Dieser Effekt wird zurückgeführt auf die optimalen Wachstumsbedingungen für die Myelomzellen bedingt durch die Unterstützung anderer im Knochenmark gelegener stromaler Zellen (Edwards et al., 2009).

Ebenso konnte eine antientzündliche Wirkung des Bortezomib zum Beispiel bei Parodontitis nachgewiesen werden. Dabei hemmt Bortezomib den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*) und reduziert dadurch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie TNF-alpha, Interleukin-1beta, Interleukin-6 und Interleukin-8 (Jiang et al., 2016).

Weitreichend sind auch die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, die sich mit der Rolle des Proteasoms bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen befasst (Dieudé et al., 2015). Die Forscher konnten in verschiedenen experimentellen Ansätzen mit Ratten nachweisen, dass die Hemmung des Proteasoms zu einer deutlich geringeren Abstoßungsrate der verwendeten Organimplantate führte (Dieudé et al., 2015). In diesem Zusammenhang gelang der Arbeitsgruppe erstmals der Nachweis von Proteasomaktivität in sogenannten *apoptotic exosome-like vesicles*, welche durch Endothelzellen geschädigter Gefäße freigesetzt werden (Dieudé et al., 2015). Dieser Freisetzungs-Mechanismus unterliegt scheinbar dem Einfluss der körpereigenen Caspase 3. Es konnte gezeigt werden, dass die *apoptotic exosome-like vesicles* eine B-Zell-Aktivierung herbeiführen, die wiederum zu einer Bildung von Anti-Perlecan Autoantikörpern führte (Dieudé et al., 2015). Da Perlecan ein Bestandteil von Basalmembranen ist, gehen Dieudé et al. davon aus, dass diese Autoantikörper mit verantwortlich für die im Modell beobachteten Abstoßungsreaktionen sind. Die intravenöse Verabreichung von *apoptotic exosome-like vesicles* mit gehemmter proteasomaler Aktivität in Ratten mit Organimplantaten bewirkte eine deutlich messbare Reduktion der Anti-Perlecan AK sowie eine verminderte Infiltration von Entzündungszellen und Abstoßung des *Grafts* (Dieudé et al., 2015).

Angesichts der Vielzahl von physiologischen Vorgängen, bei denen das Proteasom beteiligt und unerlässlich ist, erscheint es widersprüchlich, Proteasominhibitoren in der Therapie von Malignomen oder anderen Erkrankungen anzuwenden.

Untersuchungen zeigen jedoch, dass besonders Tumorzellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase auf die Beseitigung von fehlgefalteten und ubiquitinylierten Proteinen angewiesen sind. Außerdem reguliert das Proteasom auch bei diesen malignen Zellen wichtige Zellvorgänge, deren Hemmung den Zelltod herbeiführen (Adams, 2004; Lah et al., 2006).

Um unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren und gleichzeitig die Wirkstoffspiegel im malignen Gewebe zu erhöhen und infolgedessen den Therapieerfolg zu maximieren, wurden in den letzten Jahren verschiedene Studien mit sogenannten Nanopartikeln durchgeführt (Prunk and Kos, 2016). Diese sind, wie schon der Name sagt, kleinste Partikel in Form von Liposomen, Mizellen, synthetischen Polymeren wie Polyethylenglycol (PEG) oder auch magnetischen Nanopartikeln aus Eisenoxid. Werden Proteasominhibitoren wie das Bortezomib (oder auch andere Medikamente) an diese gebunden oder mit diesen umhüllt (*coating*), so führt das häufig zu einer besseren Löslichkeit hydrophober Substanzen, einer erhöhten Stabilität *in vivo* und verhindert gegebenenfalls den vorzeitigen Abbau der Therapeutika. Auch kann mit dieser Methode die Freisetzung des Wirkstoffes z.B. in Tumorgewebe zeitlich dosiert werden (Prunk and Kos, 2016). Damit die wirkstoffhaltigen Nanopartikel zielgerichtet mit Tumorzellen interagieren, können sie beispielsweise an tumorspezifische Antikörperfragmente, an Folat oder an synthetische Peptide aus wenigen Aminosäuren gebunden werden (Prunk and Kos, 2016). Bis dato konnten in präklinischen Studien mit Bortezomib-Nanopartikeln aber auch mit anderen Proteaseinhibitoren für unterschiedliche Tumorentitäten gute Ansprechraten bei verminderten Nebenwirkungen beobachtet werden (Prunk and Kos, 2016).

1.6 PAP - Pulmonale alveoläre Proteinose

1.6.1 Definition und Epidemiologie

Die pulmonale alveoläre Proteinose (PAP) ist eine sehr seltene Erkrankung, die entsprechend der Namensgebung durch eine Akkumulation von Lipoproteinen und Surfactant-Phospholipiden in den Azini, respektive Alveolen und benachbarten peripheren Bronchien gekennzeichnet ist (Bonella and Costabel, 2015). Erstmals beschrieben wurde die PAP von Rosen und Castlemann im Jahre 1958 in einer Veröffentlichung von 27 *case reports*, in welchen bei den untersuchten Patienten ein protein- und lipidreiches PAS-positives Material in der Lunge gefunden werden konnte. Die PAS-Reaktion (*Periodic acid-Schiff reaction*) ist eine Färbemethode mit der unter anderem Kohlenhydrate, Glycoproteine, sowie Glycolipide und Mucopolysaccharide angefärbt werden können (Dubray and Bezard, 1982). Retrospektiv konnten unter Zuhilfenahme der von Rosen et al. gefundenen Merkmale bereits zwei frühere Publikationen als Beschreibung einer PAP identifiziert werden. Zum einen eine Publikation über einen Mann, der an Kryptokokkose verstorben war und bei dem sich ein auffälliger Lungenbefund zeigte (Linell et al., 1953), und zum anderen ein Bericht über eine Frau, welche im Zusammenhang mit einer myeloproliferativen Erkrankung intra-alveoläre Koagel aufwies (Levinson et al., 1957).

Die in der Literatur angegebene Häufigkeit der PAP variiert zwischen 0,36 – 3,7 pro 1.000.000 (Ben-Dov et al., 1999). Dabei liegt die Inzidenz in den USA bei 0,37 pro 100.000 (Bauer et al., 2009) und 0,7 pro 100.000 in Japan (Bingisser et al., 1998). Die am häufigsten betroffene Personengruppe sind dabei Erwachsene im Alter zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (Bonella et al., 2011, 2012, 2013). Männer sind zwei- bis dreimal so häufig betroffen wie Frauen (Bingisser et al., 1998; Bonella et al., 2011, 2012, 2013; Borie et al., 2015), wobei bis zu 80% der Erkrankten eine positive Raucheranamnese aufweisen (Bingisser et al., 1998; Bonella et al., 2011, 2012).

1.6.2 Pathogenese und Einteilung

Nach derzeitigem Wissenstand unterscheidet man mehrere Formen der PAP entsprechend der zugrundeliegenden Pathomechanismen: Die primäre und die sekundäre PAP, sowie PAP-ähnliche Syndrome. Letztere können jedoch nur fraglich der PAP zugeordnet werden, da sie sich wie unten beschrieben in ihrer Pathogenese von den anderen Formen unterscheiden (Carey and Trapnell, 2010).

Die primäre PAP wird noch einmal unterteilt in eine autoimmune und eine hereditäre Form und zeichnet sich in beiden Fällen durch eine gestörte Interaktion der Alveolarmakrophagen mit dem *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) aus. GM-CSF ist ein Zytokin, welches über den Transkriptionsfaktor PU.1 gesteuert wird und essentiell für die Aktivierung der Alveolarmakrophagen ist, die unter anderem für den Abbau von Surfactant benötigt werden (Abb. 5). Fehlt GM-CSF kommt es zu schweren Makrophagen-Dysfunktionen mit konsekutiver Akkumulation von Surfactantphospholipiden und Lipoproteinen, was in GM-CSF depletierten Mäusen nachgewiesen werden konnte (Dranoff et al., 1994; Stanley et al., 1994).

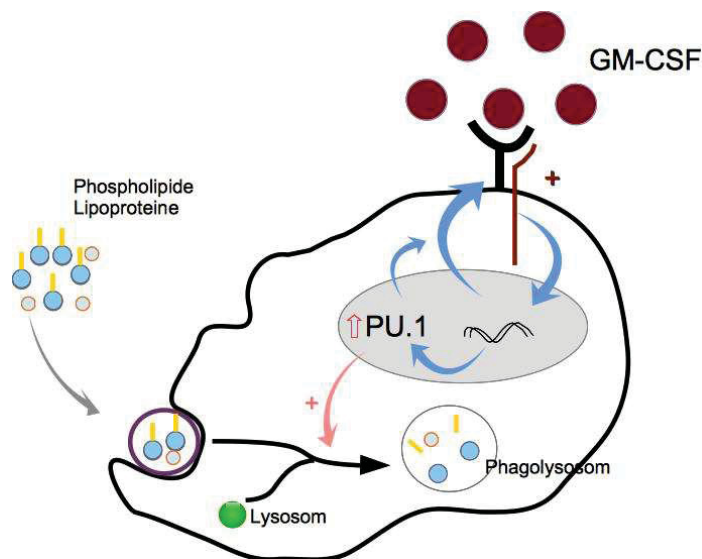


Abb. 5: Aktivierungsweg eines Alveolarmakrophagen

Nach Bindung des GM-CSF an den Rezeptor des Makrophagen wird mittels des Transkriptionsfaktors PU.1 der Makrophage auf bislang unbekanntem Signalweg aktiviert und baut die Bestandteile des Surfactant ab. Modifiziert nach Carey et al. 2010 (Carey and Trapnell, 2010).

Abk.: GM-CSF = *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

Die autoimmune PAP, welche mit 90% der Fälle die häufigste Form darstellt, beginnt im Erwachsenenalter und ist gekennzeichnet durch neutralisierende Antikörper gegen GM-CSF (Inoue et al., 2008). Es kommt durch die oben beschriebenen Mechanismen zu einem alveolären Füllungssyndrom der terminalen Lungenabschnitte mit Surfactantbestandteilen (Costabel and Guzman, 2005; Kitamura et al., 1999).

Die hereditäre PAP wird ausgelöst durch angeborene Mutationen in der α - oder β -Kette des GM-CSF-Rezeptors und führt durch die unzureichende Aktivierung der Makrophagen durch GM-CSF häufig zu einer schweren respiratorischen Insuffizienz mit schlechter Prognose (Dirksen et al., 1997; Suzuki et al., 2008, p. 2, 2010).

Die sekundäre PAP kann auftreten in Folge diverser hämatologischer Erkrankungen wie z.B. eines myelodysplastischen Syndromes, einer Leukämie oder auch anderen Erkrankungen mit Immundefiziten (Breslow et al., 1965;

Carnovale et al., 1977; Shoji et al., 2002). Ebenfalls beschrieben sind sekundäre PAP nach der Inhalation von anorganischen Stäuben wie z.B. Aluminium, Titan, Siliziumdioxid, u.a. (Keller et al., 1995; Miller et al., 1984; Xipell et al., 1977). Trotz nicht eindeutig geklärter Pathomechanismen bei der sekundären pulmonalen alveolären Proteinose ist allen Fällen ein Mangel und eine Dysfunktion der Alveolarmakrophagen gemein.

PAP-ähnliche Syndrome sind seltene, ebenfalls angeborene, genetische Störungen der Surfactanthomöostase der Lunge. Zugrunde liegen verschiedene Genmutationen, die zu einer Surfactant-Defizienz und Dysfunktion führen, was sie prinzipiell von dem Pathomechanismus der PAP unterscheidet, die sich durch einen unzureichenden Abbau von Surfactant auszeichnen. Als Ursache sind Mutationen von Genen für die Synthese von Surfactant Protein-B, Surfactant Protein-C und Mutationen im *ATP-binding cassette transporter A3 (ABCA3)* bekannt (Nogee et al., 1993, 2001; Shulenin et al., 2004). Kürzlich konnte noch eine Genmutation im thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) identifiziert werden, welche im Rahmen des Hirn-Lungen-Schilddrüsen-Syndromes auftritt und ebenfalls eine gestörte Surfactantfunktion zu Folge hat (Hamvas et al., 2013). Letztlich entwickeln die meisten der Betroffenen dieser Mutationen im frühen Kindesalter eine interstitielle Lungenerkrankung mit schlechter Prognose.

1.6.3 Diagnose

Die Klinik bei betroffenen Personen variiert und stellt sich initial zumeist unspezifisch in Form von Belastungsdyspnoe, Husten und Abgeschlagenheit dar (Bonella et al., 2011; Goldstein et al., 1998; Inoue et al., 2008; Seymour and Presneill, 2002).

Bei der körperlichen Untersuchung fallen ebenfalls unspezifische Merkmale auf, wie zum Beispiel ein auskultatorisches Knisterrasseln, sowie Trommelschlegelfinger und eine Zyanose als Merkmal der verminderten Sauerstoffaufnahme. In späten Stadien finden sich Zeichen der Herzinsuffizienz im Rahmen eines *Cor pulmonale*.

Im Röntgenbild können symmetrische, schmetterlingsförmige alveoläre Verschattungen beidseits mit Luftbronchogramm dargestellt werden (Abb. 6a). Diese Veränderungen in der Lunge lassen sich noch deutlicher mittels *high-resolution* Computertomographie (HR-CT) darstellen, wo sie in Form eines sogenannten „crazy paving“ Musters oder auch Pflastersteinreliefs auftreten (Abb. 6b). Dieses Muster besteht aus milchglasartigen Zonen und Verdickungen der intra- und interlobulären Septen und ist häufig räumlich scharf von benachbartem gesundem Lungengewebe abzugrenzen. Auch wenn diese radiologischen Befunde charakteristisch für die PAP sind, so treten sie differentialdiagnostisch ebenfalls bei anderen Lungenerkrankungen auf, wie z.B. bei schweren Pneumonien (Bonella and Costabel, 2015; Johkoh et al., 1999).

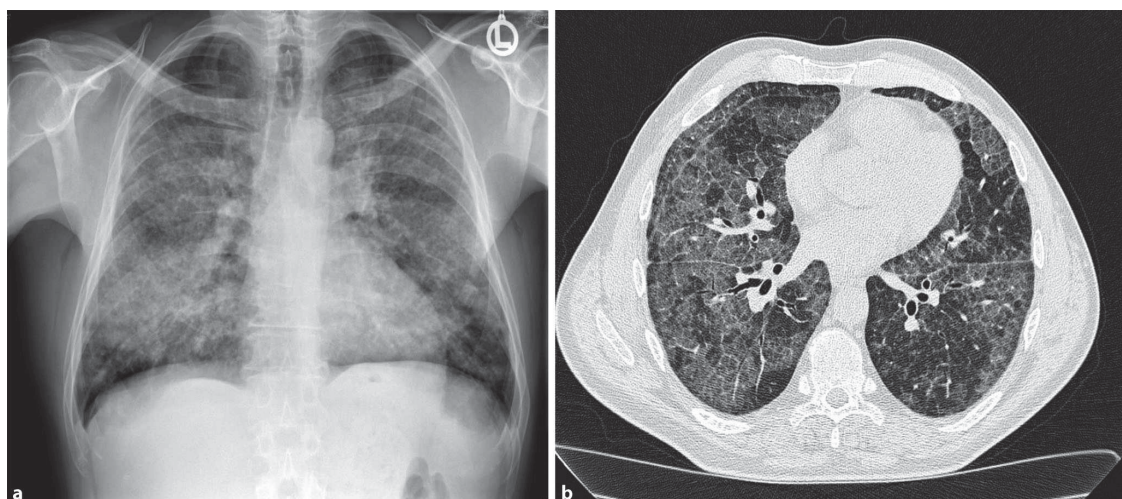


Abb. 6: Radiologische Befunde bei einer pulmonalen alveolären Proteinose

Schmetterlingsförmige beidseitige alveoläre Verschattung mit Luftbronchogramm im konventionellen Röntgen (a).

Geographisch scharf angeordnetes „Crazy paving“ Muster in der *high-resolution* Computertomographie mit Milchglaseintrübungen und Verdickungen der intra- und interlobulären Septen bei PAP-Patienten (b) (Bonella and Costabel, 2015).

Abk.: PAP = pulmonale alveoläre Proteinose

Eine 100%ige Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der autoimmun vermittelten PAP weist die Bestimmung von GM-CSF-Autoantikörpern im Serum

auf. Wobei eine Serumkonzentration der Autoantikörper $<10\mu\text{g/ml}$ als normal gilt (Kitamura et al., 2000; Latzin et al., 2005).

Die bronchoalveoläre Lavage spielt bei der Diagnose der PAP ebenfalls eine besondere Rolle, da die Befunde entscheidend zur Diagnosesicherung beitragen und ebenfalls eine Spezifität von 100% für die PAP aufweisen. Die früher häufig angewandte Lungenbiopsie kann dadurch meist umgangen werden (Bauer et al., 2009). Makroskopisch zeigt sich in der Regel eine milchig-trübe Färbung der rückgewonnenen Spülflüssigkeit, was in dem hohen Anteil an Proteinen und extrazellulärem Material begründet ist (Abb. 7a). Mikroskopisch lassen sich klassischerweise PAS-positive azelluläre Korpuskel und schaumige Makrophagen nachweisen (Abb. 7b). Gelegentlich finden sich auch erhöhte Lymphozytenzahlen in der BAL-Flüssigkeit (Costabel and Guzman, 2005; Maygarden et al., 2001; Wang et al., 1997).

