

Aus dem Institut für Biochemie,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Das induzierbare Ubiquitin-Proteasom System in Neuronen
unter pro-inflammatorischen Bedingungen.**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Dipl.- Ing. (FH) Biotechnologie

Friederike Schröter

aus Fürth

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. P.-M. Kloetzel

2. Prof. Dr. D. Eisenhardt

3. Prof. Dr. rer. nat. T. Sommer

Datum der Disputation: 23. November 2012

Datum der Promotion: 1. Februar 2013

“Epigenetic is a useful word if you don’t know what’s going on –

If you do, you use something else.” (Adrian Bird)

Für R.W.

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Das Ubiquitin-Proteasom System.....	5
1.1.1	Das konstitutive Proteasom	5
1.1.2	Das Immunoproteasom.....	7
1.2	Interferon γ -Signalweg und seine abhängigen Faktoren.....	8
1.3	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC I).....	10
1.3.1	Antigen-Präsentation über das MHC I-Molekül	10
1.3.2	MHC I und das zentrale Nervensystem	13
1.4	Neurogenese, synaptische Transmission und Plastizität.....	13
1.4.1	Neurogenese	13
1.4.2	Synaptische Transmission, Plastizität und das UPS.....	14
1.5	Epigenetische Regulation des ZNS	18
1.5.1	DNA-Methylierung.....	18
1.5.2	DNA-Methyltransferasen.....	19
1.5.3	Methyl-CpG bindende Proteine.....	20
1.5.4	DNMTs und MBDs im ZNS	21
1.6	Multiple Sklerose und das Tiermodel experimentelle autoimmune Encephalomyelitis	22
1.7	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Geräte.....	25
2.1.1.1	Kunststoffartikel und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.1.2	Kits	25
2.1.1.3	Antikörper.....	25

2.1.1.4	Primer.....	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Zellbiologische Methoden	26
2.2.1.1	Zellkultur.....	26
2.2.1.2	Isolation und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen	26
2.2.1.3	Isolation und Kultivierung von primären Neuronen.....	27
2.2.2	Multi-Elektroden-Array Chip.....	28
2.2.3	Langzeit-Depression	28
2.2.4	Genexpressionsanalyse.....	29
2.2.4.1	RNA Isolation	29
2.2.4.2	cDNA-Synthese.....	29
2.2.4.3	Real-time PCR	30
2.2.4.4	gDNA Isolation	30
2.2.4.5	Methylierungs-spezifische PCR.....	31
2.2.5	Proteinbiochemie	31
2.2.5.1	Proteinisolation und –bestimmung	31
2.2.5.2	Western Blot Analyse und Immundetektion.....	32
2.2.5.3	Chromatin-Immunpräzipitation - CHIP	33
2.2.6	Immunfluoreszenz und –histologie.....	34
2.2.6.1	Durchflusszytometrie	36
2.2.7	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis	36
2.2.7.1	EAE Experiment	36
2.2.7.2	T-Lymphozyten-Proliferationsassay	37
2.3	Statistische Analyse	37

2.4	Software	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der Immunoproteasom-defizienten Tiere im Krankheitsverlauf der EAE	39
3.2	Immunoproteasom in differenzierten neuronalen Vorläuferzellen	45
3.3	Immunoproteasom-Expression der murinen hippocampalen Zelllinie HT-22 ...	47
3.4	Immunoproteasom in primären Neuronen	51
3.4.1	Immunoproteasom-Analyse in neuronalen P1-Kulturen.....	51
3.4.2	Epigenetische Regulation des neuronalen LMP7-Promotors.....	54
3.4.3	MHC I-Expression unter dem Einfluss der Aktivitätsinhibierung	57
3.5	Immunoproteasom und elektrische Aktivität	58
4	Diskussion.....	63
4.1	Immunoproteasom in EAE.....	63
4.2	Immunoproteasom in neuronalen Kulturen.....	66
4.2.1	Der Einfluss der DNA-Methylierung im neuronalen LMP7-Promotor	66
4.2.2	Die Assemblierung des neuronalen Immunoproteasoms in Abhängigkeit der elektrischen Impulsweiterleitung	69
4.2.3	Neuronale MHC I- und LMP7-Expression.....	73
4.3	Die synaptische Transmission und der neuronale Immunoproteasom-Komplexes	74
4.3.1	Neuronale MHC I- und Immunoproteasom-Expression in Abhängigkeit der synaptischen Plastizität.....	74
4.3.2	LMP7 und neuronale Aktivität	76
5	Zusammenfassung.....	81
6	Abstract.....	83
	Literaturverzeichnis	85
	Abkürzungen	100
	Lebenslauf.....	103

Publikationen	105
Konferenzbeiträge	106
Danksagung	107
Erklärung	108

1 Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System

Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) ist ein in allen eukaryotischen Organismen vorhandenes proteolytisches Enzymsystem mit zentralen Aufgaben in der Steuerung lebenswichtiger Prozesse wie zum Beispiel dem Zellzyklus, der Signaltransduktion, der Genexpression, der Qualitätskontrolle von Proteinen, der Proteinfaltung und der Apoptose [1], [2]. Durch die Konjugation von Ubiquitin an Proteine wird ein post-translationales Modifikationssignal ausgesendet, das abhängig von der Art der Ubiquitinierung unterschiedlichste Antworten einer Zelle hervorrufen kann [3]. Eine Markierung durch Poly-Ubiquitin-Ketten hat in der Regel den Abbau des Substrates zur Folge, während eine Mono-Ubiquitinierung zu nachgeschalteten Signaltransduktionsprozessen und Endozytose führt [4]. Folglich kann das UPS die intrazelluläre Protein-Homöostase und die Protein-Qualität, wie auch die immunologisch relevante Antigen-Prozessierung über den Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) der Klasse I (MHC I) (siehe Kapitel 1.3) kontrollieren.

1.1.1 Das konstitutive Proteasom

Das konstitutive 26S-Proteasom ist die zentrale Protein-degradierende, multi-katalytische Protease des UPS, charakterisiert als N-Terminale nukleophile Hydrolase [3]. Der 26S-Proteasom-Komplex besteht aus einem proteolytisch-aktivem Kern, dem 20S Partikel (c20S), deren Gestalt einem Fass ähnelt und aus vier Ringen mit je sieben Untereinheiten besteht. Die zwei äußeren Ringe bestehen aus den α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), die inneren zwei Ringe bilden die β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$). An jeder Öffnung des 20S-Komplexes kann ein regulatorischer 19S Partikel sitzen. Der Komplex des c20S mit zwei 19S-Komplexen formt das 26S Proteasom, dargestellt in Abb. 1.

Die Aufgabe des regulatorischen 19S Partikels besteht darin, Ubiquitin-konjugierte Proteine zu binden, diese zu de-ubiquitinieren und den Proteasom-Komplex bei der Entfaltung und der Einschleusung der Proteine zu unterstützen [3]. Der 19S Partikel besteht aus zwei Komponenten, ‚Base‘ und ‚Lid‘. Sechs Adenosintriphosphatasen (ATPasen) der Triple-A Familie und zwei non- ATPasen formen den ‚Base‘, welcher

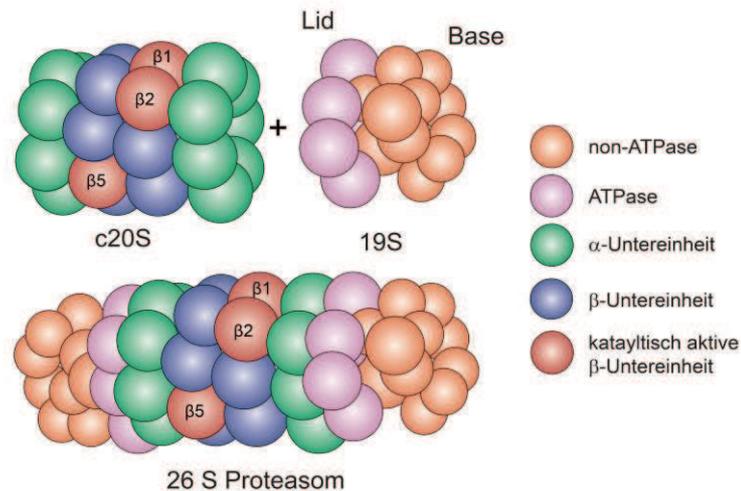


Abb. 1 Das Proteasom. Ein vollständiges Proteasom setzt sich aus dem c20S Kern und dem 19S regulatorischen Partikel zusammen. Der zentrale Kern kann sowohl von einem 19S Partikel als auch von dem PA28-Komplex gebunden werden, dargestellt in Abb. 2. Befinden sich nun zwei regulatorische Komplexe an einem c20S Kern, so spricht man von einem 26S Proteasom (entnommen von [5] und verändert). ATPase: Adenosintriphosphatase der Triple-A Familie

direkt an den α -Ring des Proteasom-Komplexes bindet. Die restlichen acht non-ATPasen modellieren das ‚Lid‘ (siehe Abb. 1, [3]).