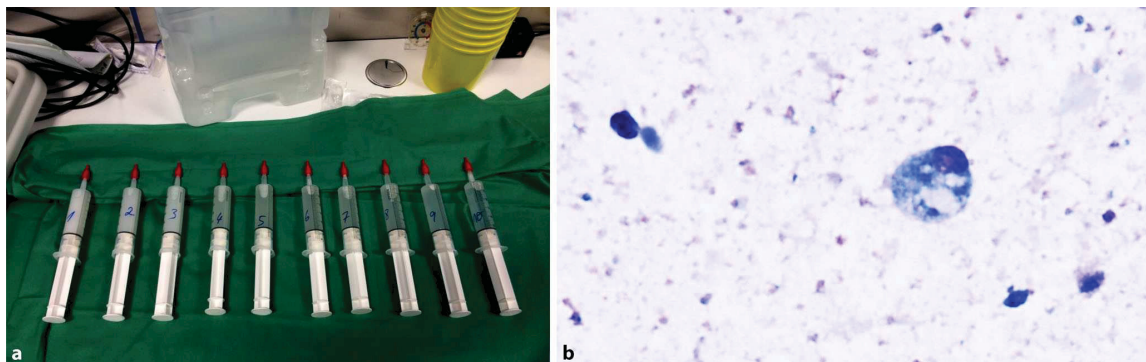


Abb. 7: Befunde in der bronchoalveolären Lavage bei pulmonaler alveolärer Proteinose

Makroskopische Trübung der bronchoalveolären Spülflüssigkeit durch Proteine und Surfactantbestandteile (a).

Mikroskopisch PAS-positive azelluläre Korpuskel mit schaumigen Makrophagen und reichlich Zelldebris (b) (Bonella and Costabel, 2015).

Abk.: PAS = Periodic acid-Schiff

Bei unklaren Befunden kann eine elektronenmikroskopische Untersuchung helfen, Surfactantbestandteile innerhalb des amorphen Materials nachzuweisen, was aber nur selten notwendig ist (Costello et al., 1975).

Die Schädigung der Lunge mit folgender Diffusionsstörung lässt sich mit Lungenfunktionsprüfungen und Blutgasanalysen (BGA) zum Teil quantifizieren. Feststellen lassen sich restriktive Ventilationsstörungen mit reduzierter Vitalkapazität und Diffusionsstörungen, welche sich in erniedrigten arteriellen Sauerstoffpartialdrücken (PaO_2) niederschlagen (Bonella et al., 2012; Goldstein et al., 1998; Lee et al., 1997; Rogers et al., 1978). Eine einheitliche Therapieindikation gibt es nicht, jedoch wird neben der Ausprägung der individuellen Symptomatik häufig der belastungsabhängige Anstieg der alveoloarteriellen Sauerstoffdruckdifferenz (AaDO_2), welche Ausdruck des Schweregrades der Diffusionsstörung ist, als Maßstab für einen Behandlungsbeginn genutzt (Bonella et al., 2011, 2013, p.; Campo et al., 2013; Leth et al., 2013).

1.6.4 Therapie

Durch ein besseres Verständnis der ursächlichen Pathomechanismen gibt es bei der Behandlung der PAP seit einiger Zeit verschiedene Therapieansätze. Therapie der Wahl ist derzeit die vor vielen Jahren von J. Ramirez entwickelte Ganzlungenlavage (*Whole Lung Lavage* = WLL) (Ramirez et al., 1963; Ramirez, 1967). Bei dieser Prozedur, über deren Durchführung es derzeit noch keine einheitlichen Standards gibt, wird der Patient mit einem Doppellumentubus intubiert und anschließend die stärker betroffene Lungenseite mit zehn bis vierzig Litern isotonischer Kochsalzlösung gespült und somit das akkumulierte proteinhaltige Material ausgewaschen. Nach drei bis sieben Tagen Pause wird die Prozedur auf der Gegenseite wiederholt (Bingisser et al., 1998; Bonella et al., 2011, 2012; Ramirez, 1967). Ein bis zwei Drittel der so behandelten Patienten erreichen eine dauerhafte Remission, wobei mehrfache WLL nötig sein können (Bonella et al., 2011, 2012; Campo et al., 2013). In einer modifizierten Technik wird

die gespülte Lunge während der Maßnahme zusätzlich manuell ventiliert, um das Auswaschen der Proteine in den Alveolen zu verbessern (Bonella et al., 2012).

Eine ebenfalls vielversprechende Therapieoption bei unzureichendem Therapieerfolg der WLL ist die Gabe von GM-CSF bei Patienten mit autoimmuner PAP. Dies kann sowohl subkutan als auch inhalativ erfolgen (Reed et al., 1999, 1999, Seymour et al., 1998, 2001; Tazawa et al., 2010). Auch wenn es für diese Therapieform aktuell noch kein zugelassenes Präparat gibt, liegen die Ansprechraten bei 80% für die inhalative und 50-60% für die subkutane Anwendung (Bonella and Costabel, 2015). Da es keine einheitlichen Therapieschemata gibt, sind die in der Literatur angegebenen Dosierungen unterschiedlich. Verschiedene Autoren berichten jedoch über Dosierungen von 250-500 µg GM-CSF täglich für beide Applikationsformen. Wobei die inhalative Verabreichung auf zweimal tägliche Gaben von je 250 µg aufgeteilt werden sollte und entweder durchgehend oder im wöchentlichen Wechsel mit Pausen von sieben Tagen verabreicht werden sollte (Bonella and Costabel, 2015; Wylam et al., 2006).

Relativ neu ist die Therapiemethode der B-Lymphozyten-Depletion mittels intravenöser Gaben von Rituximab, einem unter anderem aus der Rheumatologie bekannten monoklonalen Anti-CD20-Antikörper (Kavuru et al., 2011; Malur et al., 2012). Hier konnte durch die nachhaltige B-Zell-Depletion eine deutliche klinische Verbesserung bei den behandelten Patienten erreicht werden (Kavuru et al., 2011).

Für die Patienten mit den seltenen oben beschriebenen PAP-ähnlichen Syndromen in Form von genetisch bedingten Störungen der Surfactantproduktion kommt als einzige Heilungsoption die Lungentransplantation in Frage (Suzuki et al., 2010). Für die autoimmune PAP ist dies allerdings kontraindiziert, da die Erkrankung rezidivieren kann (Parker and Novotny, 1997).

1.6.5 Prognose

Insgesamt ist die Prognose bei den Patienten mit der autoimmunen PAP aufgrund der wirkungsvollen therapeutischen Lavage deutlich gestiegen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt 94%. Spontanremissionen kommen unbehandelt in 5-10% der Betroffenen vor (Bonella et al., 2011; Campo et al., 2013; Inoue et al., 2008; Seymour and Presneill, 2002). Wie bereits zuvor erwähnt erreichen ein bis zwei Drittel der Patienten nach nur einmaliger WLL eine dauerhafte Remission (Bonella et al., 2011, 2012; Campo et al., 2013).

Die sekundäre PAP hat eine deutlich schlechtere Prognose mit einem medianen Überleben von <20 Monaten (Ishii et al., 2011).

1.7 Ziele der Arbeit

Die pulmonale alveoläre Proteinose ist eine Erkrankung, bei der es zu einer Akkumulation von Lipoproteinen und Surfactant-Phospholipiden in den Alveolen kommt, was mit einer ausgeprägten respiratorischen Dysfunktion einhergeht.

In vielen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass das menschliche Proteasomensystem maßgeblich am Abbau und am Stoffwechsel von intra- sowie extrazellulären Proteinen beteiligt ist. Dies trifft sowohl bei physiologischen Vorgängen als auch bei pathophysiologischen Prozessen im Rahmen von Erkrankungen zu.

In dieser Arbeit wurden bei Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose Proben aus der bronchoalveolären Lavage und dem Serum gesammelt und im Anschluss daran die Konzentration und die Enzymaktivität des 20S Proteasoms bestimmt.

Ebenso wurden Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt.

Die gewonnenen Ergebnisse wurden unter verschiedenen Fragestellungen betrachtet:

1. Können die vorbeschriebenen, erhöhten Proteinkonzentrationen in den BAL-Proben von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose im Vergleich zu lungengesunden Probanden auch in dieser Arbeit bestätigt werden?

2. Lassen sich in den BAL-Proben der an PAP erkrankten Probanden erhöhte Konzentrationen an 20S Proteasom nachweisen?
3. Korrelieren die Befunde von den BAL-Proben mit den Ergebnissen der Serum-Untersuchungen?
4. Wie verhält sich die Aktivität der einzelnen katalytischen Zentren des Proteasoms bei Patienten mit einer PAP?
5. Gibt es Zusammenhänge der Proteasomkonzentration / -aktivität in Bezug auf das Rauchverhalten der untersuchten Personen?
6. Lassen sich Rückschlüsse von der Proteasomkonzentration auf die Krankheitsaktivität oder den Therapieerfolg bei PAP-Patienten ziehen?

2 Material und Methoden

2.1 Studienkohorte

In den Jahren 2010 bis 2013 wurden insgesamt 31 Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose von den Mitarbeitern der Ruhrlandklinik in Essen unter Leitung von Dr. Francesco Bonella (Ruhrlandklinik, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen) behandelt und in die Studie eingeschlossen. Die Studie wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (EuPAPNet Projekt, Nr. 01GM1011A) und von der Arbeitsgemeinschaft zur Förderung der Pneumologie an der Ruhrlandklinik (AFPR) (Bonella et al., 2015).

Die Diagnose der PAP wurde gestellt mittels Durchführung einer bronchoalveolären Lavage, einer für die PAP charakteristischen hochauflösenden Computertomographie und/oder der histopathologischen Auswertung von Biopsien (Bonella et al., 2015).

Demgegenüber wurden zwei weitere Studienpopulationen untersucht. Zum einen achtzehn gesunde, nicht rauchende Kontrollpersonen ohne Vorerkrankungen (gesunde Kontrolle, GK) und des Weiteren vierzehn Patienten mit einer vorbekannten chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (kranke Kontrolle, KK). Davon zehn mit einer COPD und vier zusätzlich mit einem bereits nachgewiesenen Lungenemphysem (Bonella et al., 2015).

Im Vorfeld wurde von allen in die Studie eingeschlossenen Personen nach ausführlicher Aufklärung über die geplanten Untersuchungen eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Für die Studie liegen zwei von der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen genehmigte Ethikvoten vor. Die Nummern der Ethikvoten lauten: 06-3170 und 10-4397.

Bei den Studienteilnehmern wurden Proben mittels einer bronchoalveolären Lavage gewonnen. Aus dem gewonnenen Material wurde sowohl die Konzentration des 20S Proteasoms als auch die Enzymaktivität der katalytischen

Zentren bestimmt. Außerdem erfolgte die Messung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) und die der Gesamtproteinkonzentration (Bonella et al., 2015).

Zusätzlich wurde den Studienteilnehmern Blut entnommen und das daraus aufbereitete Serum weiter untersucht. Hierbei erfolgten ebenfalls die Konzentrationsbestimmung des 20S Proteasoms, der LDH, sowie die des GM-CSF-Antikörpertiters. Die LDH-Messung wurde im Zentrallabor der Ruhrlandklinik mittels der photometrischen Bestimmung nach IFCC (*international foundation of clinical chemistry and laboratory medicine*) -Prozedur durchgeführt.

Die Bestimmung des GM-CSF-Antikörpertiters erfolgte durch einen ELISA, ebenfalls im Zentrallabor der Ruhrlandklinik (Bonella et al., 2015).

Die demographische Aufteilung der untersuchten Personengruppen lässt sich aus der Tabelle 1 entnehmen.

Tabelle 1: Demographische Aufteilung der Studienpopulation.

Dargestellt sind die Merkmale der drei Studienpopulationen von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose (PAP), von anderen Lungenerkrankungen betroffene Patienten, sowie gesunde Personen mit Mittelwert und Standardabweichung. (Bonella et al., 2015)

	PAP (n=31)	KK (n=14)	GK (n=18)	p
Geschlecht (M/W)	14/17	8/6	7/11	ns [†]
Alter , Jahre (Mittel ± SA)	48 ± 12	53 ± 15	46 ± 21	ns [†]
BMI , kg/m ² (Mittel ± SA)	27 ± 5	25 ± 8	24 ± 1	ns [†]
Rauchgewohnheiten (n,%)				
-niemals	6 (19)	0 (0)	17 (94)	
-ex	17 (55)	9 (64)	1 (6)	
-aktuell	8 (26)	5 (36)	0 (0)	
..... <i>pack years</i> (Mittel ± SA) [§]	23 ± 22	33 ± 31	10	

Abk.: PAP = Pulmonale alveoläre Proteinose; KK = Kranke Kontrolle; GK = Gesunde Kontrolle, BMI = *Body-Mass-Index*, ns = nicht signifikant, SA = Standardabweichung

† Chi-Quadrat Test; Student's T-Test für alle anderen Vergleiche.

§ Mittelwert berechnet aus Rauchern und Ex-Rauchern

2.2 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde von Dr. Francesco Bonella und seinen Mitarbeitern (Ruhrlandklinik, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen), mittels eines fiberoptischen Bronchoskopes gemäß den etablierten Richtlinien durchgeführt (Haslam and Baughman, 1999; Klech H and Hutter, C, 1990).

Bei der Prozedur wurde den Personen der gesunden und kranken Kontrolle insgesamt 100-120 ml sterile isotonische Kochsalzlösung in den rechten Mittellappen und die linke Lingula gegeben und anschließend unverzüglich wieder aspiriert. Bei den PAP-Patienten wurden 100-150 ml isotonische Kochsalzlösung verwendet, direkt vor der Durchführung der therapeutischen Lungenspülung. Die zurück gewonnene BAL-Flüssigkeit (*Recovery*) betrug durchschnittlich 49 ± 11 %. Die BAL-Flüssigkeit wurde durch zwei Lagen sterile Kompressen gefiltert und im Anschluss daran in der Zentrifuge bei 500 g für 10 Minuten bei 4°C von den Zellen separiert. Der gewonnene Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Bonella et al., 2015). Später wurden aus diesem Überstand die Proteasomkonzentration und die Enzymaktivität bestimmt. Die Zellpellets wurden für spätere Zellzählungen oder Zellkulturen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = *phosphate-buffered saline*) re-suspendiert. Letztere ist eine isotonische Pufferlösung, die das Arbeiten bei einem konstantem pH-Wert von 7,4 ermöglicht (Bonella et al., 2015).

2.3 Messung der Konzentration des 20S Proteasoms mittels ELISA

Die Konzentrationsbestimmungen des 20S Proteasoms wurden sowohl im Serum aller Probanden als auch in der BAL-Flüssigkeit der Kontrollgruppen und von 25 PAP Patienten durchgeführt. Dies erfolgte mit Hilfe eines für diesen Zweck modifizierten *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Bonella et al., 2015). Im ersten Schritt wurde eine Mikrotitrationsplatte mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen die Proteasomuntereinheit α_6 (Biomol International L.P., Exeter, UK) in der Verdünnung 1:4500 in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, FRG), bei pH

7,4 über Nacht inkubiert. Es wurden 100 µl/well titriert. Vor Durchführung des nächsten Schrittes wurden die wells der Mikrotitrationsplatte 4 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Mikrotitrationsplatte mit einem Blockreagenz bestückt (50 ml PBS + 0,5 g Skin Milk Powder) und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattenrüttler bei kleiner Stufe inkubiert. Dieser Schritt soll unspezifische Bindungen ungewünschter Antikörper verhindern.

Nachfolgend wurde die Mikrotitrationsplatte erneut 4 x mit PBS gewaschen.

Die Patientenproben wurden unterschiedlich verdünnt. Das Serum der beiden Kontrollgruppen wurde 1:5 mit PBST-BSA-Puffer (PBS, Tween 20, 0,1%, und 1% bovines Serumalbumin (BSA)), die entsprechende BAL-Flüssigkeit 1:1 verdünnt. Die Serumproben der PAP-Patienten wurden 1:10, die BAL-Proben 1:1 mit PBST-BSA-Puffer verdünnt (Bonella et al., 2015).

Die Proben wurden in doppelter Ausführung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und bei Raumtemperatur drei Stunden inkubiert. Es wurde je 100 µl Probe/well aufgetragen. Aus den Ergebnissen wurde später der Mittelwert errechnet.

Für jede Messreihe wurde eine Standardkurve angelegt. Dafür wurde das 20S Proteasom Standard (Biomol International L.P., Exeter, UK) in acht Verdünnungsschritten mit einer Konzentration von 2500 ng/ml bis 19,5 ng/ml mit PBS-T (PBS und Tween 20, 0,1%) verdünnt. Der Standard wurde in dreifacher Ausführung aufgetragen. Die wells wurden erneut 4 x mit PBS-T gewaschen. Daraufhin wurden 100µl eines monoklonalen Kaninchen-Antikörpers, der an das 20S Proteasom bindet (Biomol International L.P., Exeter, UK), in einer Verdünnung mit PBS-T von 1:4000 aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut folgten vier weitere Waschschriffe. Dann wurde für die Antigendetektion als dritter Antikörper ein Peroxidase-konjugierter IgG Maus-Antikörper (100 µl/well) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde zum Starten der Antigen-Detektion 100 µl/well Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) zugefügt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl/well H₂SO₄ gestoppt.

Zuletzt wurde die Extinktion der Farb-Reaktion in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Synergy 2 Multi-Detections Reader, Biotek, Bad Friedrichshall) (Bonella et al., 2015).

2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Es wurde die Enzymaktivität des Proteasoms aus den gewonnenen BAL-Proben gemessen. Um die Aktivität der einzelnen katalytischen Zentren des 20S Proteasoms zu bestimmen wurden verschiedenen fluorogene Substrate verwandt (Niedermann et al., 1996; Sixt et al., 2007). Ein fluorogenes Substrat ist ein Peptid, welches durch eine kurze Aminosäuresequenz mit einer fluoreszierenden Gruppe verbunden ist. Als fluoreszierende Gruppe wurde 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) verwandt, das nach Abspaltung der gebundenen Aminosäuren frei vorliegt und daraufhin fluoresziert (Khalfan et al., 1986). Die Aminosäuresequenzen der genutzten, synthetisch hergestellten Substrate wurden spezifisch von den katalytischen Zentren des 20S Proteasoms gespalten, woraufhin es zu der beschriebenen Lichtreaktion kam, die wiederum spektralphotometrisch gemessen werden konnte. Aus der Intensität der Lichtreaktion wurde im Anschluss die Enzymaktivität (katal) der katalytischen Zentren des 20S Proteasoms nach folgender Formel bestimmt: $\text{pkat} = \text{pmol/min} \times \mu\text{g}$. Angegeben wurde die spezifische Enzymaktivität in pikokatal/mg (pkat/mg) und die volumenbezogene Enzymaktivität in pikokatal/ml (pkat/ml) (Bonella et al., 2015).

Es wurden die drei bekannten Enzymaktivitäten des 20S Proteasoms mit verschiedenen fluorogenen Substraten getestet.

- Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Chtr) mit Succinyl-LLVY-AMC (Suc-LLVY-AMC) (Fa. Bachem, Schweiz)
 - Trypsin-ähnliche Aktivität (Try) mit Benzoyl-VGR-AMC (Bz-VGR-AMC) (Fa. Bachem, Schweiz) und
 - Caspase-ähnliche Aktivität mit Benzoyloxycarbonyl-LLE-AMC (Z-LLE-AMC) (Fa. Bachem, Schweiz)
- (Dahlmann et al., 2001; Dang et al., 1998; Stein et al., 1996).

Im Versuchsansatz wurden die Proben in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, die Resultate später gemittelt. Das Succinyl-LLVY-AMC wurde in einer Konzentration von 100 μM , das Benzoyl-VGR-AMC und das Benzoyloxycarbonyl-LLE-AMC je in einer Konzentration von 200 μM verwandt. Als Verdünnung wurde ein Puffer aus Tris-HCL (50 mM; 157,6 g/mol) und MgCl_2 (5 mM; 95,2 g/mol) verwandt, welcher kurz vor der Verwendung mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (1 mM; 154,2 g/mol) versetzt wurde.

Parallel zu den Aktivitätsbestimmungen wurde in einer Negativprobe jede Messung zusätzlich unter Zugabe von 10 μM Epoxomicin durchgeführt. Epoxomicin dient hierbei als spezifischer Inhibitor aller drei katalytischer Zentren des 20S Proteasom (Meng et al., 1999). Insgesamt wurde ein Volumen von 200 μl /well aufgetragen mit folgender Zusammensetzung:

- 138 μl BAL-Probe
- 20 μl fluorogenes Substrat
- 22 μl Puffer
- 20 μl H_2O oder Epoxomicin

Eine Standardkurve mit vorgegebenen Konzentrationen von AMC wurde in acht Verdünnungsschritten mit DMSO angefertigt. Die Standardkurve wies Konzentrationen von 3000 nmol/ml bis 23,43 nmol/ml auf.

Es erfolgte daraufhin die spektralphotometrische Messung der Farbextinktionen unter der Verwendung eines Plate Readers (Synergy 2 Multi-Detections Reader, Biotek, Bad Friedrichshall). Dabei wurden die Proben zunächst mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und darauffolgend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 460 nm in folgenden Zeitabständen gemessen:

0 – 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 Stunden (Bonella et al., 2015).

2.5 Messung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Prinzip von Lowry (Lowry et al., 1951). Im ersten Schritt wurden der BAL-Überstand mit 5%iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Dies erfolgte zur Beseitigung von möglichen Pufferresten, welche mit der Messung interferieren könnten. Nach der

Zentrifugierung der Proben für 25 Minuten bei 1500 g wurde das entstandene Proteinpellet in 0,1 M NaOH gelöst. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung in einem Autoanalyser (Fa. Technikon, Bad Vilbel). Der Standard wurde mit bovinem Serumalbumin etabliert (Bonella et al., 2015).

2.6 Lungenfunktionsprüfung und Blutgasanalyse

Bei den Patienten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, unter anderem vor und nach der bronchoalveolären Lavage, eine Lungenfunktionsprüfung durchgeführt. Dies erfolgte durch Dr. Francesco Bonella und dessen Mitarbeiter (Ruhrlandklinik, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen). Die Lungenfunktionsuntersuchung erfolgte in einem Bodyplethysmographen der Firma Jäger (Würzburg, Deutschland) nach internationalen Standards (Wanger et al., 2005). Neben der forcierten Vitalkapazität der Lunge, welche ein Maß für die Ausprägung von restriktiven Lungenerkrankungen ist, wurde auch die forcierte Einsekundenkapazität (FEV1) bestimmt. Diese wird ermittelt, indem nach tiefster möglicher Einatmung die Menge an Ausatemvolumen gemessen wird, welche maximal innerhalb der ersten Sekunde ausgeatmet werden kann. Die Einsekundenkapazität gibt Aufschluss über eine mögliche Obstruktion des Bronchialsystems.

Die Blutgasanalysen (BGA) wurden aus einem arteriellen Zugang in der Arteria radialis in einem heparinisierten BGA-Röhrchen entnommen. In den Proben wurden unter anderem der pH-Wert, der partielle Sauerstoffdruck und der partielle Kohlenstoffdioxiddruck mit dem Analysegerät ABL800 FLEX (Fa. Radiometer, Willich) bestimmt (Bonella et al., 2015).

2.7 Diffusionskapazität der Lunge

Ebenfalls wurde bei den Patienten die alveoläre Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO) (DLCO = *diffusing capacity of the lung for carbon monoxide*) bestimmt (Bonella et al., 2015). Diese ermöglicht einen Rückschluss auf die Diffusionskapazität der Lunge für Sauerstoff (O₂). In Europa wird dieses Verfahren

als Bestimmung des Kohlenmonoxid-Transferfaktors (TLCO = *transfer factor of the lung for carbon monoxide*) bezeichnet. Grund für die unterschiedliche Namensgebung ist die Tatsache, dass mit diesem Messverfahren lediglich eine Annäherung an die tatsächliche Diffusionskapazität der Lunge ermittelt bzw. berechnet werden kann.

Erstmals wurde diese Messmethode 1957 von Roughton und Forster beschrieben, basierend auf den Arbeiten zur CO-Diffusion der Lunge von Krogh (Krogh, 1915; Roughton and Forster, 1957).

Die Durchführung des Verfahrens erfolgte nach den Leitlinien der *American Thoracic Society* ("American Thoracic Society. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). Recommendations for a standard technique--1995 update," 1995).

Bei der am häufigsten verwendeten „*single breath*“-Methode atmet der Patient mit seiner vollständigen Vitalkapazität zunächst ein Gasgemisch aus Raumluft mit 0,3% CO und 10% Helium ein. Nach ca. zehn Sekunden des Luftanhaltens erfolgt die Messung der Konzentrationen von CO und Helium in der Ausatemluft, wobei ein gewisser Anteil der zuerst ausgeatmeten Luft wegen der Kontamination mit Totraum-Volumen nicht gemessen wird. Die DLCO ergibt sich nun aus der Berechnung des gemessenen Konzentrationsabfalls des alveolären CO pro Minute unter Berücksichtigung des Alveolarvolumens der Lunge ("American Thoracic Society. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). Recommendations for a standard technique--1995 update," 1995). Die Diffusionskapazität hat die Einheit $\text{ml}_{\text{CO}}/\text{min}/\text{mmHg}$ und wird häufig angegeben in Prozent vom Soll-Wert.

Die Verwendung des CO für diese Messmethode hat den Vorteil, dass das Gas in der Atemluft und somit im Blut des Menschen, mit Ausnahme bei Rauchern, praktisch nicht vorhanden ist und nicht vom Organismus umgesetzt wird. Da Kohlenstoffmonoxid eine ungefähr 200x höhere Bindungsaffinität zu Hämoglobin als Sauerstoff hat, ist es besonders geeignet, um Rückschlüsse auf die Diffusionsfähigkeit der alveolo-kapillären Membran zu ziehen. Dennoch beeinflussen Faktoren wie die Konzentration und Bindungseigenschaften des

Hämoglobins sowie der pulmonal-kapilläre Blutfluss die Diffusionsfähigkeit, wenngleich der Einfluss dieser Größen beim Kohlenstoffmonoxid geringer ausgeprägt ist als beim Sauerstoff (Carlsen and Comroe, 1958).

Verschiedene Lungenerkrankungen führen im Rahmen ihrer jeweiligen Pathomechanismen z.B. Entzündungsprozessen zu einer Verdickung der alveolo-kapillären Membran. Bei anderen Erkrankungen kommt es z.B. zur Akkumulation von Proteinen wie bei der PAP. Folge dieser Veränderungen ist häufig eine verlängerte Diffusionsstrecke und somit eine reduzierte Diffusionskapazität (Ayers et al., 1975).

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Normalverteilung beschrieben unter Zuhilfenahme des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Die Darstellung der Messwerte erfolgte als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung. Nominale Variablen wurden in Prozent oder als absolute Zahlen präsentiert. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen erfolgte die Auswertung mittels Student's t-Test, bei nominalen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test (Bonella et al., 2015).

Zur Darstellung von Korrelationen wurden der Korrelationskoeffizient von Pearson oder Spearman genutzt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Die statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS 19 (SPSS, IBM Deutschland GmbH, Eningen) (Bonella et al., 2015).

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Die PAP-Patientenpopulation teilte sich auf in zwei weitere Gruppen. Dies waren zum einen die Patienten mit einer autoimmunen PAP ($n = 29$), bei denen in Messungen ein mittlerer GM-CSF-Titer von $48 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden konnte und zum anderen die Patienten mit einer sekundären PAP ($n = 2$). Letztere entstanden einmal auf dem Boden einer chronisch myeloischen Leukämie und einmal im Rahmen eines nephrotischen Syndroms. In der Verlaufsbeobachtung der insgesamt 31 Fälle mit PAP, verharrten zwölf Patienten im Stadium der aktiven Erkrankung, so dass sie weiterhin mittels therapeutischer Lungenlavage behandelt werden mussten. Die restlichen 19 Patienten erreichten das Stadium der vollständigen Remission, welches definiert war durch eine klinische Verbesserung ohne Therapiebedürftigkeit innerhalb der letzten 18 Monate (Bonella et al., 2015, 2013). Bezüglich des Zigarettenkonsums wiesen 81% der PAP-Patienten eine Rauchvergangenheit auf, mit einer Rauchdauer von durchschnittlich 17 ± 9 Jahren. Die Ex-Raucher waren im Durchschnitt $2 \pm 0,5$ Jahre abstinent. Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt alle weiteren Patientencharakteristika.

Tabelle 2: Demographie der Studienpopulation und deren Lungenfunktion.

Dargestellt sind die Merkmale der drei Studienpopulationen von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose (PAP), von anderen Lungenerkrankungen betroffene Patienten, sowie gesunde Personen mit Mittelwert und Standardabweichung. Neben allgemeinen Merkmalen wie Alter, Gewicht und Rauchgewohnheiten sind hier die Ergebnisse der Lungenfunktionsprüfungen zu erkennen. Es zeigen sich signifikant schlechtere Lungenfunktionsergebnisse bei den Patienten mit PAP beziehungsweise den Lungenkranken im Vergleich zu den Gesunden.

(Bonella et al., 2015)

	PAP (n=31)	KK (n=14)	GK (n=18)	p
Geschlecht (M/W)	14/17	8/6	7/11	ns [†]
Alter , Jahre (Mittel ± SA)	48 ± 12	53 ± 15	46 ± 21	ns [†]
BMI , kg/m ² (Mittel ± SA)	27 ± 5	25 ± 8	24 ± 1	ns [†]
Rauchgewohnheiten (n,%)				0,001 [†]
-niemals	6 (19)	0 (0)	17 (94)	
-ex	17 (55)	9 (64)	1 (6)	
-aktuell	8 (26)	5 (36)	0 (0)	
..... <i>pack years</i> (Mittel ± SA) [§]	23 ± 22	33 ± 31	10	
FVC , % (Mittel ± SA)	78 ± 20	80 ± 9	90 ± 23	<0,001 [*]
FEV1 , % (Mittel ± SA)	71 ± 18	68 ± 9	88 ± 9	<0,001 [*]
TLC , % (Mittel ± SA)	81 ± 16	87 ± 12	89 ± 11	0,003 ^{**}
DLCO , % (Mittel ± SA)	57 ± 23	67 ± 11	85 ± 13	<0,001 ^{***}
PaO₂ , mmHg (Mittel ± SA)	69 ± 15	70 ± 4	86 ± 14	<0,001 [*]
AaO₂ , mmHg (Mittel ± SA)	35 ± 15	24 ± 9	14 ± 6	<0,01 ^{***}

Abk.: PAP = Pulmonale alveoläre Proteinose; KK = Kranke Kontrolle; GK = Gesunde Kontrolle, BMI = *Body-Mass-Index*, FVC = Forcierte Vitalkapazität, FEV1 = Forcierte Einsekundenkapazität, TLC = Totale Lungkapazität, DLCO = Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, PaO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck, AaO₂ = Alveolär-arterieller Sauerstoffgradient, ns = nicht signifikant, SA = Standardabweichung

† Chi-Quadrat Test; Student's T-Test für alle anderen Vergleiche.

* PAP vs GK und KK vs GK

** PAP vs GK

*** für alle Vergleiche

[§] Mittelwert berechnet aus Rauchern und Ex-Rauchern

3.2 Proteinkonzentration

Bei den Messungen des Gesamtproteins in der BAL konnten signifikant erhöhte Konzentrationen bei den Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose gegenüber denen der beiden Kontrollgruppen aufgezeigt werden (2067 ± 1308 ng/ml (PAP), 125 ± 48 ng/ml (KK), 57 ± 23 ng/ml (GK), $p < 0,01$) (Bonella et al., 2015). Dies ist hinsichtlich der Krankheitsgenese der PAP leicht zu erklären.

3.3 Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL

Die Messungen der Proben der PAP-Patienten ergaben bis um das 10-fache höhere Konzentrationen von 20S Proteasom, verglichen mit den Proben der kranken Kontrollgruppe. Gleichsam erhöhte Werte ergaben sich im Vergleich der PAP-Patienten mit den Proben der gesunden Probanden. (566 ± 420 ng/ml (PAP) vs 53 ± 27 ng/ml (KK) vs 60 ± 42 ng/ml (GK) $p < 0,0001$) (Abb. 8) (Bonella et al., 2015).

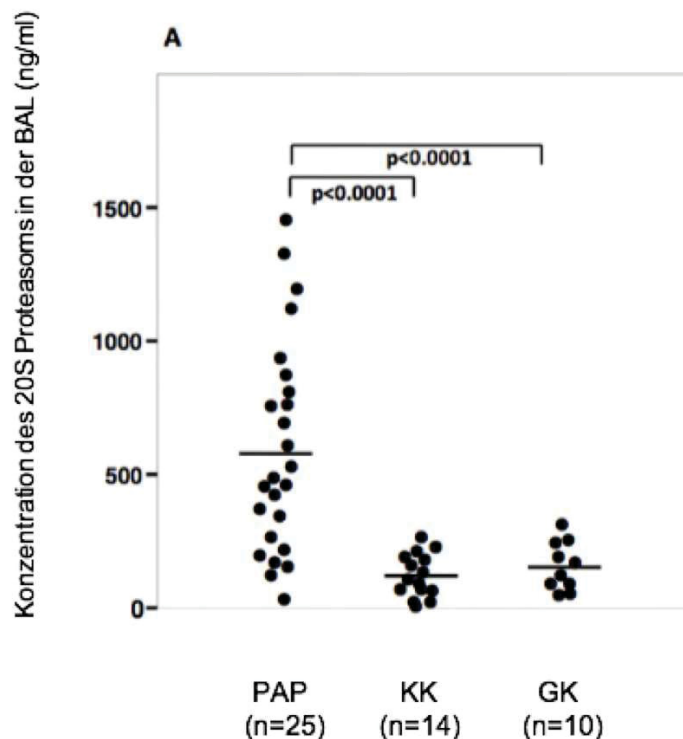


Abb. 8: Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL

Dargestellt sind die signifikant erhöhten Konzentrationen des 20S Proteasoms in der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

Jeder Punkt repräsentiert einen einzelnen Patienten. Die Balken markieren den Mittelwert.

Abk.: PAP = Pulmonale alveoläre Proteinose; KK = Kranke Kontrolle; GK = Gesunde Kontrolle (Bonella et al., 2015)

Es zeigte sich eine negative Korrelation der Höhe der Proteasomkonzentration in der BAL zum Alter der Patienten ($r = -0,56$; $p = 0,012$) (Bonella et al., 2015).

Beim Rauchverhalten konnten in der Zusammenschau aller gemessenen Patientenproben ($n = 49$) bei aktiven Rauchern in der BAL geringfügig erhöhte Proteasomkonzentrationen gegenüber den derzeit nicht rauchenden Probanden nachgewiesen werden, auch wenn diese Ergebnisse nicht signifikant waren (354 ± 313 ng/ml vs 223 ± 324 ng/ml, $p = 0,105$). Betrachtete man ausschließlich die Gruppe der PAP-Patienten, fanden sich bei denjenigen, die aktiv rauchten, ebenfalls leicht höhere Proteasomkonzentrationen als bei denen, die nicht

rauchten (676 ± 449 ng/ml vs 514 ± 410 ng/ml, $p = 0,38$). Die Messwerte der Ex-Raucher und der nativen Nichtraucher bei den PAP-Patienten lagen so dicht beieinander, dass keine Unterschiede zwischen diesen festgestellt werden konnten. Bei den BAL-Messungen der erkrankten Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls kein Unterschied in den Proteasomkonzentrationen zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Bonella et al., 2015).

Keine Unterschiede in der Konzentration des Proteasoms in der BAL konnten bezogen auf das Geschlecht festgestellt werden. Es ergab sich auch keine Korrelation zwischen der Konzentration des Proteasoms in der BAL und der Gesamtproteinkonzentration in der BAL (Abb. 9), dem *Body-Mass-Index* (BMI) (Abb. 10) oder der Laktat-Dehydrogenase im Serum (LDH), einem Marker für Zellzerfall (Abb. 11) (Bonella et al., 2015).