In der zylindrischen Kammer des 20S-Partikels befindet sich das katalytisch aktive Zentrum des Proteasoms, wobei nur drei der sieben β -Untereinheiten über eine funktionelle Protease-Aktivität verfügen [3], [6], [7]. Die β -Untereinheiten $\beta 1$ (Delta), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1) besitzen nach der autokatalytischen Entfernung der Pro-Sequenzen einen Threonin-Rest am N-Terminus, der auf die Innenseite des 20S-Komplexes zeigt. Sie haben unterschiedlichen Substratbindungstaschen, die die Hydrolyse hinter sauren, basischen und hydrophoben Aminosäuren (AS) bestimmen [8]. Demgemäß weist das Proteasom drei unterschiedliche Aktivitäten auf: Caspase-ähnliche (saure AS), Trypsin-ähnliche (basische AS) und Chymotrypsin-ähnliche (hydrophobe AS). Eine Übersicht über die Art der katalytischen Aktivität und deren Hydrolyse ist in Tabelle 1 abgebildet.

Tabelle 1 Katalytische Aktivitäten der konstitutiven und immuno Untereinheiten (UE).

Konstitutive UE	Hydrolyse nach	Katalytische Aktivität	Immuno UE	Hydrolyse nach	Katalytische Aktivität
$\beta 1$	saure AS	Caspase	LMP2	hydrophob AS	Chymotrypsin
$\beta 2$	basisch AS	Trypsin	Mecl1	basisch AS	Trypsin
$\beta 3$	hydrophob AS	Chymotrypsin	LMP7	hydrophob AS	Chymotrypsin

Proteine, die an einer Poly-Ubiquitin-Kette konjugiert sind, binden über den 19S Partikel an das Proteasom und werden dort über die proteolytischen Aktivitäten in 2-25 AS verschieden lange Peptide gespalten [3]. Die Durchschnittslänge beträgt beim Proteasom-Komplex 7.4 AS, die des Immunoproteasom-Komplexes 8.6 AS, dieser Komplex wird im nächsten Abschnitt (Kapitel 1.1.2) näher erklärt. Der Abbau der Proteine erfolgt zufällig bis die Substratfragmente eine Größe erreicht haben, die das Verlassen des 20S-Partikels zulässt [9]. Peptid-Fragmente, die 8-10 AS lang sind, besitzen eine adäquate Länge, um an die Bindungs-Grube des MHC I-Moleküls zu binden [5]. Der Prozess der Antigen-Präsentation ist essentiell für die adaptive Immunantwort und wird näher im Kapitel 1.3 beschrieben.

1.1.2 Das Immunoproteasom

Das Proteasom existiert in der konstitutiven Form in allen kernhaltigen Zellen, kann aber bei Bedarf (z.B. bei Kontakt der Zelle mit Entzündungsmediatoren) durch Austausch der konstitutiven gegen die induzierbaren katalytisch-aktiven Untereinheiten in das sogenannte Immunoproteasom (iP) überführt werden.

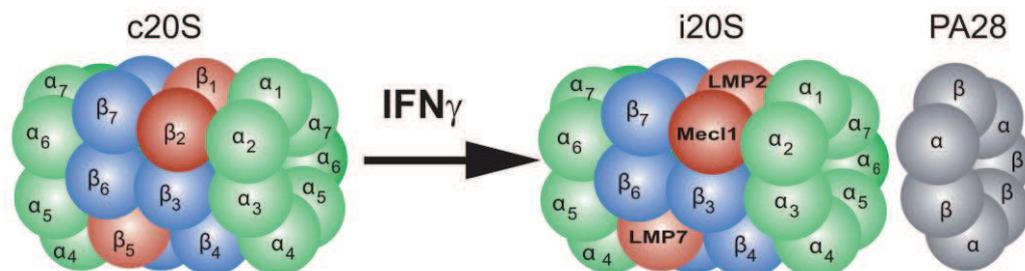


Abb. 2 Austausch der konstitutiven mit den induzierbaren Proteasom-Untereinheiten. Unter dem Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ (und vereinzelt $\text{TNF}\alpha$, LPS) werden β_1 , β_2 und β_5 durch die Inkorporation an LMP2, Mecl1 und LMP7 ersetzt. Der Proteasom-Aktivator Komplex PA28 wird unter $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation ebenfalls erhöht vorgefunden. Bild ist nach [7] modifiziert.

Der Einbau der induzierbaren Untereinheiten β_{1i} (low molecular protein 2, LMP2), β_{2i} (multicatalytic endopeptidase complex like 1, Mecl1) und β_{5i} (LMP7) (siehe Abb. 2) in den 20S-Komplex (i20S) führt zu einer veränderten Schnittspezifität des Proteasom-Komplexes (siehe Tabelle 1, [10]). Im Allgemeinen gilt, dass der Wechsel zu dem Immunoproteasom außerdem mit einer verbesserten Antigen-Präsentation einhergeht, da die Rate des Protein-Turnovers erhöht ist [11]. Im Vergleich zum c20S führt das i20S verstärkt Schnitte nach hydrophoben (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) und basischen (Trypsin-ähnliche Aktivität) AS durch, während die Schnittaktivität nach sauren AS (Caspase-ähnliche Aktivität) vermindert ist. Für zahlreiche virale MHC I-

Epitope wurde eine optimierte Epitop-Generierung durch das iP beschrieben [12], [13]. Der konsekutive Einbau der Immuno-Untereinheiten fordert eine *de novo* Assemblierung des iP [14]. Dieser kooperative Prozess findet in einer festgelegten Reihenfolge statt, die elementar für das Erstellen des Prä-Proteasomkomplexes ist. Die Integration der Mecl1-Untereinheit ist von dem Einbau der LMP2-Untereinheit abhängig [15]. Für eine vollständigen Reifung des katalytisch-aktiven iP-Komplexes ist schließlich die Anwesenheit von der LMP7-Untereinheit notwendig [16].

Die induzierbaren katalytischen Untereinheiten werden in Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs durch inflammatorische Zytokine wie Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) und Tumor-Nekrose-Faktor Alpha ($\text{TNF}\alpha$) induziert [17]. Unter diesen Bedingungen liegt der Proteasom-Komplex konstitutiv, induzierbar und in einer gemischten Form vor. In dem gemischten Proteasom-Komplex können sowohl konstitutive als auch induzierbare katalytisch-aktive β -Untereinheiten in dem 20S-Kernpartikel gefunden werden [14]. Schließlich ist das Verteilungsmuster der verschiedenen Proteasomformen auch abhängig von dem jeweiligen Gewebe. So wird das iP in Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen (DZ) und Lymphozyten konstitutiv exprimiert [18]. Dagegen ist die Existenz und Induzierbarkeit des iP in neuronalen Zellen umstritten und weitgehend nicht verstanden.

Das von T- und B-Lymphozyten sowie Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) sezernierte $\text{IFN}\gamma$ induziert mehrere Komponenten des UPS und des MHC I-Signalweges. Hierzu zählen neben den β -Untereinheiten des iP, die Kompartimente des MHC I-Moleküls (Kapitel 1.3), beide Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung-Proteine (TAP1, TAP2; näher erklärt in Kapitel 1.3.1) und der Proteasom-Aktivator PA28 (abgebildet in Abb. 2).

1.2 Interferon γ -Signalweg und seine abhängigen Faktoren

$\text{IFN}\gamma$ als ein pleiotropes Typ II Interferon interagiert mit dem Jak-STAT-Signalweg (Janus Kinase: Jak; Signal transducer and activator of transcription: STAT), steuert die transkriptionelle Gen-Regulation und induziert hierdurch zahlreiche zelluläre Programme (zusammengefasst in [19]). $\text{IFN}\gamma$, ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches während einer Entzündung von T-Lymphozyten ausgeschüttet wird, wird in

verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen moduliert. So ist bekannt, dass Multiple Sklerose (MS)-Patienten einen erhöhten IFN γ -Spiegel im Liquor aufweisen, der vom Verlauf und der Schwere des MS-Erkrankung abhängig ist [20].

IFN γ ist ein nicht-kovalentes, antiparallel orientiertes Homodimer. Eine Bindung an seinem Rezeptor (IFN γ -R1 und IFN γ -R2) führt zu einer Autophosphorylierung von Jak2, womit der Rezeptor aktiviert wird und die Phosphorylierung auf Jak1 verlagert wird. So wird gewährleistet, dass der Tyrosin-Rest am IFN γ -R1 phosphoryliert ist, so dass sich ein latentes STAT1-Molekül binden kann. Durch die entstandene Phosphorylierung eines STAT1-Paares, dissoziiert dieses Homodimer (auch Gamma-Interferon-aktivierender Faktor (GAF) genannt) vom Rezeptor, wandert in den Zellkern, um die Transkription von Genen mit einer Gamma-Interferon-aktivierten Sequenz (GAS: TTCN₍₂₋₄₎GAA) in der Promotor-Region zu initiieren oder unterdrücken. Dieser Ablauf ist in Abb. 3 dargestellt. Infolgedessen ist der IFN γ -Signalweg essentiell für eine verstärkte Immun-Überwachung während Infektionen. Das Zytokin IFN γ ist eines der hauptimmunmodulatorischen Zytokine überhaupt (zusammengefasst in [19]).

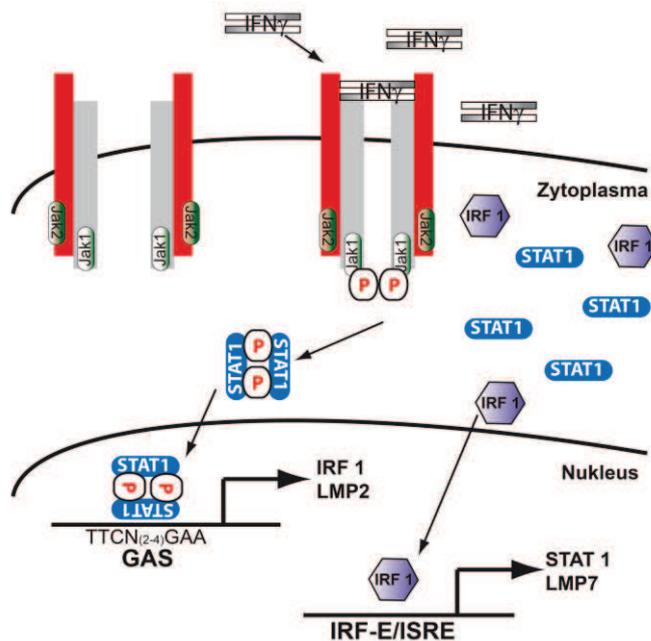


Abb. 3 IFN γ -Signalweg. Bindet der Ligand an seinen Rezeptor (IFN γ -R1 grau; IFN γ -R2 rot), kommen diese räumlich näher zusammen und die Autophosphorylierung der inaktiven Janus-Kinase (Jak) 2 führt zur Transphosphorylierung der Jak1. Somit wird eine Bindungsstelle am IFN γ -R1 für das latente STAT1 gebildet. Das IFN γ -R rekrutiertes STAT1-Paar wird ebenso phosphoryliert, was zu einer Dissoziation des STAT1-Homodimers führt. Dieser Komplex wandert in den Nukleus, um dort an der Gamma-Interferon-aktivierten Sequenz (GAS) zu binden, wodurch IFN γ -regulierte Gene inhibiert oder initiiert werden. Vorlage entnommen aus [19]. Der Transkriptionsfaktor IRF1 wird ebenfalls über den IFN γ -Signalweg stimuliert und reguliert durch das Binden an sein IRF-Element (IRF-E) bzw. Interferon-stimulierende Response Element (ISRE) weitere IFN-regulierende Gene. (Darstellung ist modifiziert nach [19])

LMP2- und LMP7-Gene, lokalisiert auf dem Locus der MHC Klasse II (MHC II) [21], besitzen eine STAT1-Bindungstelle in ihren Promotoren und die Expression wird durch den Jak-STAT-Signalweg herbeigeführt. Nicht nur die β -Untereinheiten des iPs, sondern auch die Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) werden mittels IFN γ -Stimulation induziert. Die IRF-Familie zählte früher zu den Transkriptionsfaktoren, die exklusiv durch Typ I Interferone (IFN α/β) stimuliert werden [22]. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Familie ebenso von Typ II Interferonen oder von dem TNF α /NF- κ B-Signalweg induziert werden können. IRF1 ist ein Faktor, der die anti-virale Immunantwort, die MHC I-Expression und andere immun-relevante Gene beeinflusst [23]. Erfolgt die Aktivierung von IRF1 über den IFN γ -Signalweg, so bindet sich der GAF-Komplex an das GAS-Element des IRF1-Promotors und initiiert die Transkription von IRF1. Der Transkriptionsfaktor IRF1 erkennt neben dem GAS-Element ein weiteres Bindungsmotiv, das IRF-Element (IRF-E: 5'- G(A)AAA^G/C^T/C^TGAAA^G/C^T/C-3'). Dieses Element ist ebenso in vielen Promotoren lokalisiert und mit dem Interferon-stimulierenden Response-Element (ISRE: ^A/G^GNGAAANNGAAACT), einer Typ II-Interferon empfänglichen Sequenz, identisch [19] (siehe Abb.3). IRF1 wurde im Zusammenhang mit der LMP7-Expression als ein wichtiges Bindeglied identifiziert [24]. Sowohl die LMP2- als auch die LMP7-Untereinheit besitzen ein IRF-Element in ihrem Promotor.

1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC I)

1.3.1 Antigen-Präsentation über das MHC I-Molekül

Zur immunologischen Überwachung eines multizellulären Organismus entwickelte das Immunsystem Mechanismen, während des zellulären Katabolismus produzierte Peptide an der Zelloberfläche der betreffenden Zelle anzubieten, um von Immunzellen wie zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) geprüft zu werden. Die Antigen-spezifischen Rezeptoren der Immunzellen (T-Zellrezeptor) gehen einen Komplex mit dem Peptid-beladenen MHC-Molekül ein [25]. Zwei Subklassen der T-Lymphozyten erkennen zwei unterschiedliche Antigen-Komplexe. Der MHC I-Komplex wird von CD8+ T-Lymphozyten erkannt, während das MHC II-Molekül den CD4+ T-Lymphozyten präsentiert wird. Die verdauten Peptide werden über zwei verschiedene intrazelluläre

Systeme angefertigt. Die Aufbereitung der Peptide für den MHC I-Komplex, die vornehmlich aus der laufenden Translation der jeweiligen Zellen stammen, erfolgt über den endogene Weg, das Proteasom. Die Aufbereitung für das MHC II-Molekül erfolgt über den exogenen Weg, den lysosomalen/endosomalen Verdau inkorporierter Proteine [9].

Für die MHC I-abhängige Immunüberwachung gilt, dass im gesunden Zustand die Peptid-Fragmente der normalen, autologen Gene vom Immunsystem toleriert werden. Bei pathologischen Zuständen kann es zu einer Veränderung der präsentierenden Peptide kommen. Als typisches Beispiel ist die Präsentation von Virus-Bestandteilen zu nennen, welche von MHC I restringierten CTLs als fremd erkannt werden und z. B. zur Auslösung einer Immunantwort gegen die betreffende MHC I-tragende Zelle führen kann [18].

Ein großer Teil der neu-synthetisierten Proteine in einer Zelle wird seine Funktion niemals erfüllen können, da diese Protein-Produkte aufgrund einer fehlgefalteten Struktur bzw. anhand eines Fehlers in dem Transkription- bzw. Translationsprozess an eine Poly-Ubiquitin Kette konjugiert werden. Die Poly-Ubiquitin Markierung der defekten ribosomalen Produkte (DRiPs) ruft den raschen Abbau über den Proteasom-Komplex hervor [5], [9]. Dieser Vorgang vermeidet die Anhäufung von Protein-Aggregaten in einer Zelle, die die Lebensfähigkeit beeinträchtigen können. Die DRiP-Theorie fordert einen Translations-gekoppelten Proteasom-abhängigen Abbau, der folglich auch mit der MHC I-Antigen-Präsentation verknüpft ist.