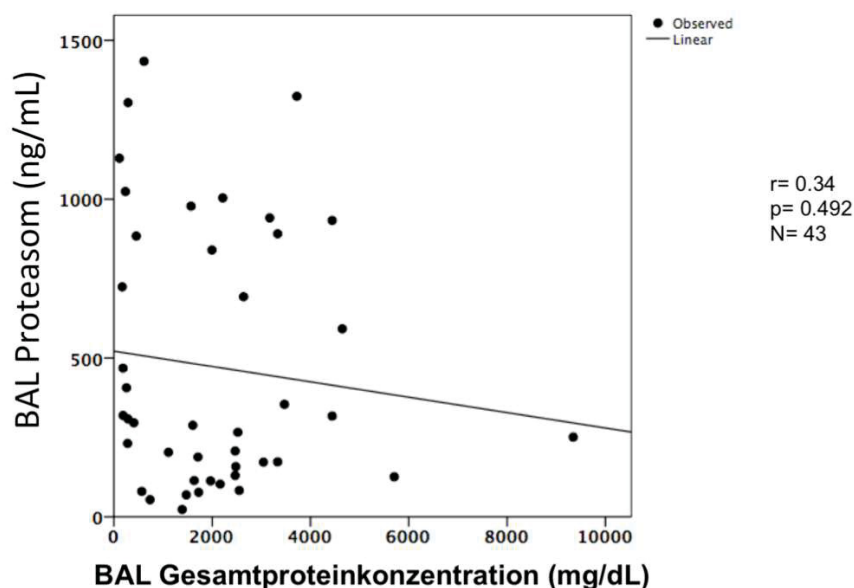


Abb. 9: Vergleich der Proteasomkonzentration mit der Gesamtproteinkonzentration in der BAL

Die Grafik zeigt, dass es keinen linearen Zusammenhang zwischen der Gesamtproteinkonzentration und der Konzentration des Proteasoms in der Bronchoalveolären Lavage gibt.

Abk.: BAL = Bronchoalveoläre Lavage
(Bonella et al., 2015)

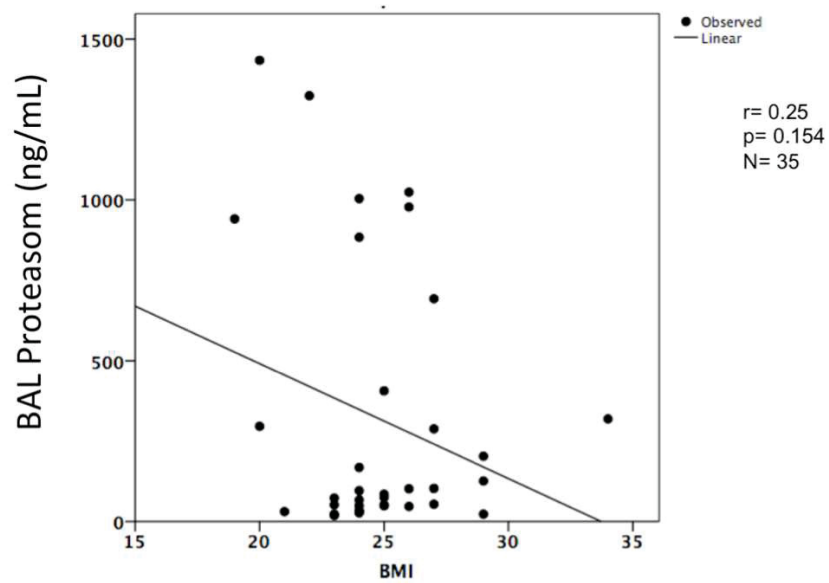


Abb. 10: Vergleich der Proteasomkonzentration in der BAL mit dem ermittelten BMI

Aus der Grafik lässt sich keine Korrelation zwischen den Proteasomkonzentrationen in der BAL und dem ermittelten BMI der Probanden ableiten.

Abk.: BAL = Bronchoalveoläre Lavage, BMI = Body-Mass-Index
(Bonella et al., 2015)

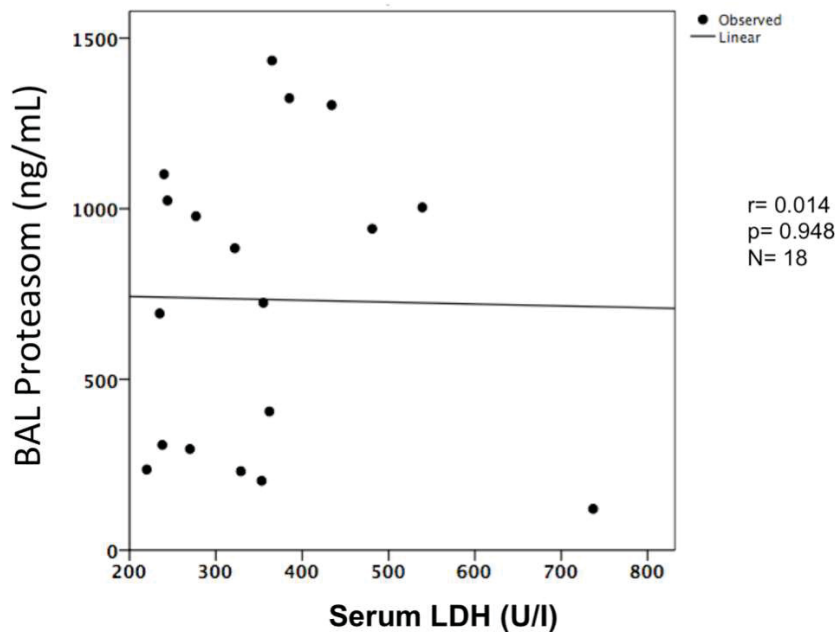


Abb. 11: Vergleich der Proteasomkonzentration in der BAL mit der Höhe der Laktatdehydrogenase im Serum

Die Grafik verdeutlicht den fehlenden linearen Zusammenhang zwischen den Proteasomkonzentrationen in der BAL und der Laktatdehydrogenase im Serum der Patienten
 Abk.: BAL = Bronchoalveoläre Lavage, LDH = Laktatdehydrogenase
 (Bonella et al., 2015)

3.4 Konzentration des 20S Proteasoms im Serum

Es zeigte sich, dass die Proteasomkonzentration im Serum von PAP-Patienten bis auf das Doppelte erhöht war, verglichen mit den gesunden Kontrollpatienten (825 ± 712 ng/ml vs 405 ± 176 ng/ml, $p = 0,018$). Auch die kranken Kontrollpatienten zeigten ähnlich erhöhte Serum-Proteasomkonzentrationen im Vergleich mit der gesunden Kontrolle (Abb. 12). Kaum Unterschiede ergaben sich hingegen bei Betrachtung der PAP-Patienten gegenüber den COPD-Patienten (Abb. 12) (Bonella et al., 2015).

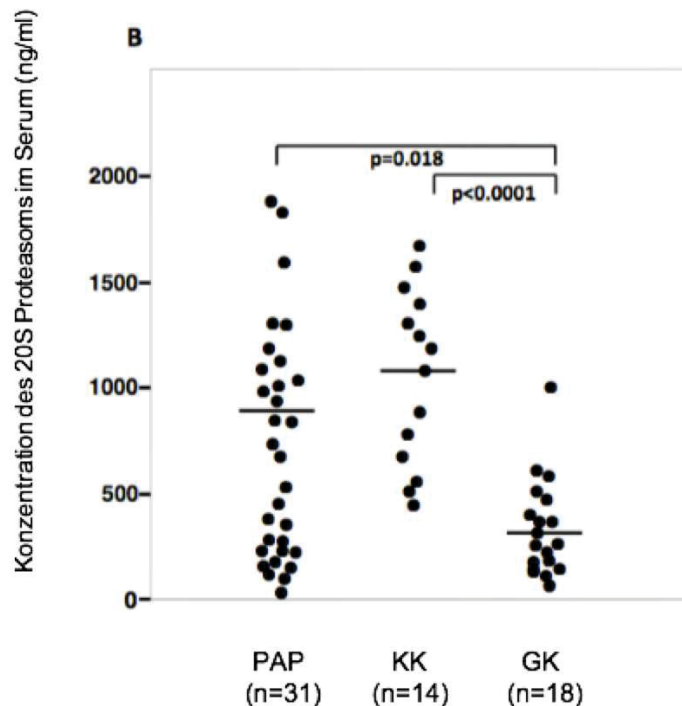


Abb. 12: Konzentration des 20S Proteasoms im Serum

Bei Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose finden sich im Serum erhöhte Konzentrationen des 20S Proteasoms gegenüber den Gesunden. Im Gegensatz dazu finden sich nur geringe Unterschiede zu den Serum-Proteasom-Konzentrationen der erkrankten Kontrollpatienten. Jeder Punkt repräsentiert einen einzelnen Patienten. Die Balken markieren den Mittelwert. Abk.: PAP = Pulmonale alveoläre Proteinose, KK = Kranke Kontrolle, GK = Gesunde Kontrolle (Bonella et al., 2015)

Diejenigen Patienten, die sich im Stadium einer aktiven, therapiebedürftigen pulmonal alveolären Proteinose befanden ($n = 12$), wiesen bis zu 300% höhere Konzentrationen an Proteasom im Serum auf als die Patienten in kompletter Remission (1317 ± 1176 ng/ml vs 439 ± 422 ng/ml, $p = 0,008$) (Bonella et al., 2015).

Eine deutlich erhöhte Proteasomkonzentration im Serum konnte ebenso bei den aktiven Rauchern unter den an PAP erkrankten Personen ($n = 8$) gemessen werden, im Gegensatz zu den Messergebnissen bei den derzeit nicht rauchenden Personen mit deutlich niedrigeren Ergebnissen ($n = 23$) (1013 ± 1113 ng/ml vs 518 ± 587 ng/ml, $p = 0,015$). Bei der Betrachtung von Ex-Rauchern vs. nativen

Nichtrauchern in dieser Gruppe ergaben sich diesbezüglich keine relevanten Unterschiede. Innerhalb der kranken Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede in den Messergebnissen für die Serum-Proteasomkonzentration abhängig vom Rauchverhalten (Bonella et al., 2015).

Wiesen die PAP-Patienten erhöhte Proteasomkonzentrationen in der BAL auf, so konnten entsprechend erhöhte Werte auch im Serum nachgewiesen werden und umgekehrt. Die positive Korrelation dieser Messergebnisse ist in Abbildung 13 dargestellt ($r = 0,48$, $p = 0,003$) (Bonella et al., 2015).

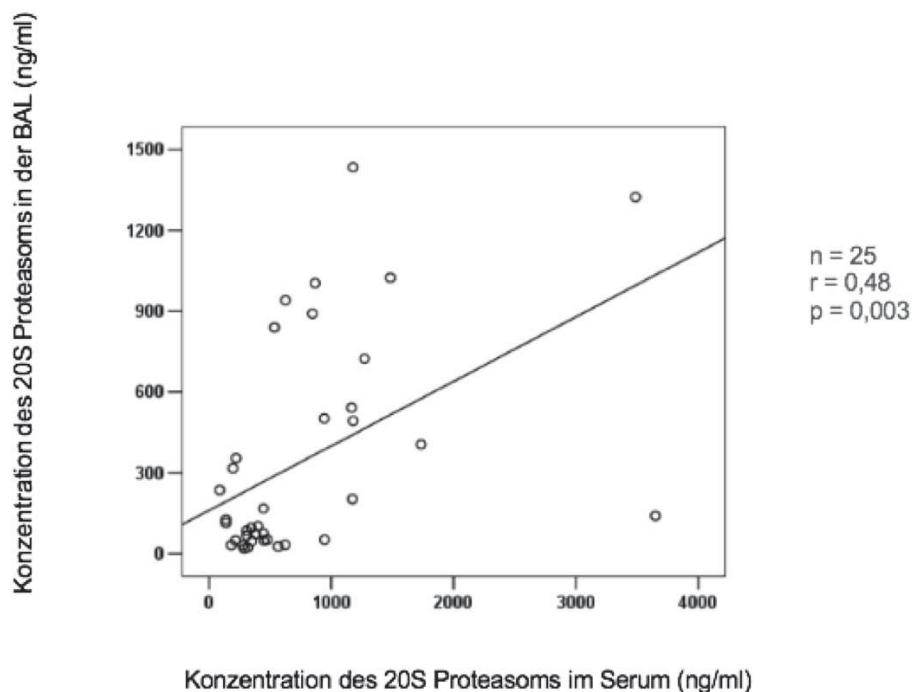


Abb. 13: Korrelation der Konzentrationen des 20S Proteasoms in der BAL und im Serum bei PAP-Patienten

Es findet sich eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen des 20S Proteasoms im Serum und in der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose. (Bonella et al., 2015)

Es ergaben sich keine erkennbaren Zusammenhänge der gemessenen Serum-Proteasomkonzentrationen im Hinblick auf das Alter, den BMI oder die Serum-LDH. Auch die Höhe der gemessenen GM-CSF Antikörpertiter bei den PAP-

Patienten mit autoimmuner Genese korrelierte nicht mit der Proteasomkonzentration im Serum (Abb. 14) (Bonella et al., 2015).

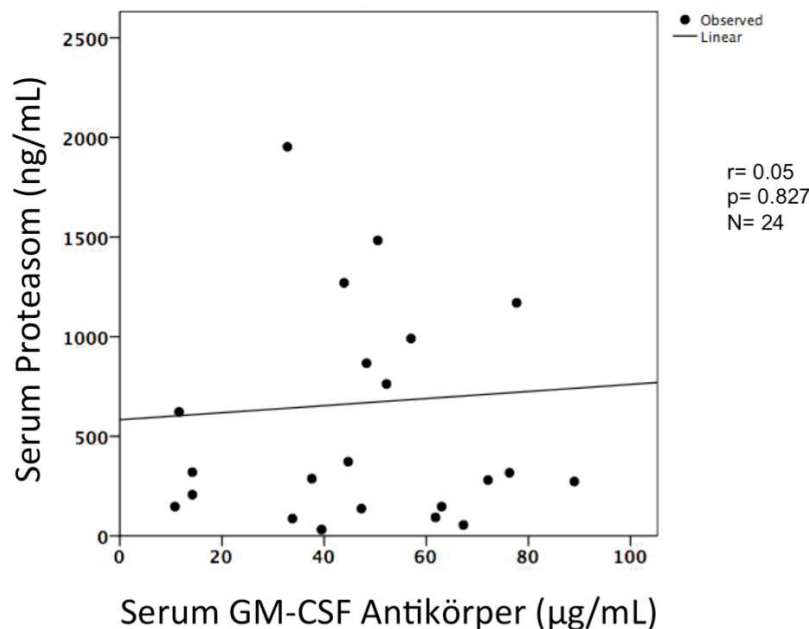


Abb. 14: Vergleich der Proteasomkonzentration im Serum zum GM-CSF Antikörpertiter

Aus der Grafik erkennt man, dass sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Proteasomkonzentration im Serum und der Menge der gemessenen GM-CSF-Antikörper bei den Patienten mit autoimmuner PAP ergibt.

Abk.: GM-CSF = *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

(Bonella et al., 2015)

3.5 Enzymaktivität des 20S Proteasoms in der BAL

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des 20S Proteasoms wurden alle Proben, wie zuvor beschrieben mit spezifischen fluorogenen Substraten versetzt und anschließend die Aktivität der drei katalytischen Zentren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, Trypsin-ähnliche Aktivität, Caspase-ähnliche Aktivität) des Proteasoms ermittelt. Gleichfalls erfolgte in einer Gegenprobe die Aktivitätsmessung nach irreversibler Blockade der Enzyme durch den hochselektiven Proteasom-Inhibitor Epoxomicin. Die Ergebnisse der Messungen aller Proben ($n = 49$) sind in der Abbildung 15 dargestellt (Bonella et al., 2015).

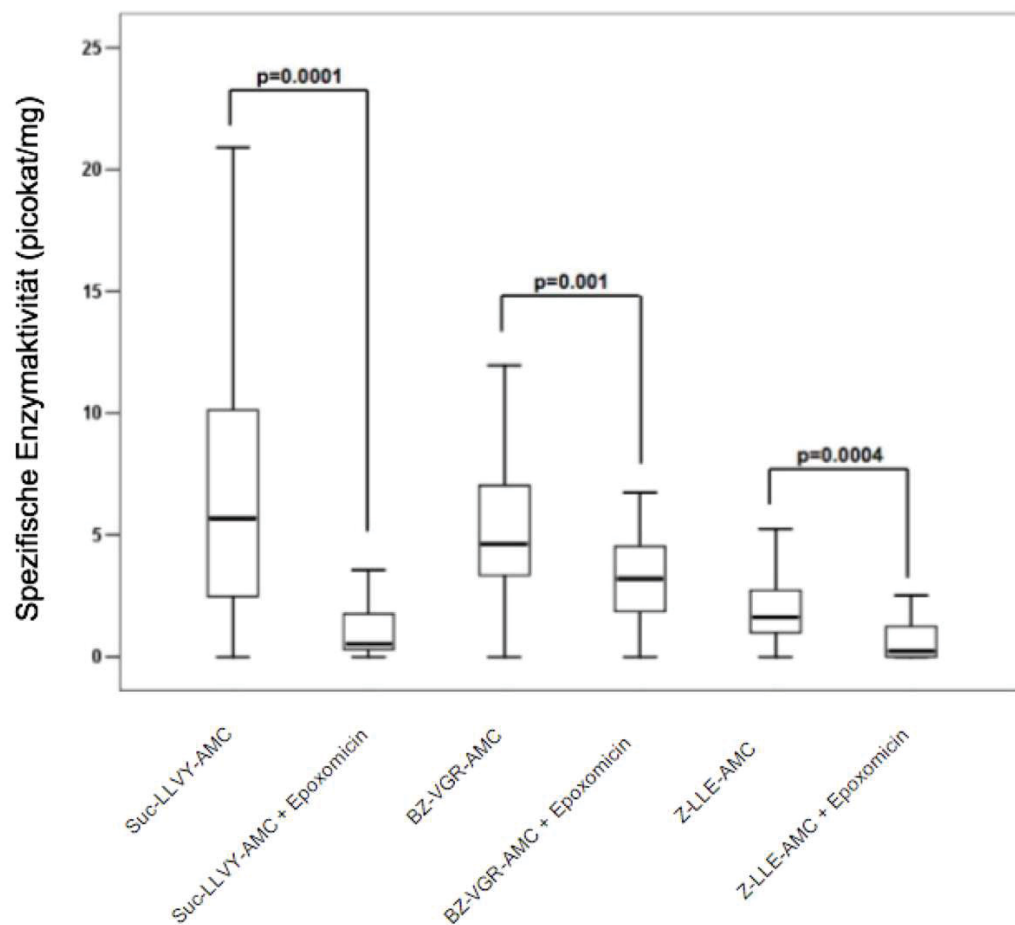


Abb. 15: Spezifische Enzymaktivität in der BAL aller Patientenproben

Spezifische Enzymaktivität der drei katalytischen Zentren mit den entsprechenden fluorogenen Substraten von allen gemessenen Patientenproben ($n = 49$) in picokatal/mg, jeweils mit und ohne Zugabe von Epoxomicin. Deutlich zeigt sich die Hemmung der Enzymaktivität durch Epoxomicin, welches ein hoch-selektiver Proteasom-Inhibitor ist. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität.