Das von dem MHC I-Molekül zu präsentierende Peptid wird sowohl vom konstitutiven als auch vom induzierbaren Proteasom generiert. Das Peptid-Fragment bindet an die Antigen-Bindungs-Grube des MHC I-Moleküls. Das MHC I-Molekül besteht aus der Membran-verlinkten schweren Kette (Domänen: $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$) und dem nicht-kovalent assoziierten β -2-Mikroglobulin ($\beta 2M$) (siehe Abb. 4). Die Antigen-Bindungs-Grube wird von der polymorphen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne der schweren Ketten gebildet und kann bis zu 300-500 verschiedene Peptide binden, die allelspezifische Konsens-Sequenzen besitzen [26]. Eine stabile MHC I-Oberflächenexpression benötigt den korrekten Zusammenbau des Peptid-Fragments mit dem MHC I-Molekül (schwere Kette und $\beta 2M$) im endoplasmatischen Retikulum (ER) [9], [27]. Der ATP-abhängige Transport des

Peptid-Fragments erfolgt aus dem Zytosol zu dem ER über die TAP-Proteine (TAP1 und TAP2). Der Ablauf ist schematisch in Abb. 4 abgebildet.

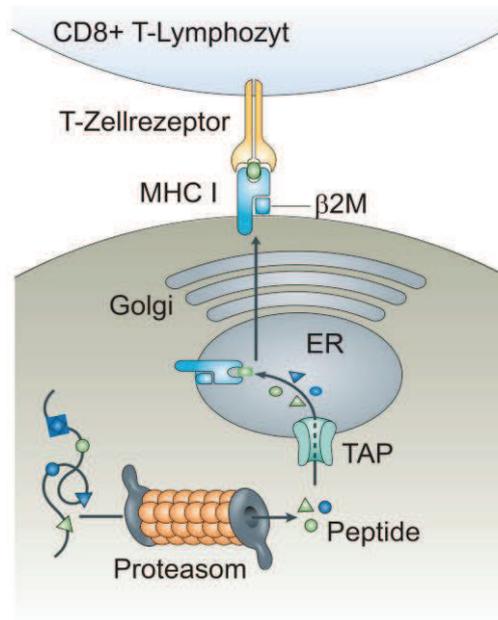


Abb. 4 Der MHC I-Signalweg. Das Proteasom verdaut die zu präsentierende Proteine aus dem Zytosol und mittels TAP-Proteine werden diese Peptide auf den MHC I-Protein im ER gebunden und an der Oberflächen v.a. den CD8+ T-Lymphozyten präsentiert. MHC I-Molekül, das zu-präsentierende Peptid und der T-Zellrezeptor bilden einen trimolekularen Komplex (entnommen von [9] und modifiziert). beta-2M: beta-2-Mikroglobulin; ER: endoplasmatisches Retikulum; TAP: Transporter-Protein assoziiert mit Antigen-Prozessierung

TAPs transportieren Peptid-Fragmente mit einer Länge von 7-15 AS. Der Genlocus von TAP1 und TAP2 befindet sich in unmittelbarer Nähe von LMP2 und LMP7 (Human: Chromosom 6; Maus: Chromosom 17, [26]) im Bereich der klassischen MHC II-Moleküle.

Die vom Proteasom verdauten Peptide werden so prozessiert, dass die carboxyterminale AS als Anker für die Bindungs-Grube des MHC I Moleküls dient und der ‚verlängerte‘ N-Terminus-Rest im ER spezifisch von einer ER-Aminopeptidase (ERAAP; endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing) getrimmt wird. Erst nach diesen Prozessen kann das finale, mit dem Peptid-Fragment geladene MHC I-Molekül angefertigt werden [28]. Wird das MHC I-Molekül an der Zelloberflächen der T-Zelle über den T-Zellrezeptor präsentiert, entsteht ein trimolekularer Komplex: das MHC I-Molekül, das Peptid-Fragment und der T-Zellrezeptor.

Die Histokompatibilitäts-Gene der Maus werden als H2-Gene definiert. Es existieren insgesamt drei Gene: H2K, H2D und H2L. Für das humane MHC-Gen wird das Humane Leukozyten-Antigensystem (HLA) synonym verwendet und beinhaltet HLA-A, HLA-B und HLA-C [26].

1.3.2 MHC I und das zentrale Nervensystem

Für die hier vorgestellte Arbeit ist das Expressionsmuster der MHC-Moleküle an der Oberfläche einer Zelle, insbesondere von MHC I, von Relevanz. Die Existenz des Oberflächen-Markers MHC I (RNA oder Protein Ebene) im Gehirn wurde bis zum heutigen Tage kontrovers diskutiert. Dies betrifft nicht nur das im Vergleich zu anderen Organsystemen niedrige basale Expressionsniveau, sondern auch die bislang identifizierten Funktionen. Tatsächlich scheint das MHC I-Molekül im zentralen Nervensystem (ZNS) auch in spezifischen neurobiologischen Prozessen eingebunden zu sein, die unmittelbar keinen Bezug zur adaptiven Immunantwort aufweisen. So wurde die MHC I-Expression in Regionen mit Aktivitäts-abhängiger Plastizität, aber auch im visuellen System, dem adulten Hippocampus (HC) und dem Cerebellum dokumentiert (zusammengefasst in [29]). Offen bleibt auch die zellspezifische Expression, insbesondere mit Hinsicht auf Nervenzellen. So wurde wiederholt berichtet, dass im Gegensatz zu allen anderen kernhaltigen Zellen des Körpers Neurone unter basalen Zuständen kein MHC I-Molekül exprimieren, da nur unter pathologischen Bedingungen wie Schädigung, viralem Infekt oder bei Blockade der neuronalen Reizweiterleitung eine MHC I-Expression an der Oberfläche der Neuronen nachweisbar ist. Schließlich wurde kürzlich eine transiente Expression von MHC I-Genen in Neuronen während der Entwicklung des Gehirns beobachtet, ein Befund, der auf eine mögliche entwicklungsbiologische Funktion von MHC I-Molekülen hinweist [29], [30].

1.4 Neurogenese, synaptische Transmission und Plastizität

1.4.1 Neurogenese

Neurale Stammzellen (NSZ) besitzen die Fähigkeit der Teilung und der Selbst-Erneuerung, können aber zugleich in neuronale und gliale Zelllinien ausreifen. Somit können multipotente neurale Stammzellen konstant zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, den drei Zelltypen des Gehirns, differenzieren.

In der Wand des Neuralrohres entstehen in der frühen Embryogenese NSZ [31]. Aus diesem Neuroepithel differenzieren die neuralen Zelltypen, indem zuerst Neuronen und in späteren Stadien Gliazellen durch asymmetrische Teilung entstehen. Entsprechend dem Konzept der asymmetrischen Teilung verbleibt eine Tochterzelle als Stammzelle im Epithel, während die andere Tochterzelle in den zerebralen Cortex als neuronale

Vorläuferzelle wandert, um dort als Nervenzelle auszureifen [32]. Die Bildung der Astrogliazellen erfolgt nach der Wanderung in den Cortex. Die Entwicklung der Oligodendrozyten beginnt zwar zu einem späteren Zeitpunkt, aber dafür werden sie bis nach der Geburt gebildet.

Die aktive und fortdauernde Neurogenese im ausgewachsenen Organismus ist auf den Bereich der subventrikulären Zone (SVZ), die sich im lateralen Ventrikel befindet, und der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus Dentatus (GD) im HC limitiert. Die Existenz der adulten Neurogenese, v.a. im Bereich der SGZ des GD, ist mittlerweile etabliert und gemeinhin akzeptiert [33]. Hinzu kommt, dass die Proliferation der von der SVZ-abstammenden Zellen ein Leben lang existiert. Bei Säugern und Nagern wurde gezeigt, dass aus der SVZ-stammenden Stammzellen zum Bulbus Olfactorius wandern und dort zu Interneuronen differenzieren. Pluripotente Stammzellen des ZNS, die sich im SVZ befinden, können sowohl zu Neuronen als auch zu Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten), aber auch über Generationen hinweg zu Zelllinien-spezifischen Vorläuferzellen differenzieren [34].

Im Gegensatz zu den Stammzellen, sind Vorläuferzellen bereits einen Entwicklungsschritt weiter. Neuronale Vorläuferzellen (NVZ) gehören bereits einer bestimmten Zelllinie an, entweder neuronal oder glial, und haben schon mit der Expression bestimmter Zelllinien-spezifischer Marker begonnen. Experimentell ist es möglich, die sich selbst erneuernden Zellen der SVZ, NVZ, sowohl als adhärenzte Zellkultur als auch als Suspension-Zellkultur anzuzüchten. Durch die Zugabe von Mitogenen, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), werden die NVZ zur Proliferation angeregt. Nach mehrmaligen Passagen werden die Mitogene entzogen, um eine Differenzierung zu induzieren. Die Differenzierung durch Zugabe spezifischer Faktoren kann gezielt zur Erzeugung von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten verwendet werden [35].

1.4.2 Synaptische Transmission, Plastizität und das UPS

Neuronen werden durch ihre hoch-polarisierte, komplexe Struktur charakterisiert. Diese Struktur verlangt ein einzigartiges System, welches für das Generieren, das Aufrechterhalten und den Abbau von Proteindomänen verantwortlich ist. Vor kurzem wurde entdeckt, dass das UPS eine essentielle Rolle bei all diesen Prozessen spielt. In verschiedenen Arten tragen die UPS-Komponenten zu den typischen neuronalen Entwicklungen durch die Modulation des Wachstums, der Steuerung und der

Elimination von Axone bei. Außerdem scheint die lebenslange, neuronale Informations-Bearbeitung und Speicherung von dem UPS-vermittelten Synapsen-Aufbau und -Abbau abhängig zu sein [36]. Tatsächlich wird über die Mono-Ubiquitinierung im prä-synaptischen Terminal die Dynamik der Vesikel durch ständig sich wandelnde Protein-Interaktionen und Protein-Aktivitäten reguliert. Darüber hinaus verändert sich durch die Poly-Ubiquitinierung und der darauf folgende Protein-Abbau die Menge der synaptischen Proteine [37].

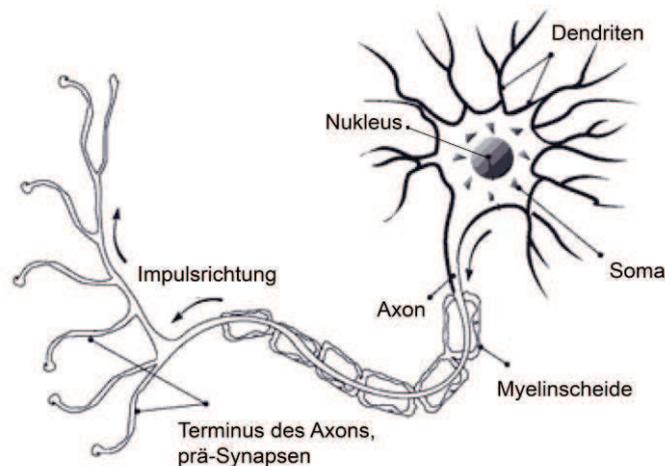


Abb. 5 Schematische Darstellung eines Neurons. Eine Nervenzelle besteht aus den Komponenten Nukleus, Soma, einem Axon und mehreren Dendriten. Ein Neuron reagiert auf einen Stimulus mit Reizweiterleitung, der von einem Ungleichgewicht der Ladung (Ionen wie K^+ , Na^+ , Cl^-) zustande kommt (Membranpotential). Dieses Signal geht vom Soma weg Richtung Axon. Dort sitzen die Präsynapsen des Neurons, die durch den synaptischen Spalt mit der Postsynapse Kontakt halten. Das Axon wird von Myelin, welches aus verschiedenen Proteinen besteht (einige hiervon: Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein (MOG), Proteolipid Protein (PLP), Myelin-basisches Protein (MBP)), umwickelt. (Bild entnommen und umgestaltet: <http://www.cidpusa.org/physiology.htm>)

Ein einzelnes Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma), einem Axon und Dendriten, ersichtlich in Abb. 5. Neuronen bilden mit anderen Neuronen, Muskelzellen oder sonstigen Zellen Netzwerke. Das Soma bildet das metabolische Zentrum einer Nervenzelle, wobei autonom hiervon, ebenso viele zellbiologische Prozesse entfernt vom Soma in den Dendriten oder dem Axon stattfinden. Mittels dieser lokalen Kontrolle können die Synapsen eines Neurons auch unabhängig vom Zellkern durch posttranslationale Modifikation beteiligter molekularer Strukturen modifiziert werden. Aus dieser Kontrolle ergeben sich die Vorteile der Initiierung einer schnellen Antwort direkt nach dem Stimulus, das Schaffen einer Mikro-Umwelt, die sich speziell auf den Input der Synapse abstimmt sowie der Einschränkung der verschiedenen biochemischen Prozessen an den verschiedenen neuronalen Anteilen [38].

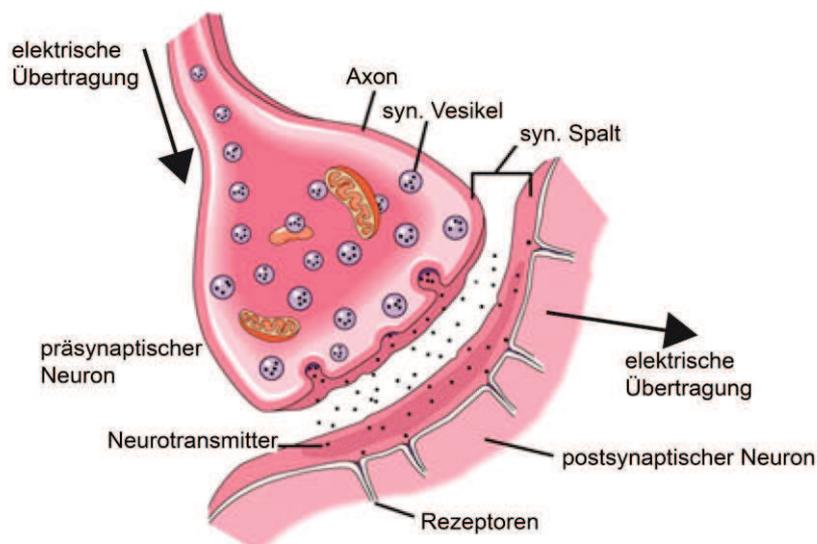


Abb. 6 Aufbau einer Synapse. Die elektrische Reizübertragung wird immer vom Axon auf das Dendrit übertragen. Die Reizübertragung stimuliert im Axon synaptische Vesikel, wozu es zu einer Freisetzung der Neurotransmitter kommt. Die Neurotransmitter docken nachdem sie den synaptischen Spalt überquert haben, an ihren Rezeptoren an. Die Rezeptoren sind an der dendritischen Synapse (Postsynapse) lokalisiert. (Entnommen und bearbeitet von <http://www.biologycorner.com>)

Das Axon eines Neurons tritt mit den Dendriten anderer Neuronen in Kontakt, um eine Reizübertragung zu ermöglichen. Diese Kontaktstelle wird Synapse genannt, dargestellt in Abb. 6. Ein einzelnes Neuron besitzt tausende an Synapsen und einem menschlichen Motor-Neuron werden bis zu 10 000 Synapsen zugeschrieben [39]. Somit definiert sich eine Synapse aus dem prä-synaptischen, dem post-synaptischen Abschnitt und dem synaptischen Spalt (siehe Abb. 6).

Aktionspotentiale verursachen das exozytotische Freisetzen (Exocytose) von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Zu den Neurotransmitter zählen unter anderem Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Noradrenalin, Acetylcholin, Dopamin, und Serotonin. Alle Neurotransmitter binden an ihre spezifischen Rezeptoren, lokalisiert an der post-synaptischen Membran, um Ionenkanäle (geöffnet oder geschlossen) entweder direkt oder indirekt zu beeinflussen und somit die Membran-Leitfähigkeit (Depolarization) zu beeinträchtigen (chemische Synapse, unidirekt-einseitig) [40]. Des Weiteren existieren spontane Neurotransmitter, sogenannten Miniatur (exzitatorische post-synaptische) Potentiale (miniEPSP), welche ohne Aktionspotential abgesondert werden [41]. Aktionspotentiale können mit der Hilfe des spannungsabhängigen Natriumkanal Blockers Tetrodotoxin (TTX) blockiert werden [42].