Die Balken in den Kästen markieren die Mittelwerte, die Antennen die Standardabweichung.

Suc-LLVY-AMC: Zeigt Chymotrypsin-ähnliche Aktivität an.

BZ-VGR-AMC: Zeigt Trypsin-ähnliche Aktivität an.

Z-LLE-AMC: Zeigt Caspase-ähnliche Aktivität an.

(Bonella et al., 2015)

Es zeigt sich, dass alle drei katalytischen Zentren des 20S Proteasoms signifikant durch die Zugabe von Epoxomicin in ihrer Funktion gehemmt werden, wobei der

Effekt erwartungsgemäß bei der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität besonders stark ausgeprägt ist (Bonella et al., 2015).

Die Messungen bei den PAP-Patienten ergaben für alle drei Enzymaktivitäten signifikant höhere Werte im Vergleich zu den gesunden Probanden. Dabei zeigte die Trypsin-ähnliche Aktivität (BZ-VGR-AMC) mit Abstand die höchsten Messwerte. Darauf folgte die Caspase-ähnliche Aktivität (Z-LLE-AMC) an zweiter Stelle. Auch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Suc-LLVY-AMC) ergab bei den PAP-Patienten erhöhte Werte gegenüber den gesunden Kontrollen, wobei die Differenz hier niedriger ausfiel, als bei den anderen Enzymaktivitäten. Auch beim Vergleich der PAP-Patienten zu den lungenkranken Kontrollpatienten zeigten sich die Trypsin- und die Caspase-ähnliche Aktivität signifikant erhöht. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität hingegen lag in der COPD-Gruppe durchschnittlich sogar leicht höher als bei den anderen beiden Gruppen (Tabelle 3) (Bonella et al., 2015).

Tabelle 3: Übersicht über die Konzentration des 20S Proteasoms, die 20S Proteasom Enzymaktivität (volumenbezogen), die Gesamtproteinkonzentration und die LDH im BAL Überstand

Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose (PAP) weisen signifikant erhöhte Konzentrationen an Gesamtprotein und 20S Proteasom auf als die anderen Gruppen. Die Enzymaktivität der Trypsin-ähnlichen Aktivität (BZ-VGR-AMC) ist signifikant am stärksten erhöht im Vergleich zu den erkrankten und gesunden Kontrollen. An zweiter Stelle folgt die Caspase-ähnliche Aktivität (Z-LLE-AMC), ebenfalls signifikant. Auch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Suc-LLVY-AMC) bei PAP Patienten ergab gegenüber den gesunden Kontrollen erhöhte Messwerte, die allerdings niedriger waren als die Ergebnisse der erkrankten Kontrollkohorte. Ein erniedrigter Proteasom/Protein Quotient bei PAP-Betroffenen erklärt sich aus dem massiven Anfall von proteinreichem Material in der Lunge. Die leichte Erhöhung der LDH bei PAP-Patienten lässt einen geringfügig vermehrten Zellerfall vermuten.

(Bonella et al., 2015)

	PAP (n=25)	KK (n=14)	GK (n=10)	p
Gesamtprotein , ng/ml (Mittel $\pm$ SA)	2067 $\pm$ 1308	125 $\pm$ 48	57 $\pm$ 23	<0,01*
LDH , U/l (Mittel $\pm$ SA)	49 $\pm$ 7	37 $\pm$ 11	32 $\pm$ 9	0,034**
20S Proteasom , ng/ml (Mittel $\pm$ SA)	566 $\pm$ 420	53 $\pm$ 27	60 $\pm$ 42	<0,0001*
20S Proteasom / Protein (Mittel $\pm$ SA)	0,55 $\pm$ 0,8	0,45 $\pm$ 0,18	1,35 $\pm$ 1,45	<0,05**
Suc-LLVY-AMC , pkat/ml (Mittel $\pm$ SA)	0,16 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,23	0,07 $\pm$ 0,11	0,026**
BZ-VGR-AMC , pkat/ml (Mittel $\pm$ SA)	1,86 $\pm$ 1,15	0,24 $\pm$ 0,14	0,27 $\pm$ 0,27	<0,0001*
Z-LLE-AMC , pkat/ml (Mittel $\pm$ SA)	0,97 $\pm$ 0,87	0,12 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,06	<0,01*

Abk.: PAP = Pulmonale alveoläre Proteinose; KK = Kranke Kontrolle; GK = Gesunde Kontrolle, LDH = Laktat-Dehydrogenase, SA = Standardabweichung, Suc-LLVY-AMC = Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, BZ-VGR-AMC = Trypsin-ähnliche Aktivität, Z-LLE-AMC = Caspase-ähnliche Aktivität
 Vergleiche mit Student's T-Test
 * PAP vs GK und KK
 ** PAP vs GK

Die Konzentration der LDH in der BAL zeigte sich geringfügig höher bei der PAP-Gruppe im Vergleich zu den nicht erkrankten Kontrollen, was auf einen vermehrten krankheitsbedingten Zellzerfall schließen lässt (Tabelle 3). Betrachtet man den Proteasom / Protein-Quotienten, so ist dieser bei den gesunden Probanden deutlich höher als bei den PAP-Patienten, was sich (wie bei der Gesamtproteinkonzentration) durch die Akkumulation der extrem hohen Mengen an proteinreichem Material in der Lunge der PAP-Patienten erklären lässt (Tabelle 3) (Bonella et al., 2015).

In der bronchoalveolären Lavage der PAP-Patienten korrelierte die Höhe der Konzentrationen des 20S Proteasoms direkt mit der Höhe der Aktivität aller drei katalytischen Zentren (Suc-LLVY-AMC $r = 0,504$, $p = 0,0001$; BZ-VGR-AMC $r = 0,57$, $p = 0,0004$; Z-LLE-AMC $r = 0,53$, $p = 0,0005$) (Bonella et al., 2015).

Hinsichtlich der Höhe der gemessenen LDH in der BAL oder des Rauchverhaltens der Probanden zeigte sich kein Einfluss auf die Enzymaktivität (Bonella et al., 2015).

3.6 Lungenfunktionstest und Blutgasanalyse

Sowohl bei den Patienten mit Pulmonaler Alveolarproteinose als auch bei den erkrankten Kontrollpatienten wurden im Rahmen der Diagnostik in der Ruhrland Klinik von Dr. Francesco Bonella Lungenfunktionstests und Blutgasanalysen durchgeführt. In diesem Rahmen wurde auch die Diffusionskapazität der Lunge (DLCO = *diffusing capacity of the lung for carbon monoxide*) bestimmt, deren Näherungswert in % vom Soll-Wert angegeben wurde (Bonella et al., 2015).

Es stellte sich heraus, dass bei den PAP-Patienten hohe Serumkonzentrationen an Proteasom mit einer Verringerung der forcierten Vitalkapazität (FVC) ($r = -0,322$, $p = 0,039$) einhergingen, also negativ korrelierten. Synchron dazu ergab sich eine positive Korrelation für den arteriellen CO₂-Partialdruck (PaCO₂) ($r = 0,332$, $p = 0,032$). Sowohl die reduzierte Vitalkapazität als auch der erhöhte PaCO₂ sind Merkmale für eine Verschlechterung der Lungenfunktion mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten respiratorischen Insuffizienz (Bonella et al., 2015).

Bei der Beobachtung der drei Enzymaktivitäten im BAL-Überstand der PAP-Patienten konnte eine inverse Korrelation mit der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid dargestellt werden (Suc-LLVY- AMC $r = -0,72$, $p = 0,006$; BZ-VGR- AMC $r = -0,7$, $p = 0,011$; Z-LLE-AMC $r = -0,68$, $p=0,016$). Das heißt, je höher die gemessene Aktivität der drei katalytischen Zentren ausfiel, desto schlechter funktionierte der alveoläre Gasaustausch (Abb. 16) (Bonella et al., 2015).

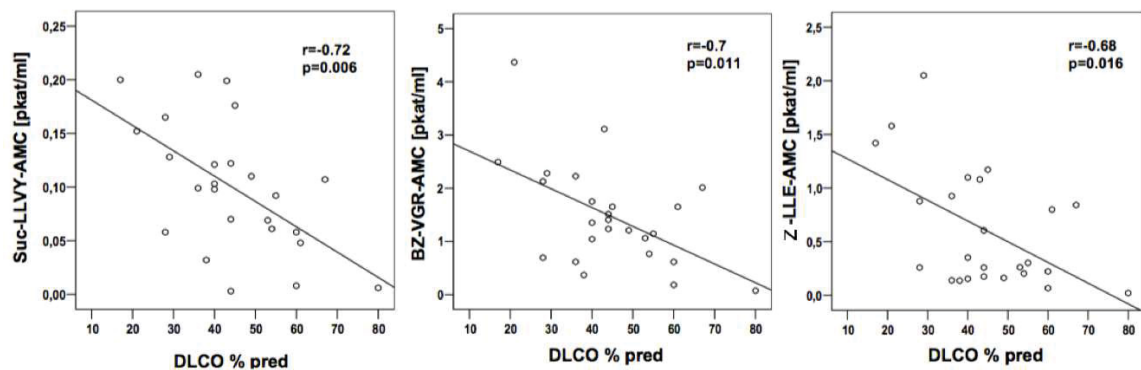


Abb. 16: Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten und der Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (in % des Soll-Wertes) bei PAP-Patienten

Die Diffusionskapazität, welche die Qualität des pulmonalen Gasaustausches beschreibt, korreliert bei allen drei katalytischen Zentren invers mit der Höhe der bestimmten Aktivität. Das heißt: Je höher die Enzymaktivität, desto schlechter der pulmonale Gasaustausch.

Abk.: DLCO = *Diffusion capacity of the lung for carbon monoxide*, pred = *predicted*
(Bonella et al., 2015)

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Proben aus der bronchoalveolären Lavage und dem Serum von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose im Hinblick auf das Vorhandensein von 20S Proteasom und die Bestimmung von dessen Enzymaktivität. Das Besondere an dieser Arbeit ist, dass die Ergebnisse der PAP-Patienten zwei unterschiedlichen Kontrollgruppen gegenübergestellt wurden. In der einen Vergleichsgruppe wurden Proben von lungengesunden Patienten untersucht. Parallel dazu wurden jedoch auch identische Messungen bei Patienten mit einer COPD-Erkrankung durchgeführt und mit den Ergebnissen der anderen Kollektive verglichen. Dadurch konnte beurteilt werden, ob die gemessenen Effekte spezifisch für die pulmonale Alveolarproteinose sind, oder ob es sich um generelle Veränderungen bei Lungenerkrankungen handelt. Diese Unterscheidung ermöglicht eine genauere Einschätzung einer diagnostischen oder therapeutischen Anwendung, zum Beispiel der Bestimmung des 20S Proteasoms. Es wurden die Proteasomkonzentrationen mittels eines ELISA bestimmt, sowie photospektrometrisch die Enzymaktivitäten der drei katalytischen Zentren des 20S Proteasoms ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer PAP um ein Vielfaches erhöhte Gesamtprotein- und 20S Proteasomkonzentrationen in der BAL aufweisen, als die lungenkranke (COPD) und gesunde Kontrollgruppe. Für die entsprechenden Konzentrationen im Serum ergaben sich signifikant höhere Werte nur im Vergleich zu den Proben der gesunden Kontrollgruppe.

Ebenso wurde gezeigt, dass in der BAL von PAP-Patienten, anders als bei den beiden Kontrollgruppen, sowohl die Trypsin-ähnliche, als auch die Caspase-ähnliche Aktivität des 20S Proteasom signifikant erhöht waren.

Auch konnte bei der PAP ein Zusammenhang zwischen der 20S Proteasomkonzentration im Serum und dem Rauchverhalten der Patienten beobachtet werden.

4.1 Ursprung des extrazellulären 20S Proteasoms

Um die Rolle des extrazellulären Proteasoms bei der Pathogenese von Erkrankungen oder der Beeinflussung von Heilungsprozessen zu erforschen, ist es wichtig, mögliche Transportmechanismen über die Zellmembran zu identifizieren.

In dieser Hinsicht ist es vor allem essentiell eine zufällige Anwesenheit des Proteasoms im Extrazellularraum durch Zelllyse als Ursache auszuschließen.

Wie bereits oben ausführlich beschrieben, konnte in aktuellen Arbeiten nachgewiesen werden, dass es verschiedene Wege für eine zielgerichtete Ausschleusung von 20S Proteasom aus der Zelle gibt und dieser Transport gesteuert stattfindet (Biggs et al., 2016; Bochmann et al., 2014; Cocucci et al., 2009; Sixt et al., 2012; Williams, 1984). Auch gelang der Nachweis für einen spezifischen, Rezeptor vermittelten Transport von Ubiquitin über die Zellmembran von Monozyten, was die These für einen vergleichbaren Transport des Proteasoms noch bekräftigt (Majetschak et al., 2006).

Was in dieser Arbeit besonders gegen die These der Zelllyse als Ursache der erhöhten Proteasomkonzentrationen im BAL-Überstand spricht, sind die verhältnismäßig niedrigen Werte aus den Messungen der LDH sowohl im BAL-Überstand, als auch in den Serum-Proben. Die LDH ist zwar bei den BAL-Proben der PAP-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden leicht erhöht, was sich jedoch aus dem generellen Krankheitsgeschehen heraus erklären lässt. Dabei liegen die LDH-Messwerte jedoch weit unter denen bei einer signifikanten Lyse von Zellen. Diese Ergebnisse entsprechen auch den Befunden aus den Untersuchungen des BAL-Überstandes bei Patienten mit einem ARDS von Sixt et al. (Sixt et al., 2009).

Betrachtet man also die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit, so kann eine Zelllyse als Ursache der hohen Proteasomkonzentrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Bonella et al., 2015).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Titel dieser Arbeit lautet „Extrazelluläres alveoläres 20S Proteasom in der bronchoalveolären Lavage und im Plasma von Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose“. Zur Identifizierung möglicher pathophysiologischer Prozesse dieses Krankheitsbildes wurden die Messergebnisse unter verschiedenen Fragestellungen betrachtet und analysiert.

4.2.1 Proteinkonzentrationen in den BAL-Proben von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose und Lungengesunden

Die Pulmonale Alveolarproteinose ist typischerweise gekennzeichnet durch eine Akkumulation von Proteinen und Phospholipiden in den Alveolen. Dabei kommt es bedingt durch gestörte Abbauprozesse zu einem alveolären Füllungssyndrom mit ausgeprägter Störung des Gasaustausches in der Lunge (Bonella and Costabel, 2015). Mittels der Proteinbestimmung nach Lowry konnten auch in dieser Arbeit bei den BAL-Proben des PAP-Kollektivs massiv erhöhte Proteinkonzentrationen bestimmt werden, die zum Teil dem 35-Fachen der Werte von Lungengesunden entsprachen. Somit konnten die Ergebnisse vorhergegangener Untersuchungen zur Proteinkonzentration bei der PAP bestätigt werden (Bonella et al., 2011; Bonella and Costabel, 2015; Carey and Trapnell, 2010).

Ein Problem bei der bronchoalveolären Lavage ist der Effekt, dass es bei dieser Methode der Probengewinnung durch die Spülung der Lunge mit steriler Kochsalzlösung zu einer Verdünnung der *epithelial lung fluid* und insbesondere der darin enthaltenen nicht zellulären Bestandteile kommt (Walters and Gardiner, 1991). Da die Durchführung der BAL zum Teil stark vom jeweiligen Untersucher abhängig ist, existieren sowohl von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, als auch von der *American Thoracic Society* Empfehlungen zu Standardisierung und Qualitätssicherung dieser Prozedur. So wird bei einer Gesamt-Spülmenge mit 100-300 ml Kochsalzlösung eine *Recovery* von mehr als 30% als Zeichen für eine gute Qualität gewertet (Costabel, 1993; Meyer et al., 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführten BAL wiesen eine *Recovery* von durchschnittlich $49 \pm 11\%$ auf, was

von einer guten Qualität der Untersuchung zeugt und für eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse spricht .

4.2.2 Erhöhte Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL von PAP-Patienten

Diese Arbeit ist nach Wissen des Autors die erste Untersuchung, die sich mit dem extrazellulären Proteasom in der BAL und dem Serum von Patienten mit einer pulmonalen alveolären Proteinose beschäftigt.

Die hier durchgeführten Messungen zeigen bei den an PAP erkrankten Personen bis zu zehnfach erhöhte Proteasomkonzentrationen im Vergleich zu den beiden gewählten Kontrollgruppen (Bonella et al., 2015).

Da die Zelllyse als Ursache ausgeschlossen wurde, muss ähnlich wie bei dem ARDS (Sixt et al., 2009) davon ausgegangen werden, dass das extrazelluläre Proteasom durch konkrete Transportmechanismen in die Alveolen gelangt.

Wie bereits mehrfach beschrieben, sind viele verschiedene Mechanismen dafür denkbar. Unter anderem wurde in einer früheren Arbeit die Sekretion des Proteasoms aus Mikrovesikeln von T-Lymphozyten beschrieben (Bochmann et al., 2014). Bonella et al. konnten in der BAL von PAP-Patienten eine deutlich erhöhte prozentuale Zahl an Lymphozyten nachweisen (Bonella et al., 2015, 2011). Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass diese eine wesentliche Quelle des extrazellulären Proteasoms in der BAL sind .