Homöostase ist die Eigenschaft eines Systems das interne Umfeld zu regulieren und eine Tendenz zur stabilen Konditionen beizubehalten. Die Protein-Homöostase der synaptischen Plastizität bezieht sich auf die Fähigkeit der Neuronen, ihre eigene Erregbarkeit in Bezug auf ihre vernetzte Aktivität zu justieren (zusammengefasst in [38]). Diese Vielfalt an zellbiologischen und biochemischen Prozessen verlangt eine starke und ständige Kontrolle des synaptischen Proteoms. Die *de novo*-Protein-Synthese ist ein wichtiges und essentielles Merkmal der synaptischen Transmission und Plastizität. Das UPS reguliert Schlüsselproteine, die am prä- und post-synaptischen Terminus beteiligt sind. Auf diese Weise leistet das UPS seinen Beitrag zur synaptischen Transmission als auch zur Kurzzeit- (Kurzzeitgedächtnis) und Langzeit-Plastizität (Langzeitgedächtnis). Grundsätzlich werden zwei verschiedene Formen der Plastizität differenziert. Zum einen die Langzeit-Depression (LTD), welche die synaptische Transmission inhibiert, zum anderen die Langzeit-Potenzierung (LTP), eine Verstärkung der andauernden synaptischen Transmission. Beide Arten benötigen eine fortdauernde, sich anpassende Protein-Synthese zur Aufrechterhaltung der Plastizität – der Vorgang des Lernens.

Im Detail konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Proteasoms die LTP der Schaeffer kollateral-CA1 Synapse im HC beeinträchtigt [43]. Weiterhin kontrolliert der UPS-abhängige Proteinabbau eine enge, synaptische Balance mit dem Ziel der Aufrechterhaltung des optimalen Proteinlevels, um ein funktionelles Gleichgewicht an zu steuern [44]. In der Tat sind Komponenten des UPS in unmittelbarer Nähe der Synapse, auf der prä- als auch post-synaptischen Seite, konzentriert [45], [46]. Eine Studie aus dem Jahre 2009 zeigte, dass das Proteasom in hippocampalen Neuronen, dynamisch durch Aktionspotentiale reguliert wird und in seiner Aktivität von spannungsabhängigen Calciumkanälen abhängt [47].

Synaptische Vesikel, Membran-umschlossene Organellen, die spezifische Membran-Proteine beinhalten, sind einerseits für die Beladung der Vesikel mit den Neurotransmittern verantwortlich, andererseits stellen sie Proteine dar, die am vesikulären Membran-Kreislauf beteiligt sind. Das Recyceln dieser synaptischer Vesikel gehört ebenfalls zu den Aufgaben des UPS. So zeigten Willeumier und Kollegen, dass die Proteasom-Inhibierung eine Anhäufung an synaptischen Vesikel hervorrief. Wurde die neuronal Aktivität blockiert, erlangte der beobachtete Proteasom-Effekt das Gegenteil, eine schwindende Anzahl an freigesetzten synaptischen Vesikeln. Wobei die

Inhibierung der Proteasom-Aktivität nicht in einem erhöhten Freisetzen der Transmitter resultierte [48].

Der Effekt des UPS scheint sehr spezifisch für die verschiedenen, an der synaptischen Übertragung beteiligten, molekularen Strukturen zu sein. Allerdings konnte noch keine Proteasom-abhängige Regulation des prä-synaptischen Proteins Synapsin gezeigt werden [45]. Dagegen wird das post-synaptische Dichte Protein PSD-95, ein wichtiger Bestandteil des post-synaptischen Gerüsts, Proteasom-abhängig abgebaut. Dieser Abbau führt zur Internalisierung des an der glutamatergen Transmission beteiligten AMPA-Rezeptors. Entgegengesetzt inhibiert die Blockade der PSD-95 Proteolyse die NMDA-induzierte AMPA-Rezeptor Endozytose. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Proteasom-Inhibierung (durch MG132 und Lactacystin) signifikant die LTD in pyramidalen Neuronen des hippocampalen CA1 unterdrückt [49].

Der UPS-vermittelte Protein-Umsatz im ZNS ist grundsätzlich für die Stabilität von mehreren Proteinen, die für die Informations-Verarbeitung und die Reiz-Weiterleitung und somit auch für neuronalen Prozesse verantwortlich sind, zuständig [37].

1.5 Epigenetische Regulation des ZNS

Für die vorliegende Arbeit sind Mechanismen der Genexpression von großer Relevanz. Wie in den vorangegangenen Abschnitten ausgeführt, wird die Oberflächen-Expression des MHC I-Komplexes sowie das UPS durch verschiedene Signalkaskaden auf Promotorebene reguliert. Daneben existieren sogenannte epigenetische Mechanismen, welche die Genexpression auf verschiedenste Weise manipulieren können. Epigenetische Regulationen beinhalten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Methylierung, Histonmodifikation, Nukleosom-Reposition, Chromatin-Umformung, nicht-kodierenden Ribonukleinsäure (RNA) wie z. B. mikro-RNA und RNA/DNA-Editing [50]. Epigenetische Prozesse können die DNA selbst oder Proteine, die eng mit der DNA verbunden sind, betreffen, wodurch sich die Konfiguration des Chromatin-Status ändert.

1.5.1 DNA-Methylierung

DNA-Methylierungsprozesse spielen eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, während der Entwicklung (insbesondere im Gehirn), bei der Anpassung der Telomer-Längen, bei der Inaktivierung von Genen bzw. ganzer Chromosomen (X-Chromosom) und der

Alterung [51]. Gene, deren Transkription durch DNA-Methylierung unterdrückt werden, weisen im Promotorbereich meist eine hohe Dichte von methylierten Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG: Cytosin Phospho-di-Esther gebundenes Guanin) auf. An diesem Dinukleotid wird post-replikativ eine Methyl-Gruppe (CH_3 -) des S-Adenosyl-L-Methionin Donors addiert. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) reversibel katalysiert [52]. Eine 1 bis 5 kb (Kilobasen) lange DNA-Region im Promotorbereich, angereichert mit CpGs, wird als CpG-Insel bezeichnet. Diese CpG-Inseln sind grundsätzlich bei Haushaltsgenen nicht methyliert [53]. Ca. 45.000 CpG-Insel existieren im menschlichen Genom, wobei die Hälfte in Promotorregionen anzutreffen sind [54]. In Säugetieren sind 60 – 90 % aller CpG Dinukleotide und insgesamt 1 – 6 % aller Cytosine im Genom methyliert, die verbleibende Methylierungs-freien CpG-Inseln befinden sich meist in Promotorregionen [55]. DNA-Methylierung ist vorwiegend mit einer stabilen Hemmung der Genexpression verbunden.

Die CpG-Sequenz ist beispielsweise an der STAT3-Erkennungssequenz des GFAP-(engl: *Glial fibrillary acidic protein*)-Promotors in Neuronen, aber nicht in Astrozyten, methyliert [56]. Offensichtlich existieren innerhalb der Zellen Mechanismen, die gezielt De-Methylierung und Methylierung von DNA-Sequenzen hervorrufen. Die CpG-Methylierung steuert auf diese Weise Gene, deren Expression nicht erwünscht sind. Es ist nicht nur wichtig, sondern auch essentiell, ein bestimmtes Gen speziell während der Entwicklung (besonderes während der Neurogenese und Gliogenese) zu inhibieren. Viele gewebespezifische Gene befinden sich zur Induktion während der Differenzierung im demethylierten Zustand [57]. Eine Sequenz-spezifische Methylierung führt meist zu einer direkten Bindungs-Störung von essentiellen Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren besitzen GC-reiche Bindungsstellen, folglich kann es sich hier um CpG-Elemente handeln, die methyliert werden können [58].

1.5.2 DNA-Methyltransferasen

Die eukaryotische Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) besteht aus drei wesentlichen Enzymen: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b; des Weiteren existieren DNMT2 und DNMT3l, die keine eindeutige DNA-Methyltransferase-Aktivität aufweisen (DNMT2) und deren Verwandtschaft zu den DNMTs noch geklärt werden muss (DNMT3l) [59]. Das Erhaltungs-Enzym DNMT1 ist reichhaltig in Säugetier-Zellen vorhanden und bevorzugt hemi-methylierte CpG Dinukleotide. Ein Elternstrang, der methyl-CpGs aufweist, liegt einem unmethylierten Tochterstrang gegenüber (hemi-methyliert) und

wird unmittelbar von einer aktiven DNMT1 als Substrat erkannt. Auf diese Weise wird die Weitergabe der Methylierungsmuster in den somatischen Geweben gesichert. Das Enzym wird direkt an der Replikationsgabel vorgefunden [59].

Im Gegensatz zu dem Erhaltungs-Enzym DNMT1 gehören DNMT3a und 3b zu den *de novo*-Enzymen, die effektiv eine Methyl-Gruppe an unmethylierten Cytosin-Resten addieren [60]. Die *de novo*-Methylierung findet insbesondere in der Keimzellen-Entwicklung und Embryogenese statt [61]. Beide Aktivitäten, sowohl die des *de novo*- als auch des Erhaltungs-Enzyms, ereignen sich während der DNA Replikation. Im Allgemeinen verändert sich das Muster der DNA-Methylierung nach der Zellteilung nicht mehr, folglich sinkt die Expression der DNMTs drastisch.

Wie wichtig die funktionelle Aufgabe der DNMTs in postmitotische Neuronen und somit im ZNS ist, wird anhand des konstanten Spiegels an DNMT1 und DNMT3a (aber nicht DNMT3b) demonstriert (zusammengefasst in [62]). Das Gehirn selbst wurde als das Gewebe mit dem am stärksten ausgeprägten Methylierungsmuster charakterisiert. Ein weiteres Beispiel für die Dynamik und essentielle Notwendigkeit der DNA-Methylierung ist die auftretende embryonale Letalität der generierten DNMT1- und DNMT3a/3b-defizienten Mäuse (Knock-out) [63], [64].

1.5.3 Methyl-CpG bindende Proteine

Der DNA-Methylierungsstatus wird nicht nur von DNA-Methyltransferasen sondern auch von sogenannten Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBD) bestimmt. Diese erkennen methylierte DNA und unterdrücken die Gen-Expression über ihre transkriptionelle Repressor-Domäne oder mit Hilfe der Modifikation von Histonen. Die Familie der MBD-Proteine besitzt eine Methyl-CpG-bindende Domäne (MBD), welche sich direkt an das CpG Dinukleotid bindet und umfasst folgende Mitgliedern: MBD1, MBD2, MBD3 (ohne MBD), MBD4 und MeCP2 (Methyl-CpG-bindendes Protein 2). Zu erwähnen ist, dass MBD1, MBD2, MBD3 und MeCP2 als transkriptionelle Repressoren wirken, MBD4 dagegen an der Reparatur von TG-Mismatch-Ereignissen (entstanden durch Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin) beteiligt ist [65]. Für MBD1, MBD2, MBD4 und MeCP2 gilt, dass sie spezifisch an methylierte DNA binden, aber dies nahezu unabhängig von der DNA-Sequenz ist [66], [67]. Anhand der Komplexbindung mit Histon-Deazetylasen (HDAC) und Histon-Methyltransferasen (HMT) verursachen MBDs einen kompakten und infolgedessen inaktiven Chromatin-Status [58]. Generell

gilt, dass HDAC eine inaktive Heterochromatin-Struktur vermitteln und HMT können sich sowohl positiv als auch negativ auf die Transkription auswirken.

So ist bekannt, dass MeCP2 mit dem Co-Repressor Sin3A interagiert, ein Komplex, der die HDAC1 und HDAC2 beinhaltet. Auf diese Weise kann MeCP2 entweder mit dem Sin3A allein, oder mit den HDAC interagieren und teilweise unabhängig von den HDAC die Transkription unterdrücken [68].

Für das nukleäre vorwiegend im Heterochromatin lokalisierte MBD1 ist bekannt, dass es mit der HMT SETDB1 und dem Chromatin-Assembly-Faktor 1 (CAF1) eine Bindung eingeht [69]. Dieser MBD1-CAF1-SETDB1-Komplex besitzt die Fähigkeit Histon-Methylierung zu lenken und somit die Genexpression negativ zu beeinflussen.

1.5.4 DNMTs und MBDs im ZNS

Den aktuellen Arbeiten zufolge, ist eine dynamische und synergetische Interaktion zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikation als komplexer, epigenetischer Prozess zu sehen, welcher die Gen-Expression in verschiedene Richtung beeinflussen kann. Im ZNS wurde die Expression beider Methyltransferasen-Typen, *de novo* (DNMT3a/3b) und Erhaltung (DNMT1), beschrieben [64], [70], [71]. DNMT1 wird bereits im embryonalen Nervensystem detektiert und im Gegensatz zu anderen Organen auch in fast allen reifen Neuronen des ausgereiften Maus-Gehirns exprimiert [72]. DNMT3b wird hauptsächlich im ZNS der Maus während der frühen Embryogenese und in neuronalen Vorläuferzellen vor dem embryonalen Tag 15.5 (E 15.5) detektiert. Im Gegensatz hierzu wird DNMT3a zu einem späteren Stadium der Embryogenese beobachtet und wird im Erwachsenen-Alter durchgehend in NVZ, reifen Neuronen, Oligodendrozyten und vereinzelt in Astrozyten gefunden [70], [73].

Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Doppel-Knock-out für DNMT1 und DNMT3a in Mäusen die neuronale Differenzierung beeinträchtigte, Defizite in der synaptischen Plastizität verursachte und die Expression Immun-relevanter Gene des MHC I-Signalwegs und STAT1 selbst induzierte [64]. Dies weist auf eine mögliche Verknüpfung von DNA-Methylierung, MHC I und der neuronalen iP Assemblierung hin.

Ein weiterer Hinweis auf den bemerkenswerten Beitrag der DNA-Methylierung für neuronale Funktionen resultiert aus der Arbeit von Martinowich und Kollegen im Jahre 2003. Sie zeigten, dass der Promotor des Calcium-induzierbaren *Brain-derived*

neurotrophic factor (BDNF) ein direktes Ziel von MeCP2 ist. Der schon erwähnte MeCP2-Sin3A-Komplex inhibiert den BDNF-Promotor. Unter Calcium-Einfluss wird MeCP2 phosphoryliert und dissoziiert vom Promotor, so dass die BDNF-Transkription gestartet werden kann [74]. Der Wachstumsfaktor BDNF ist ein Neurotrophin, das für die Stimulation und Kontrolle der Neurogenese bekannt ist [75]. Neuronen und Astrozyten entstehen aus denselben NVZ im Gehirn (siehe Neurogenese Kapitel 1.4.1), wobei entwicklungsgeschichtlich die Astrozytogenese der Neurogenese folgt. Der Wechsel von Neurogenese zu Astrozytogenese/Gliogenese im sich entwickelnden Gehirn wird vor allem von DNA-Methylierung an dem Zelltyp-spezifischen Promotor kontrolliert [56], [76], [77]. Die Analyse des ZNS-spezifischen Methylierungsprofils der MHC-Gene (sowohl MHC I als auch MHC II) auf dem 6. Chromosom (6p21.3) des Menschen durch das humanen Epigenom Projekt (HEP) zeigte die bedeutende Rolle der DNA-Methylierung für MHC-verwandte Gene auf [21].

1.6 Multiple Sklerose und das Tiermodell experimentelle autoimmune Encephalomyelitis

Die Multiple Sklerose ist die häufigste Autoimmun-Erkrankung des ZNS, charakterisiert durch multiple demyelinisierte Areale (Plaques/Läsion), chronischer Inflammation und den Verlust an Oligodendrozyten und Axonen, einhergehend mit einem neuronalen Defizit [78]. Nach gängiger Ansicht wird die Erkrankung durch autoreaktive T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+) vermittelt, welche sich gegen die Myelinbestandteile des ZNS (siehe Abb. 5) richten und somit den Entzündungsprozess induzieren, der zu einer sekundären Makrophagen-Rekrutierung führt.

Das zelluläre Infiltrat innerhalb der typischen Läsionen wird begleitet von der Hochregulation verschiedenster Zytokine, Chemokine, und weiterer entzündlicher Mediatoren sowie reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS). Zu den Zytokinen zählen Interleukin-2 (IL-2), TNF α und IFN γ , welche während eines aktiven MS-Schubes im Liquor nachgewiesen werden können [79]. Ebenso konnte eine positive Korrelation eines Schubes und den pro-inflammatorischen IFN γ /TNF α dargestellt werden [80]. Im Zusammenschau mit tierexperimentellen Modellen wurde die MS als eine primär CD4+ T-Helfer-Lymphozyten-medierte Erkrankung angesehen [78]. Bemerkenswerterweise

ließen sich in bioptisch untersuchten entzündlichen Infiltraten der MS zu gleichen Anteilen CD4⁺ T-Lymphozyten wie klonal expandierte CD8⁺ T-Lymphozyten nachweisen [81], [82].