Bei Betrachtung weiterer Merkmale der Patienten zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der BAL-

Proteasomkonzentration. Warum gerade jüngere Patienten höhere Proteasomkonzentrationen aufweisen, ist unklar. Möglicherweise ist das Immunsystem dieser Gruppe aktiver und reagiert mit einer stärkeren Immunantwort als dies bei Älteren der Fall ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass bei jüngeren Patienten auf Grund des früheren Krankheitsbeginns die Erkrankung möglicherweise schwerwiegender ausfällt als bei späterem Beginn und dass somit auch höhere Proteasomkonzentrationen gemessen werden können.

Interessant ist der relativ geringe Einfluss des Rauchverhaltens auf die Höhe der BAL-Proteasomkonzentration. Sowohl bei der Betrachtung der gesamten Gruppe, als auch nur der PAP-Patienten zeigten sich lediglich gering erhöhte Konzentrationen bei Rauchern gegenüber den Nichtrauchern. Dieser Effekt scheint eher unspezifisch zu sein und könnte beispielsweise eine durch das Rauchen bedingte geringfügige Inflammation widerspiegeln (Bonella et al., 2015).

4.2.3 Nachweis hoher Serum-Konzentrationen des 20S Proteasoms

Die Auswertung der Messungen im Serum ergaben bis auf das Doppelte erhöhte Proteasomkonzentrationen beim Vergleich der PAP-Patienten mit den gesunden Patienten. Die erkrankte Kontrollgruppe wies vergleichbar erhöhte Serumkonzentrationen wie die PAP-Patienten auf (Bonella et al., 2015). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Konzentration des Proteasoms im Serum bei unterschiedlichen Erkrankungen unspezifisch erhöht ist. Glaubt man dieser Annahme, würden hohe Konzentrationen des 20S Proteasoms im Serum eine nicht näher beschriebene inflammatorische oder auch maligne Erkrankung anzeigen, ließen aber keine Rückschlüsse auf die konkrete Genese zu. Die Feststellung, dass bei den an einer COPD erkrankten Kontrollpatienten nur das Serum-Proteasom erhöht ist, nicht aber jenes in der BAL, könnte ein Hinweis auf die Funktion des Proteasoms bei PAP-Patienten sein. Diese bestünde in diesem Fall ganz konkret im Abbau der pathologisch vermehrten Proteine in der Lunge, welche bei der COPD nicht vorkommen (Bonella et al., 2015). In diesem Sinne würde bei der PAP selektiv eine Hochregulation des 20S Proteasoms im Alveolarraum erfolgen.

In der Gruppe der PAP-Patienten zeigten sich bei der genaueren Auswertung weitere Auffälligkeiten. So wurden bei Patienten, die sich klinisch im Stadium einer aktiven, therapiebedürftigen Erkrankung befanden, bis zu 300% höhere Konzentrationen an 20S Proteasom im Serum nachgewiesen als bei denen in kompletter Remission. In der Auswertung der Messungen zeigte sich weiterhin eine positive Korrelation der Höhe der Proteasomkonzentration in der BAL und dem Serum. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Menge des in der

BAL von PAP-Patienten gemessenen Proteasoms direkt abhängig von der Krankheitsaktivität ist (Bonella et al., 2015).

Diese Ergebnisse lassen möglicherweise die Verwendung der Proteasom-Serum-Spiegel als Verlaufskontrolle des Therapieerfolges zu. Das wäre eine sinnvolle Ergänzung zur Bestimmung klinischer Parameter wie der Lungenfunktionsprüfung, da sich Veränderungen im Krankheitsgeschehen unter Umständen bereits früher erkennen ließen als die langsameren, strukturellen Umbauprozesse des Lungengewebes dies zuließen.

Bei der Interpretation dieser Messwerte aus dem Serum muss jedoch beachtet werden, dass das Rauchverhalten innerhalb der PAP-Kohorte offenbar eine wichtige Rolle spielt. So konnten bei den aktiven Rauchern unter diesen Patienten Serumkonzentrationen gemessen werden, die bis auf das Doppelte der Werte von Nichtrauchern erhöht waren (Bonella et al., 2015). Das steht im Kontrast zu den nur geringfügig erhöhten Proteasomkonzentrationen von rauchenden PAP-Patienten in der BAL. Auch diese Divergenz in den Ergebnissen ließe sich dadurch erklären, dass die Ausschleusung des 20S Proteasoms in den Extrazellarraum der Lunge einer genauen Steuerung unterliegt und bei den an einer pulmonalen alveolären Proteinose Erkrankten eine gezielte Immunantwort auf die hohen Proteinmengen in der Lunge widerspiegelt. Folgt man dieser Überlegung unterläge die Regulation des 20S Proteasoms im Serum einer weniger spezifischen Kontrolle, so dass Einflüsse wie das Rauchen höhere Proteasomkonzentrationen im Serum bewirken würden.

Ein anderer Grund für diese Divergenz könnte darin liegen, dass bei der PAP die Exkretion des extrazellulären Proteasoms in den Alveolarraum bereits auf ein Maximum des Möglichen gesteigert ist und sich trotz zusätzlicher Einflussfaktoren, wie dem Rauchen, nicht mehr erhöhen lässt. Dies würde für eine Erschöpfung der Transportmechanismen in das Kompartiment sprechen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass keine Korrelation zwischen der gemessenen Proteinmenge und der Menge von Proteasom in der BAL festgestellt wurde (Abb. 9). Man könnte in diesem Zusammenhang von einer Insuffizienz der Immunantwort sprechen, da

trotz der massiven Proteinose keine weitere, synchrone Steigerung des alveolären Proteasoms erfolgt, beziehungsweise erfolgen kann (Bonella et al., 2015).

4.2.4 Hohe Enzymaktivität in der BAL bei PAP-Patienten

Bestimmt wurde die Enzymaktivität der drei an der Proteolyse beteiligten Enzymzentren. Dies sind die Trypsin-ähnliche Aktivität, die Caspase-ähnliche Aktivität und die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997; Jäger et al., 1999; Nussbaum et al., 1998). Es wurde eine Negativkontrolle mittels Epoxomicin, einem aus dem Bakterienstamm der Actinomyceten gewonnenen, irreversiblen Hemmer des Proteasoms, durchgeführt (Hanada et al., 1992; Meng et al., 1999). Dabei konnten alle drei Zentren erfolgreich in ihrer Enzymaktivität blockiert werden. Da die beschriebene Hemmung spezifisch erfolgt, kann die in den Patientenproben gemessene Aktivität als aussagekräftig gewertet werden.

In dieser Arbeit konnte für alle der drei katalytischen Zentren des 20S Proteasoms eine erhöhte Aktivität bei der PAP im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gemessen werden. Gegenüber den COPD-Patienten waren die Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität bei der PAP erhöht.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass im Rahmen der Pathophysiologie der pulmonalen alveolären Proteinose nicht nur die absolute Menge des 20S Proteasoms erhöht ist, sondern auch dessen Enzymaktivität hochreguliert ist. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Erkenntnissen beim ARDS, bei dem eine Reduktion der proteasomalen Enzymaktivität beobachtet werden konnte (Sixt et al., 2009, 2012). In der aktuellen Untersuchung ließ sich auch eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Proteasomkonzentration in der BAL und der gemessenen enzymatischen Aktivität in den Proben feststellen. Je höher also die Menge an Proteasom in den BAL-Proben war, desto mehr Enzymaktivität konnte gemessen werden (Bonella et al., 2015).

Die Ergebnisse stärken weiter die Vermutung, dass die Funktion des 20S Proteasoms im Abbau der großen Menge von Surfactantproteinen bei der alveolären Proteinose besteht. Diese Überlegung wird besonders durch eine

aktuelle Studie gestützt, bei der *in vitro* nachgewiesen wurde, dass das Proteasom in der Lage ist, komplexe Proteine wie das Surfactant Protein A (SP-A) zu spalten. Diese Fähigkeit war bislang unbekannt (Büren, 2016).

Auffallend bei der Betrachtung der Enzymaktivitätsbestimmungen in dieser Arbeit ist der sehr hohe Anteil der Trypsin-ähnlichen Aktivität in allen PAP-Proben, verglichen mit den anderen beiden katalytischen Zentren des Proteasoms. In vorherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass beim Immunoproteasom unter dem Einfluss von Zytokinen wie dem Interferon Gamma eine Veränderung der enzymatischen Aktivität auftritt. So ist beim Immunoproteasom die Trypsin-ähnliche Aktivität deutlich hochreguliert und die anderen beiden Aktivitäten im Vergleich dazu reduziert (Boes et al., 1994; Dahlmann et al., 2000; Eleuteri et al., 1997; Ustrell et al., 1995). Überträgt man diese Erkenntnisse auf die hier gemessene Enzymaktivität, so muss davon ausgegangen werden, dass ein nicht geringer Anteil des gemessenen Proteasoms dem Immunoproteasom entspricht. Da die hier verwendeten Antikörper allerdings das Standard 20S Proteasom und das Immunoproteasom gleichermaßen detektieren und nicht zwischen den Unterformen differenzieren, kann über die tatsächliche Konzentration des Immunoproteasoms nur spekuliert werden. Diese Befunde sind insofern überraschend, als dass bei der PAP anders als beim ARDS kein klassischer inflammatorischer Prozess vorliegt. Da die PAP jedoch in den meisten Fällen durch die Bildung autoimmuner Antikörper verursacht ist, könnte es im Rahmen dieser Pathophysiologie zur Bildung von Zytokinen kommen, die wiederum Einfluss auf das Proteasom nehmen. Hier ist es die Aufgabe weiterer Forschung, das Immunoproteasom in der BAL bei der pulmonalen alveolären Proteinose konkret nachzuweisen und gegebenenfalls herauszufinden, welche Zytokine für dessen Synthese verantwortlich sind.

Bezüglich des Rauchverhaltens ergab sich anders als bei der Proteasomkonzentration für die Enzymaktivität keine Beeinflussung der Ergebnisse. Eine frühere Studie zum Einfluss von Zigarettenrauch auf die Alveolarepithelien kommt hingegen zu anderen Ergebnissen. So zeigte sich dort sowohl bei Mäusen als auch in Zellen des Lungenepithels unter dem Einfluss von

Zigarettenrauch eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität des Proteasoms. Bei hohen Dosen wurden alle drei Zentren effektiv gehemmt, bei niedrigen nicht toxischen Dosen insbesondere die Trypsin-ähnliche Aktivität (Bonella et al., 2015; van Rijt et al., 2012).

Die Ergebnisse dieser Studie könnten erklären, warum bei den Patienten mit einer COPD, welche meist durch chronischen inhalativen Zigarettenkonsum entsteht (Miglino et al., 2012), ein deutlich niedrigeres Level der Trypsin-ähnlichen Aktivität festgestellt wurde. Man darf natürlich nicht vergessen, dass in der vorliegenden Arbeit eine relativ kleine Anzahl an kranken Kontroll-Patienten untersucht wurde und gegebenenfalls eine größere Zahl an Probanden weitere Ergebnisse liefern könnten.

4.2.5 Funktion des Proteasoms bei der PAP: Proteinabbau?

Im Allgemeinen dient das Proteasom im menschlichen Körper der Aufrechterhaltung vieler physiologischer Prozesse, bei denen es am Abbau von Proteinen und Peptiden beteiligt ist. Dennoch konnte, wie oben beschrieben, bei verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel Tumoren oder Autoimmunerkrankungen eine Beteiligung des Proteasoms an deren Pathophysiologie nachgewiesen werden (Egerer et al., 2002; Feist et al., 2000; Lavabre-Bertrand et al., 2001).

Es stellt sich daher die Frage, ob das Proteasom auch an der Entstehung der PAP beteiligt ist. Dies könnte beispielsweise bei der autoimmunen Form durch eine Antigenpräsentation von Bestandteilen des GM-CSF und nachfolgender Produktion von Autoantikörpern geschehen. Es sprechen jedoch Argumente gegen diese Überlegung. Zum einen ließe sich dadurch nicht die Genese der sekundären Formen der PAP erklären, bei denen die Alveolarmakrophagen nicht durch Autoantikörper in ihrer Funktion geschädigt sind. Zum anderen würde dies nicht erklären, warum die Konzentration und die Aktivität des 20S Proteasoms bei der PAP so stark erhöht sind. Bisher gibt es keinen Hinweis auf einen externen Auslöser für die ausgeprägte Produktion und Enzymaktivierung des Proteasoms (Bonella et al., 2015).

Wesentlich wahrscheinlicher ist die Erklärung der kontrollierten Hochregulierung des extrazellulären Proteasoms und dessen Aktivität in der Alveolarflüssigkeit im Sinne einer immunologischen Antwort. Die für diese Funktion möglichen Transportmechanismen wurden hier ausführlich diskutiert.

Wie zuvor beschrieben, konnten bei Patienten mit einer hohen Krankheitsaktivität auch deutlich höhere Proteasomkonzentrationen nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine inverse Korrelation der Proteasomkonzentration mit der Diffusionskapazität der Lunge der Erkrankten (Bonella et al., 2015). Diese Befunde legen ebenfalls nahe, dass es sich hier um ein reaktives Geschehen handelt und das Proteasom nicht Auslöser für die PAP ist.

Auch in anderen Arbeiten konnte eine regulierte Steigerung der proteasomalen Enzymaktivität als Antwort auf krankhafte Prozesse beobachtet werden, was diese These weiter stützt. Ein Beispiel dafür sind neuro-degenerative oder neuro-inflammatorische Erkrankungen, bei denen eine Akkumulation pathologischer Proteine vorliegt, welche unter anderem von Proteasomen abgebaut werden. Dabei konnten extrazelluläre Nukleotide als verstärkende Modulatoren des Ubiquitin-Proteasomen-Systems identifiziert werden (de Diego-García et al., 2017). Es kann derzeit nur spekuliert werden, über welche Signalwege die Regulierung des Proteasomensystems bei der PAP erfolgt. Hier besteht weiterer Untersuchungsbedarf.

4.3 Variabilität der Proteasomkonzentrationen bei Gesunden in der Literatur

Eine interessante Auffälligkeit ergibt sich bei der Betrachtung anderer Studien im Zusammenhang mit der Konzentration des 20S Proteasoms im Serum.

Vergleicht man bei diesen Arbeiten, unabhängig von der jeweiligen Fragestellung, die Proteasomkonzentrationen im Serum der gesunden Kontrollgruppen, so lassen sich dabei zum Teil erhebliche Abweichungen in der Höhe der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Studien feststellen. Bei einigen Studien wurden im Serum deutlich höhere Werte als bei der hier vorliegenden Arbeit gemessen (Henry et al., 2010; de Martino et al., 2012), wohingegen andere Arbeitsgruppen

mit dieser Arbeit vergleichbare Messergebnisse für die gesunde Studienpopulation erzielten (Egerer et al., 2002; Jakob et al., 2007; Zekri et al., 2015).

Über die Ursache dieser Varianz lässt sich nur spekulieren. So könnte zum Beispiel die Verwendung unterschiedlicher Antikörper oder ELISA-Kits der Grund für die variierenden Ergebnisse sein. Möglicherweise wurden dadurch in den Untersuchungen neben dem 20S Proteasom auch andere oder noch unbekannte Mischformen detektiert, die für die deutlich höheren Messwerte verantwortlich sind. Der Einfluss eines weiteren unbekannten Faktors auf die Höhe der Proteasomkonzentrationen bei den Kontrollpatienten ist rein spekulativ, aber durchaus denkbar.

Trotz unterschiedlicher Ergebnisse der Serum-Proteasomkonzentrationen bei den gesunden Kontrollen, wurden jedoch bei allen Arbeiten signifikante, prozentuale Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen der pathologisch veränderten Messgruppe aufgezeigt, auch wenn die absoluten Zahlen insgesamt variierten. Somit ist davon auszugehen, dass die Untersuchungen trotz inter-individueller Unterschiede aussagekräftig sind.

4.4 Limitationen

4.4.1 Studienpopulation

Die pulmonale alveoläre Proteinose ist eine sehr seltene Erkrankung mit niedriger Inzidenz, was es schwierig macht eine ausreichend große Studienpopulation zu generieren.

Durch die Zusammenarbeit mit dem Westdeutschen Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen (Ruhrlandklinik) gelang es über mehrere Jahre hinweg, eine entsprechende Kohorte von Patienten mit pulmonaler alveolärer Proteinose in die Studie einzuschließen. Angesichts der zum Teil hoch-signifikanten Messwerte kann somit trotz der relativ kleinen Fallzahl von aussagekräftigen Ergebnissen in Bezug auf die Fragestellungen ausgegangen werden.

Da einige wenige Proben von Patienten mit PAP älteren Datums waren, war es leider nicht möglich, bei allen Proben jede gewünschte Messung durchzuführen.

So ist zum Beispiel die Bestimmung der LDH mehrere Jahre nach einer Probengewinnung auf Grund von Zerfallsvorgängen fehleranfällig und daher nicht zielführend. Dementsprechend sind in vereinzelt Fällen Abweichungen zwischen der Anzahl der Messergebnisse einer Studiengruppe und deren Gesamtpopulation zu beobachten. Dieser Umstand wurde bei der Durchführung der Statistik entsprechend berücksichtigt.

4.4.2 Nachweis unterschiedlicher Proteasom-Formen

Wie bereits zuvor beschrieben, existieren neben dem 20S Proteasom unterschiedliche Mischformen, wie beispielsweise das Intermediärproteasom und das Immunoproteasom, welche unter dem Einfluss von Zytokinen neu generiert werden (Dahlmann, 2016). Die hier verwendeten Antikörper unterscheiden jedoch nicht zwischen dem 20S Proteasom und anderen Unterformen. Somit kann über das Vorhandensein anderer Subtypen des Proteasoms und deren unterschiedliche Einflüsse auf die Messergebnisse nur spekuliert werden. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass weitere Arten des Proteasoms in den untersuchten Proben vorliegen. Diese sind vermutlich ebenfalls in noch ungeklärter Weise an den pathophysiologischen Vorgängen bei der PAP beteiligt.

Die Frage nach dem Vorkommen unterschiedlicher Proteasomformen in den BAL-Proben der PAP-Patienten sollten zukünftige, weitergehende Untersuchungen ausreichend beantworten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit zeigt eindeutig, dass das Proteasom bei Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose sowohl in der bronchoalveolären Lavage, als auch im Serum in zum Teil stark erhöhten Konzentrationen vorliegt. Ebenso sind in der BAL die Aktivitäten der einzelnen katalytischen Zentren des Proteasoms in unterschiedlich ausgeprägter Weise im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht (Bonella et al., 2015).

In der Zusammenschau der hier vorgelegten Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Studien zum Proteasom ist es sehr

wahrscheinlich, dass die Funktion des Proteasoms bei der PAP im Abbau der pathologischen Proteinmassen liegt. Dafür wird das Proteasom vermutlich über spezifische Transportmechanismen in den Extrazellularraum der Lunge geschleust. Die vermehrt gefundenen T-Lymphozyten bei Patienten mit einer PAP könnten für die Produktion und Sekretion des Proteasoms verantwortlich sein (Bonella et al., 2015).

Aus dem klinischen Krankheitsbild der pulmonalen alveolären Proteinose und den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich jedoch ableiten, dass die Menge des freigesetzten 20S Proteasoms als Immunantwort nicht ausreichend ist, um der Akkumulation der intrapulmonalen Proteine entgegenzuwirken (Bonella et al., 2015).

Eine denkbare Anwendung der hier gewonnenen Erkenntnisse wäre die Konzentrationsbestimmung des 20S Proteasoms im Serum als Kontrolle für den Therapieerfolg bei der PAP. Dies könnte möglicherweise noch vor Verbesserung klinischer Parameter wie der Bodyplethysmographie und der Diffusionskapazität Hinweise auf den Verlauf der Erkrankung geben.

Unter Berücksichtigung der Überlegung, dass das Proteasom am Abbau von alveolären Proteinen bei der PAP beteiligt ist und es aufgrund der großen Menge an Proteinen zu einer Insuffizienz dieses Systems kommt, ist besonders die Überlegung einer exogenen, intrapulmonalen Zufuhr des Proteasoms interessant. Dadurch könnte der Abbau der Surfactantproteine gesteigert oder beschleunigt werden. Die Gabe könnte entweder als Inhalativum oder interventionell im Rahmen einer Lungenspiegelung erfolgen. Letztere Methode entspräche beispielsweise der lange etablierten, intrapulmonalen Gabe von Surfactant bei Frühgeborenen. Die inhalative Verabreichung des Proteasoms könnte synchron zu der bereits in Studien erfolgreich erprobten Gabe des GM-CSF bei autoimmuner PAP erfolgen (Bonella and Costabel, 2015). Die Auswirkungen einer solchen therapeutischen Anwendung des Proteasoms auf einen lebenden Organismus sind allerdings derzeit noch nicht in klinischen oder experimentellen Studien erprobt worden. Außerdem müssten für diese Anwendung auch Inhalationsgeräte entwickelt

werden, die eine suffiziente Menge an Proteasom vernebeln können, damit das Enzym bis in die Alveolen gelangt. Hier besteht weiterer intensiver Forschungsbedarf.

Das Proteasomensystem nimmt im menschlichen Organismus viele Funktionen wahr und ist sowohl an pathologischen als auch physiologischen Prozessen beteiligt. So wird beim Multiplen Myelom das Proteasom mittels Bortezomib gehemmt, um das Tumorwachstum zu stoppen (Hideshima et al., 2001).

Andererseits wird das Proteasom dringend zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase benötigt (Dahlmann, 2016). Dies erscheint zunächst widersprüchlich. Doch es gibt möglicherweise noch viele weitere unbekannte Aufgaben des Proteasoms, welche dieses im Sinne eines *moonlighting protein* erfüllt.

Moonlighting proteins sind Proteine die in unserem Organismus unterschiedliche Funktionen übernehmen in Abhängigkeit von der jeweiligen zellulären Umgebung, in der sie sich befinden (Jeffery, 1999). Dabei ist zu betonen, dass es sich nicht um Proteinvarianten aus *Splicing*-Prozessen oder post-translationalen Modifikationen handelt, sondern um das identische Protein (Jeffery, 1999). Bezogen auf das Proteasom konnte bereits bei der Basis (*base*) des 19S Regulators des 26S Proteasoms eine *moonlighting* Funktion nachgewiesen werden. Dabei ist diese Basis in Abwesenheit der restlichen Proteasombestandteile an der RNA pol III Transkription beteiligt (Jeffery, 2003).

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich das Potential für viele weitere Studien, die das Proteasom und seine Funktionen in den verschiedenen Kompartimenten des Körpers und intrazellulär fortführend untersuchen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adams, J., 2004. *Nat. Rev. Cancer* 4, 349–360.
- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L., Stein, R.L., 1998. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 333–338.
- Adams, J., Kauffman, M., 2004. *Cancer Invest.* 22, 304–311.
- Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J., 1999. *Cancer Res.* 59, 2615–2622.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., Ichihara, A., 1994. *J. Biochem. (Tokyo)* 115, 257–269.
- Asher, G., Reuven, N., Shaul, Y., 2006. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 844–849.
- Ayers, L.N., Ginsberg, M.L., Fein, J., Wasserman, K., 1975. *West. J. Med.* 123, 255–264.
- Backhaus, R., 2013.
- Bauer, D.P.C., Bonella, F., Tötsch, M., Theegarten, D., Guzman, J., Costabel, U., 2009. *Pneumol.* 6, 233–242.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E., 1998. *Cell* 92, 367–380.
- Benaroudj, N., Goldberg, A.L., 2000. *Nat. Cell Biol.* 2, 833–839.
- Ben-Dov, I., Kishinevski, Y., Roznman, J., Soliman, A., Bishara, H., Zelligson, E., Grief, J., Mazar, A., Perelman, M., Vishnizer, R., Weiler-Ravel, D., 1999. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 1, 75–78.
- Beninga, J., Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1998. *J. Biol. Chem.* 273, 18734–18742.
- Berti, R., Williams, A.J., Velarde, L.C., Moffett, J.R., Elliott, P.J., Adams, J., Yao, C., Dave, J.R., Tortella, F.C., 2003. *Neurotox. Res.* 5, 505–514.
- Biggs, C.N., Siddiqui, K.M., Al-Zahrani, A.A., Pardhan, S., Brett, S.I., Guo, Q.Q., Yang, J., Wolf, P., Power, N.E., Durfee, P.N., MacMillan, C.D., Townson, J.L., Brinker, J.C., Fleshner, N.E., Izawa, J.I., Chambers, A.F., Chin, J.L., Leong, H.S., 2016. *Oncotarget* 7, 8839–8849.
- Bingisser, R., Kaplan, V., Zollinger, A., Russi, E.W., 1998. *Chest* 113, 1718–1719.
- Bochmann, I., Ebstein, F., Lehmann, A., Wohlschlaeger, J., Sixt, S.U., Kloetzel, P.-M., Dahlmann, B., 2014. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 59–68.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U.H., Kloetzel, P.M., 1994. *J. Exp. Med.* 179, 901–909.
- Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., Tortorella, D., Goldberg, A.L., Ploegh, H., 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6629–6634.
- Bonella, F., Bauer, P.C., Griesse, M., Ohshimo, S., Guzman, J., Costabel, U., 2011. *Respir. Med.* 105, 1908–1916.
- Bonella, F., Bauer, P.C., Griesse, M., Wessendorf, T.E., Guzman, J., Costabel, U., 2012. *Eur. Respir. J.* 40, 1468–1474.
- Bonella, F., Costabel, U., 2015. *Pneumol.* 13, 4–12.
- Bonella, F., Ohshimo, S., Miaotian, C., Griesse, M., Guzman, J., Costabel, U., 2013. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 53.
- Bonella, F., Sixt, S.U., Thomassen, J., Schmidt, M., Cai, M., Mori, T., Guzman, J.,

Costabel, U., 2015. *Immunobiology* 220, 382–388.

Borie, R., Danel, C., Lainé, C., Kannengiesser, C., Crestani, B., 2015. *Médecine Sci. MS* 31, 241–244.

Breslow, A., Snow, P., Rosenberg, M.H., 1965. *Med. Ann. Dist. Columbia* 34, 209–212.

Brömme, D., Klaus, J.L., Okamoto, K., Rasnick, D., Palmer, J.T., 1996. *Biochem. J.* 315 (Pt 1), 85–89.

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) [WWW Document]. URL <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=40599> (accessed 12.7.17).

Campo, I., Mariani, F., Rodi, G., Paracchini, E., Tsana, E., Piloni, D., Nobili, I., Kadija, Z., Corsico, A., Cerveri, I., Chalk, C., Trapnell, B.C., Braschi, A., Tinelli, C., Luisetti, M., 2013. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 40.

Carey, B., Trapnell, B.C., 2010. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 135, 223–235.

Carlsen, E., Comroe, J.H., 1958. *J. Gen. Physiol.* 42, 83–107.

Carnovale, R., Zornoza, J., Goldman, A.M., Luna, M., 1977. *Radiology* 122, 303–306.

Chu-Ping, M., Vu, J.H., Proske, R.J., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N., 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 3539–3547.

Ciechanover, A., 1998. *EMBO J.* 17, 7151–7160.

Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., Hershko, A., 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 761–765.

Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J., 2009. *Trends Cell Biol.* 19, 43–51.

Costabel, U., 1993. *Pneumol. Stuttg. Ger.* 47, 607–619.

Costabel, U., Guzman, J., 2005. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. Off. J. WASOG World Assoc. Sarcoidosis Granulomatous Disord.* 22 Suppl 1, S67–73.

Costello, J.F., Moriarty, D.C., Branthwaite, M.A., Turner-Warwick, M., Corrin, B., 1975. *Thorax* 30, 121–132.

Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L., 1996. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801–847.

Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., Rock, K.L., 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 13437–13445.

Dahlmann, B., 2016. *Arch. Biochem. Biophys.* 591, 132–140.

Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., 2001. *Biochimie* 83, 295–299.

Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., Kloetzel, P.M., 2000. *J. Mol. Biol.* 303, 643–653.

Dang, L.C., Melandri, F.D., Stein, R.L., 1998. *Biochemistry* 37, 1868–1879.

DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C., Slaughter, C.A., 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 20878–20884.

Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M., 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 7059–7061.

Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S., Terlecky, L.J., 1990. *Semin. Cell Biol.* 1, 449–455.

de Diego-García, L., Ramírez-Escudero, M., Sebastián-Serrano, Á., Díaz-Hernández, J.I., Pintor, J., Lucas, J.J., Díaz-Hernández, M., 2017. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 43–51.

Dieudé, M., Bell, C., Turgeon, J., Beillevaire, D., Pomerleau, L., Yang, B., Hamelin, K., Qi, S., Pallet, N., Béland, C., Dhahri, W., Cailhier, J.-F., Rousseau, M., Duchez, A.-C., Lévesque, T., Lau, A., Rondeau, C., Gingras, D., Muruve, D., Rivard, A., Cardinal, H.,

Perreault, C., Desjardins, M., Boilard, É., Thibault, P., Hébert, M.-J., 2015. *Sci. Transl. Med.* 7, 318ra200.

Dirksen, U., Nishinakamura, R., Groneck, P., Hattenhorst, U., Noguee, L., Murray, R., Burdach, S., 1997. *J. Clin. Invest.* 100, 2211–2217.

Doepfner, T.R., Doebling, M., Kaltwasser, B., Majid, A., Lin, F., Bähr, M., Kilic, E., Hermann, D.M., 2016. *Mol. Neurobiol.*

Doepfner, T.R., Mlynarczyk-Bialy, I., Kuckelkorn, U., Kaltwasser, B., Herz, J., Hasan, M.R., Hermann, D.M., Bähr, M., 2012. *Brain J. Neurol.* 135, 3282–3297.

Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., Whitsett, J.A., 1994. *Science* 264, 713–716.

Dubray, G., Bezard, G., 1982. *Anal. Biochem.* 119, 325–329.

Duijvesz, D., Luider, T., Bangma, C.H., Jenster, G., 2011. *Eur. Urol.* 59, 823–831.

Edwards, C.M., Lwin, S.T., Fowler, J.A., Oyajobi, B.O., Zhuang, J., Bates, A.L., Mundy, G.R., 2009. *Am. J. Hematol.* 84, 268–272.

Egerer, K., Kuckelkorn, U., Rudolph, P.E., Rückert, J.C., Dörner, T., Burmester, G.-R., Kloetzel, P.-M., Feist, E., 2002. *J. Rheumatol.* 29, 2045–2052.

Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C., Orlowski, M., 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 11824–11831.

Enenkel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P.M., 1998. *EMBO J.* 17, 6144–6154.

Feist, E., Dörner, T., Kuckelkorn, U., Scheffler, S., Burmester, G., Kloetzel, P., 2000. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123, 92–97.

Fergusson, J., Landon, M., Lowe, J., Dawson, S.P., Layfield, R., Hanger, D.P., Mayer, R.J., 1996. *Neurosci. Lett.* 219, 167–170.

Ferrington, D.A., Sun, H., Murray, K.K., Costa, J., Williams, T.D., Bigelow, D.J., Squier, T.C., 2001. *J. Biol. Chem.* 276, 937–943.

Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P.-M., Krüger, E., 2007. *EMBO Rep.* 8, 1170–1175.

Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1993. *Nature* 365, 264–267.

Gaczynska, M., Rock, K.L., Spies, T., Goldberg, A.L., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9213–9217.

Glickman, M.H., Ciechanover, A., 2002. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D., 1998. *Cell* 94, 615–623.

Goldstein, L.S., Kavuru, M.S., Curtis-McCarthy, P., Christie, H.A., Farver, C., Stoller, J.K., 1998. *Chest* 114, 1357–1362.

Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M., 1996. *Immunol. Today* 17, 429–435.

Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D., 2000. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062–1067.

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R., 1997. *Nature* 386, 463–471.

Hamvas, A., Deterding, R.R., Wert, S.E., White, F.V., Dishop, M.K., Alfano, D.N., Halbower, A.C., Planer, B., Stephan, M.J., Uchida, D.A., Williams, L.D., Rosenfeld, J.A., Lebel, R.R., Young, L.R., Cole, F.S., Noguee, L.M., 2013. *Chest* 144, 794–804.

Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto, H., Konishi, M., Oki, T., 1992. *J. Antibiot. (Tokyo)* 45, 1746–1752.

Haraszti, R.A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S.A., Rockwell, H.E., Gao, F., Narain, N.R., DiFiglia, M., Kiebish, M.A., Aronin, N., Khvorova, A., 2016. *J. Extracell. Vesicles* 5, 32570.

Haslam, P.L., Baughman, R.P., 1999. *Eur. Respir. J.* 14, 245–248.

Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., Sixma, J.J., 1999. *Blood* 94, 3791–3799.

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D.H., 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 25200–25209.

Henry, L., Lavabre-Bertrand, T., Douche, T., Uttenweiler-Joseph, S., Fabbro-Peray, P., Monsarrat, B., Martinez, J., Meunier, L., Stoebner, P.-E., 2010. *Exp. Dermatol.* 19, 1054–1059.

Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., Anderson, K.C., 2001. *Cancer Res.* 61, 3071–3076.

Hochstrasser, M., 1996. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405–439.

Hochstrasser, M., 1998. *Genes Dev.* 12, 901–907.

Inoue, Y., Trapnell, B.C., Tazawa, R., Arai, T., Takada, T., Hizawa, N., Kasahara, Y., Tatsumi, K., Hojo, M., Ichiwata, T., Tanaka, N., Yamaguchi, E., Eda, R., Oishi, K., Tsuchihashi, Y., Kaneko, C., Nukiwa, T., Sakatani, M., Krischer, J.P., Nakata, K., Japanese Center of the Rare Lung Diseases Consortium, 2008. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 752–762.

Ishii, H., Tazawa, R., Kaneko, C., Saraya, T., Inoue, Y., Hamano, E., Kogure, Y., Tomii, K., Terada, M., Takada, T., Hojo, M., Nishida, A., Ichiwata, T., Trapnell, B.C., Goto, H., Nakata, K., 2011. *Eur. Respir. J.* 37, 465–468.

Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D.H., Heinemeyer, W., 1999. *J. Mol. Biol.* 291, 997–1013.

Jakob, C., Egerer, K., Liebisch, P., Türkmen, S., Zavrski, I., Kuckelkorn, U., Heider, U., Kaiser, M., Fleissner, C., Sterz, J., Kleeberg, L., Feist, E., Burmester, G.-R., Kloetzel, P.-M., Sezer, O., 2007. *Blood* 109, 2100–2105.

Jeffery, C.J., 1999. *Trends Biochem. Sci.* 24, 8–11.

Jeffery, C.J., 2003. *Trends Genet.* 19, 415–417.

Jiang, L., Song, J., Hu, X., Zhang, H., Huang, E., Zhang, Y., Deng, F., Wu, X., 2016. *J. Periodontol.* 1–19.

Johkoh, T., Itoh, H., Müller, N.L., Ichikado, K., Nakamura, H., Ikezoe, J., Akira, M., Nagareda, T., 1999. *Radiology* 211, 155–160.

Jung, T., Catalgol, B., Grune, T., 2009. *Mol. Aspects Med.* 30, 191–296.

Kavuru, M.S., Malur, A., Marshall, I., Barna, B.P., Meziane, M., Huizar, I., Dalrymple, H., Karnekar, R., Thomassen, M.J., 2011. *Eur. Respir. J.* 38.

Keller, C.A., Frost, A., Cagle, P.T., Abraham, J.L., 1995. *Chest* 108, 277–280.

Khalfan, H., Abuknesha, R., Rand-Weaver, M., Price, R.G., Robinson, D., 1986. *Histochem. J.* 18, 497–499.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L., 1999. *J. Biol. Chem.* 274, 3363–3371.

Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y., Nakata, K., 1999. *J. Exp. Med.* 190, 875–880.

Kitamura, T., Uchida, K., Tanaka, N., Tsuchiya, T., Watanabe, J., Yamada, Y., Hanaoka,

- K., Seymour, J.F., Schoch, O.D., Doyle, I., Inoue, Y., Sakatani, M., Kudoh, S., Azuma, A., Nukiwa, T., Tomita, T., Katagiri, M., Fujita, A., Kurashima, A., Kanegasaki, S., Nakata, K., 2000. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 658–662.
- Klech H, Hutter, C, 1990. *Eur. Respir. J.* 3, 937–976.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B., 2009. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.
- Kloetzel, P.M., 2001. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179–187.
- Kloetzel, P.-M., 2004. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 225–233.
- Köhler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D., 2001. *Biochimie* 83, 325–332.
- Kopp, F., Dahlmann, B., Hendil, K.B., 1993. *J. Mol. Biol.* 229, 14–19.
- Kopp, F., Hendil, K.B., Dahlmann, B., Kristensen, P., Sobek, A., Uerkvitz, W., 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2939–2944.
- Kopp, F., Steiner, R., Dahlmann, B., Kuehn, L., Reinauer, H., 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 872, 253–260.
- Krogh, M., 1915. *J. Physiol.* 49, 271–300.
- Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., 1995. *Eur. J. Immunol.* 25, 2605–2611.
- Kuckelkorn, U., Ruppert, T., Strehl, B., Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Lamer, S., Prinz, I., Drung, I., Kloetzel, P.-M., Kaufmann, S.H.E., Steinhoff, U., 2002. *J. Exp. Med.* 195, 983–990.
- Kwak, S., Masaki, T., Ishiura, S., Sugita, H., 1991. *Neurosci. Lett.* 128, 21–24.
- Lah, T.T., Durán Alonso, M.B., Van Noorden, C.J.F., 2006. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 257–279.
- Latzin, P., Tredano, M., Wüst, Y., de Blic, J., Nicolai, T., Bewig, B., Stanzel, F., Köhler, D., Bahuau, M., Griese, M., 2005. *Thorax* 60, 39–44.
- Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Carillo, S., Guiraud, I., Ouali, A., Dutaud, D., Aubry, L., Rossi, J.F., Bureau, J.P., 2001. *Cancer* 92, 2493–2500.
- Lee, D.H., Goldberg, A.L., 1998. *Trends Cell Biol.* 8, 397–403.
- Lee, K.N., Levin, D.L., Webb, W.R., Chen, D., Storto, M.L., Golden, J.A., 1997. *Chest* 111, 989–995.
- Leth, S., Bendstrup, E., Vestergaard, H., Hilberg, O., 2013. *Respirol. Carlton Vic* 18, 82–91.
- Levinson, B., Jones, R.S., Wintrobe, M.M., 1957. *Le Sang* 28, 224–225.
- Linell, F., Magnusson, B., Norden, A., 1953. *Acta Derm. Venereol.* 33, 103–122.
- Liu, C.-W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., Thomas, P.J., 2003. *Science* 299, 408–411.
- Loukissa, A., Cardozo, C., Altschuller-Felberg, C., Nelson, J.E., 2000. *Cytokine* 12, 1326–1330.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R., 1995. *Science* 268, 533–539.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luciani, F., Keşmir, C., Mishto, M., Or-Guil, M., de Boer, R.J., 2005. *Biophys. J.* 88, 2422–2432.
- Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T., Baumeister, W., 1997. *Trends Biochem. Sci.* 22, 399–404.

Majetschak, M., Ponelies, N., Hirsch, T., 2006. *Immunol. Cell Biol.* 84, 59–65.

Malur, A., Kavuru, M.S., Marshall, I., Barna, B.P., Huizar, I., Karnekar, R., Thomassen, M.J., 2012. *Respir. Res.* 13, 46.

de Martino, M., Hoetzenecker, K., Ankersmit, H.J., Roth, G.A., Haitel, A., Waldert, M., Klatte, T., 2012. *Br. J. Cancer* 106, 904–908.

Massaly, N., Francès, B., Moulédous, L., 2015. *Front. Mol. Neurosci.* 7.

Maygarden, S.J., Iacocca, M.V., Funkhouser, W.K., Novotny, D.B., 2001. *Diagn. Cytopathol.* 24, 389–395.

Mellgren, R.L., 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 29899–29903.

Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C.M., 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10403–10408.

Meyer, K.C., Raghu, G., Baughman, R.P., Brown, K.K., Costabel, U., du Bois, R.M., Drent, M., Haslam, P.L., Kim, D.S., Nagai, S., Rottoli, P., Saltini, C., Selman, M., Strange, C., Wood, B., American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease, 2012. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 1004–1014.

Miglino, N., Roth, M., Tamm, M., Borger, P., 2012. *Open Respir. Med. J.* 6, 1–13.

Miller, R.R., Churg, A.M., Hutcheon, M., Lom, S., 1984. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 312–315.

Morales, P., Pizarro, E., Kong, M., Jara, M., 2004. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 115–124.

Mueller, O., Anlasik, T., Wiedemann, J., Thomassen, J., Wohlschlaeger, J., Hagel, V., Keyvani, K., Schwieger, I., Dahlmann, B., Sure, U., Sixt, S.U., 2012. *J. Mol. Neurosci.* 46, 509–515.

Niedermann, G., King, G., Butz, S., Birsner, U., Grimm, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Eichmann, K., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8572–8577.

Nogee, L.M., Dunbar, A.E., Wert, S.E., Askin, F., Hamvas, A., Whitsett, J.A., 2001. *N. Engl. J. Med.* 344, 573–579.

Nogee, L.M., de Mello, D.E., Dehner, L.P., Colten, H.R., 1993. *N. Engl. J. Med.* 328, 406–410.

Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12504–12509.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J., 1997. *Cell* 88, 277–285.

Orlowski, M., 1990. *Biochemistry* 29, 10289–10297.

Ostrowska, H., Wojcik, C., Omura, S., Worowski, K., 1997. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 729–732.

Parker, L.A., Novotny, D.B., 1997. *Chest* 111, 1457–1458.

Peters, J.M., Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A., 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 7709–7718.

Prunk, M., Kos, J., 2016. *Curr. Med. Chem.*

Ramirez, J., 1967. *Arch. Intern. Med.* 119, 147–156.

Ramirez, J., Schultz, R.B., Dutton, R.E., 1963. *Arch. Intern. Med.* 112, 419–431.

Read, M.A., Neish, A.S., Luscinskas, F.W., Palombella, V.J., Maniatis, T., Collins, T., 1995. *Immunity* 2, 493–506.

Reed, J.A., Ikegami, M., Cianciolo, E.R., Lu, W., Cho, P.S., Hull, W., Jobe, A.H., Whitsett, J.A., 1999. *Am. J. Physiol.* 276, L556–563.

Reiss-Pistilli, M.L.V., Schuppan, D., Barroso, M.M.S., Assunção-Miranda, I., Farias, S.,

Lery, L., Bauer, M., Juliano, L., Juliano, M.A., Coelho-Sampaio, T., 2017. *Angiogenesis* 20, 125–137.

Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K.C., 2005. *N. Engl. J. Med.* 352, 2487–2498.

van Rijt, S.H., Keller, I.E., John, G., Kohse, K., Yildirim, A.Ö., Eickelberg, O., Meiners, S., 2012. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L814–L823.

Rivett, A.J., 1989. *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 1–8.

Rivett, A.J., 1993. *Biochem. J.* 291 (Pt 1), 1–10.

Rivett, A.J., Knecht, E., 1993. *Curr. Biol. CB* 3, 127–129.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L., 1994. *Cell* 78, 761–771.

Rogers, R.M., Levin, D.C., Gray, B.A., Moseley, L.W., 1978. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118, 255–264.

Roughton, F.J., Forster, R.E., 1957. *J. Appl. Physiol.* 11, 290–302.

Seymour, J.F., Begley, C.G., Dirksen, U., Presneill, J.J., Nicola, N.A., Moore, P.E., Schoch, O.D., van Asperen, P., Roth, B., Burdach, S., Dunn, A.R., 1998. *Blood* 92, 2657–2667.

Seymour, J.F., Presneill, J.J., 2002. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 215–235.

Seymour, J.F., Presneill, J.J., Schoch, O.D., Downie, G.H., Moore, P.E., Doyle, I.R., Vincent, J.M., Nakata, K., Kitamura, T., Langton, D., Pain, M.C., Dunn, A.R., 2001. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 524–531.

Shoji, N., Ito, Y., Kimura, Y., Nishimaki, J., Kuriyama, Y., Tauchi, T., Yaguchi, M., Payzulla, D., Ebihara, Y., Ohyashiki, K., 2002. *Leuk. Res.* 26, 591–595.

Shringarpure, R., Grune, T., Davies, K.J., 2001. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1442–1450.

Shulenin, S., Noguee, L.M., Annilo, T., Wert, S.E., Whitsett, J.A., Dean, M., 2004. *N. Engl. J. Med.* 350, 1296–1303.

Sijts, E.J. a. M., Kloetzel, P.M., 2011. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 1491–1502.

Sixt, S.U., Adamzik, M., Spyrka, D., Saul, B., Hakenbeck, J., Wohlschlaeger, J., Costabel, U., Kloss, A., Giesebrecht, J., Dahlmann, B., Peters, J., 2009. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 1098–1106.

Sixt, S.U., Alami, R., Hakenbeck, J., Adamzik, M., Kloß, A., Costabel, U., Jungblut, P.R., Dahlmann, B., Peters, J., 2012. *Mediators Inflamm.* 2012.

Sixt, S.U., Beiderlinden, M., Jennissen, H.P., Peters, J., 2007. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1280–L1288.

Sixt, S.U., Costabel, U., Bonella, F., Grunert, K., Alami, R., Hakenbeck, J., Bauer, P., Dahlmann, B., Schmid, K.W., Peters, J., Wohlschlaeger, J., 2014. *Respir. Med.* 108, 1534–1541.

Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., Dunn, A.R., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5592–5596.

Stein, R.L., Melandri, F., Dick, L., 1996. *Biochemistry* 35, 3899–3908.

Stoebner, P.-E., Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Guiraud, I., Carillo, S., Dandurand, M., Joujoux, J.-M., Bureau, J.-P., Meunier, L., 2005. *Br. J. Dermatol.* 152, 948–953.

Stohwasser, R., Giesebrecht, J., Kraft, R., Müller, E.C., Häusler, K.G., Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Kloetzel, P.M., 2000. *Glia* 29, 355–365.

Stohwasser, R., Standera, S., Peters, I., Kloetzel, P.M., Groettrup, M., 1997. *Eur. J. Immunol.* 27, 1182–1187.

Suzuki, T., Sakagami, T., Rubin, B.K., Noguee, L.M., Wood, R.E., Zimmerman, S.L., Smolarek, T., Dishop, M.K., Wert, S.E., Whitsett, J.A., Grabowski, G., Carey, B.C., Stevens, C., van der Loo, J.C.M., Trapnell, B.C., 2008. *J. Exp. Med.* 205, 2703–2710.

Suzuki, T., Sakagami, T., Young, L.R., Carey, B.C., Wood, R.E., Luisetti, M., Wert, S.E., Rubin, B.K., Kevill, K., Chalk, C., Whitsett, J.A., Stevens, C., Noguee, L.M., Campo, I., Trapnell, B.C., 2010. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1292–1304.

Takeuchi, J., Toh-e, A., 1997. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 42, 2247–2254.

Tazawa, R., Trapnell, B.C., Inoue, Y., Arai, T., Takada, T., Nasuhara, Y., Hizawa, N., Kasahara, Y., Tatsumi, K., Hojo, M., Ishii, H., Yokoba, M., Tanaka, N., Yamaguchi, E., Eda, R., Tsuchihashi, Y., Morimoto, K., Akira, M., Terada, M., Otsuka, J., Ebina, M., Kaneko, C., Nukiwa, T., Krischer, J.P., Akazawa, K., Nakata, K., 2010. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 1345–1354.

Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J., Adams, J., 1999. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 2638–2645.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M., 2000. *EMBO J.* 19, 94–102.

Ustrell, V., Pratt, G., Rechsteiner, M., 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 584–588.

Vaithilingam, I.S., McDonald, W., Malott, D.W., Del Maestro, R.F., 1995. *J. Biol. Chem.* 270, 4588–4593.

Wada, M., Kosaka, M., Saito, S., Sano, T., Tanaka, K., Ichihara, A., 1993. *J. Lab. Clin. Med.* 121, 215–223.

Walters, E.H., Gardiner, P.V., 1991. *Thorax* 46, 613–618.

Wang, B.M., Stern, E.J., Schmidt, R.A., Pierson, D.J., 1997. *Chest* 111, 460–466.

Wanger, J., Clausen, J.L., Coates, A., Pedersen, O.F., Brusasco, V., Burgos, F., Casaburi, R., Crapo, R., Enright, P., van der Grinten, C.P.M., Gustafsson, P., Hankinson, J., Jensen, R., Johnson, D., Macintyre, N., McKay, R., Miller, M.R., Navajas, D., Pellegrino, R., Viegi, G., 2005. *Eur. Respir. J.* 26, 511–522.

Williams, M.C., 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 6054–6058.

Wylam, M.E., Ten, R., Prakash, U.B.S., Nadrous, H.F., Clawson, M.L., Anderson, P.M., 2006. *Eur. Respir. J.* 27, 585–593.

Xipell, J.M., Ham, K.N., Price, C.G., Thomas, D.P., 1977. *Thorax* 32, 104–111.

Zekri, A.-R., Youssef, A.S.E.-D., Bakr, Y.M., Gabr, R.M., El-Rouby, M.N.E.-D., Hammad, I., Ahmed, E.A.E.-M., Marzouk, H.A.E.-H., Nabil, M.M., Hamed, H.A.E.-H., Aly, Y.H.A., Zachariah, K.S., Esmat, G., 2015. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 1281–1287.

Zoeger, A., Blau, M., Egerer, K., Feist, E., Dahlmann, B., 2006. *Clin. Chem.* 52, 2079–2086.

1995. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 2185–2198.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des 20S Proteasoms	3
Abb. 2: Aufbau des 26S Proteasoms	6
Abb. 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System	8
Abb. 4: Transformation des Immunoproteasoms	10
Abb. 5: Aktivierungsweg eines Alveolarmakrophagen	21
Abb. 6: Radiologische Befunde bei einer pulmonalen alveolären Proteinose	23
Abb. 7: Befunde in der bronchoalveolären Lavage bei pulmonaler alveolärer Proteinose	24
Abb. 8: Konzentration des 20S Proteasoms in der BAL.....	41
Abb. 9: Vergleich der Proteasomkonzentration mit der Gesamtproteinkonzentration in der BAL	42
Abb. 10: Vergleich der Proteasomkonzentration in der BAL mit dem ermittelten BMI.....	43
Abb. 11: Vergleich der Proteasomkonzentration in der BAL mit der Höhe der Laktatdehydrogenase im Serum	44
Abb. 12: Konzentration des 20S Proteasoms im Serum.....	45
Abb. 13: Korrelation der Konzentrationen des 20S Proteasoms in der BAL und im Serum bei PAP-Patienten.....	46
Abb. 14: Vergleich der Proteasomkonzentration im Serum zum GM-CSF Antikörpertiter.....	47
Abb. 15: Spezifische Enzymaktivität in der BAL aller Patientenproben	48
Abb. 16: Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten und der Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (in % des Soll-Wertes) bei PAP-Patienten.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische Aufteilung der Studienpopulation.....	30
Tabelle 2: Demographie der Studienpopulation und deren Lungenfunktion.	39
Tabelle 3: Übersicht über die Konzentration des 20S Proteasoms, die 20S Proteasom Enzymaktivität (volumenbezogen), die Gesamtproteinkonzentration und die LDH im BAL Überstand	49

Danksagung

Es haben einige Personen zum Gelingen dieser Dissertationsschrift beigetragen, die ich an dieser Stelle erwähnen möchte.

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med.

Stephan Sixt, der in den letzten Jahren immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei Problemen jeder Art zur Seite gestanden hat. Seine weitreichenden Kenntnisse über das Proteasom und Lungenerkrankungen, sowie sein Blick für das Wesentliche waren für mich unverzichtbar. Ohne seine Unterstützung hätte ich meine Arbeit in dieser Form nicht vollenden können. Danke!

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer bedanken, die meine ursprüngliche Doktormutter war. Bei Fragen konnte ich jederzeit bei ihr im Institut anrufen und auf ihre fachliche Expertise und Hilfe vertrauen. Ihre Korrekturvorschläge haben meiner Arbeit den letzten Schliff gegeben.

Besonders unterstützt haben mich auch PD Dr. Dr. med. Francesco Bonella und sein Team der Ruhrlandklinik Essen. Von ihm habe ich nicht nur die Patientenproben erhalten, sondern er hat mir auch bei der Auswertung der Patientendaten sehr geholfen. Seine Kompetenz auf dem Gebiet der pulmonalen Alveolarproteinose war für mich essentiell.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. Benedikt Pannen, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, der durch die Schaffung der notwendigen Rahmenbedingungen die Durchführung dieser Doktorarbeit mit ermöglicht hat.

Aller Anfang ist schwer. Aus diesem Grund war die Hilfe seitens Jan Christoph Thomassen zu Beginn meiner Laborarbeit von unschätzbarem Wert für mich. Er hat mich in die Versuchsabläufe eingearbeitet und mich auch weiterhin im Labor unterstützt. Dafür ein großes Dankeschön.

Besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken. Sie hat mit großem Einsatz als alleinerziehender Elternteil das Fundament für meinen jetzigen Lebensweg gelegt. Mit Rat, Tat und Zuwendung steht sie mir jederzeit zur Seite. Zuletzt möchte ich meiner Frau Sonja danken für ihre stetige Unterstützung und

Zuversicht. Ist ein Tag auch noch so unerfreulich verlaufen, so vermag sie mit wenigen Worten meine Stimmung zu heben und ein Lächeln auf mein Gesicht zu zaubern.