Auf neurobiologischer Ebene führt der chronische Entzündungsprozess unbehandelt zu einer reduzierten Axonendichte. Eine akute axonale Schädigung wurde schon in den frühen Stadien der Pathogenese nachgewiesen und ist mit der aktiven Demyelinisierung verbunden [83]. Myelin-defiziente Mäuse weisen auch eine axonale Degeneration auf, womit die Hypothese der trophischen axonalen Störung mit einer sekundären Degeneration unterstützt wurde [84]. Weiterführende Studien an MS-Patienten mit längerer Krankheitsdauer demonstrierten einen gestörten axonalen Transport, axonale Transsektion und dephosphorylierte Neurofilamente in Läsionen [83].

Hinsichtlich der Ursachen der immunvermittelten chronischen Entmarkung ergab eine Genom-weite Kopplungsanalyse (GAMES and the Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative 2003) die Assoziation für die MHC-Region des Chromosoms 6p21 v.a. in der Nord-europäischen Bevölkerung. Das HLA-DRB1*15, ein MHC II-Gen, wird von über 50 % aller MS-Patienten getragen. Die Kombination an HLA-A*02 mit HLA-DRB1*15 ergibt ein erhöhtes Risiko an MS zu erkranken [85]. Eine Verknüpfung der aktiven MS mit dem MHC I-Molekül, anderen HLA-Genen, das Auffinden von CTLs in Einbezug anderer inflammatorischen Komponenten (Chemokine, Stressproteine, Komplement-Aktivierung, Adhäsionsmoleküle) sprechen außerdem für die mögliche Beteiligung des UPS, insbesondere des iPs, an der Pathogenese der MS.

Der Nachweis von LMP2 und PA28 in Cortex, der weißen Substanz und vor allem in Läsionen im ZNS von MS-Patienten sowie das verminderte Erkrankungsrisiko bei Trägern des HLA-A*02-Allels in Verbindung mit der LMP2-Codonvariante 60HH ist als ein weiterer Hinweis auf den möglichen Beitrag des Immunoproteasoms bei der MS-Pathogenese zu werten [86].

Die relevanten histopathologischen Kennzeichen der MS können im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), induzierbar in den verschiedensten Säugern, reproduziert werden. Eine EAE kann in einer aktiven bzw. passiven Form induziert werden. Bei der aktiven Form wird ein Myelin-Peptid zusammen mit immunstimulatorischen Adjuvantien injiziert. Der Transfer von Myelin-

spezifischen (encephalitogene) CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten stellt die Transfer- oder passive EAE dar [87]. Je nach Tierstamm und Antigen verläuft die Erkrankung als akut oder chronisch-rezidivierend und weist damit eine auch bei der MS selbst bekannten Heterogenität auf. Mit Hinsicht auf die Fragestellung lassen sich also relevante neurobiologische und entzündliche Aspekte der Erkrankung im Tier-Modell untersuchen. Dadurch lassen sich wertvolle Rückschlüsse auf die Pathogenese der MS ziehen [88], [89].

Die hier in dieser Arbeit verwendeten LMP2 ^{-/-} und LMP7 ^{-/-} Mausstämme besitzen einen C57Bl/6 Hintergrund, der durch H2K und H2D als MHC I-Gene charakterisiert ist (siehe Kapitel 1.3). Durch eine aktive Immunisierung mit der Peptidsequenz 35 – 55 des murinen Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein (MOG) [MOG₃₅₋₅₅] wird neben einer encephalitogenen CD4⁺ T-Lymphozytenantwort auch eine CD8⁺ T-Lymphozyten-vermittelte Entzündungsreaktion induziert [88], [90], die damit den MHC I-Signalweg betrifft und die Beteiligung des (induzierbaren) Proteasoms gegeben ist.

1.7 Zielsetzung

Die *de novo*-Synthese des Immunoproteasoms ist eine Antwort auf einen pro-inflammatorischen Prozess in nicht-hämatopoetischen Zellen. Zu den Hauptaufgaben des iP_s gehört eine verbesserte Antigen-Präsentation über den MHC I-Signalweg aufgrund der veränderten Schnittspezifität. Der inflammatorische Stimulus kann jedoch durch diese verbesserte Präsentation der endogenen Antigene aufrecht gehalten werden und zu einer verstärkten Entzündung führen. Die Akzeptanz des MS-Tiermodells als eine CD8⁺ T-Lymphozyten-vermittelte Erkrankung, lässt zu dem Schluss kommen, dass das Fehlen des Immunoproteasoms zu einer abgeschwächten Form der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis in MOG-immunisierten Tieren führt. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Analyse der EAE in LMP2-defizienten und LMP7-defizienten Tieren.

Der zweite Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die systematische Untersuchung der *de novo*-Assemblierung des Immunoproteasoms in neuronalen Zellen, speziell in Neuronen, unter pathophysiologischen, aber auch physiologischen Bedingungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

iBlot Dry Blotting System	Invitrogen
Mikroplatten Photometer	Tecan Gruppe
Odyssey Infrarot Imaging System	Li-Cor
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
SDS-PAGE X-Cell Sure Lock Elektrophorese System	Invitrogen
Kodak X-Omat 1000 Processor	Kodak
Thermozyklus T Gradient	Biometra
7500 Pro Real-Time PCR Systems	Applied Biosystem

Zentrifugen:

Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

Mikroskope:

Wilovert, inverses Mikroskop	Hund
Stereozoom KL1500 LCD	Leica
Fluoreszenz BX51	Olympus
Konfokales DM 2500	Leica

MEA Chip Geräte	Multi Channel System, Reutlingen
-----------------	----------------------------------

2.1.1.1 Kunststoffartikel und Verbrauchsmaterialien

Falls nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Reaktionsgefäße, Pipetten und ähnliches bei folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystem, B.Braun, Eppendorf, Falcon, Costar, GE Healthcare, Roth, Beckton Dickinson und Sarstedt.

2.1.1.2 Kits

DNAeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen
EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen
EpiTect MSP Kit	Qiagen
GFX PCR DNA&Gel Band PurificationKit	GE Healthcare
TaqMan Reverse Transkriptase Kit	Applied Biosystem
ECL Advance Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare

2.1.1.3 Antikörper

Antikörper, die verwendet wurden, sind im Kapitel 2.2.5.2 und 2.2.5.3 aufgelistet.

2.1.1.4 Primer

Generierte Primer sind im Text dargestellt: Methylierungs-spezifische Primer unter Kapitel 2.2.4.5 und TaqMan Primer unter Kapitel 2.2.4.3.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden stets an einer Sterilbank HERASafe unter strikt aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in geeigneten Inkubatoren (Heraeus).

2.2.1.1 Zellkultur

- Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose (enthält Pyruvat und Glutamin mit 4,5 g/L Glucose), 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FKS), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10 000 U/10 000 µg/mL)

HT22, eine murine hippocampale Neuroblastoma-Zelllinie, und BV-2, eine murine Microglia-Zelllinie, wurden in DMEM kultiviert. Beide Zelllinien sind adhären wachsende Zelle, welche am Tag vor der Behandlung so ausgesät, dass sie am Tag der Ernte eine Konfluenz von 80% besaßen. Zur Induktion von Immunoproteasom in den Zellen wurde dem Medium 100 U/mL rekombinantes murines IFN γ (Roche) zugesetzt. Eine 24h-ige Inkubation wurde verwendet, wenn nichts anderes im Text vermerkt ist.

2.2.1.2 Isolation und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen

- Proliferationsmedium NVZ: Neurobasales Medium (NBM) enthaltend 2% (v/v) B27 Supplement (ohne Vitamin A), 1% (v/v) Glutamax, 1% (v/v) P/S, 10 ng/mL bFGF, 1 ng/mL EGF
- Differenzierungsmedium NVZ: NBM enthaltend 2% (v/v) B27 Supplement (mit Vitamin A), 1% (v/v) Glutamax, 1% (v/v) P/S

Zur Isolierung von neuronalen Vorläuferzellen wurden Mäuseembryos am embryonalen Tag (E) 17.5, von einer C57BL/6 Maus (WT Zucht des LMP7 $-/-$ Stammes) verwendet. Zum Erlangen einer primären, cerebralen, corticalen, neuronalen Vorläufer-Zellkultur wurde das Gehirn benutzt. Das Cerebellum und die Cortices wurden isoliert, von den Meningen befreit, in kleine Stücke geschnitten und gewaschen. Nach erfolgter Trypsinierung (0,025 % Trypsin (v/v) in HBSS $-/-$), wurde erneut gewaschen und der Überstand zentrifugiert. Das somit erhaltene Pellet wurde in NBM vorsichtig

resuspendiert, gezählt und kultiviert. Zur Kultivierung von NVZ wurden die Zellen mit einer Dichte von 1 - 2 Zellen pro Quadratmillimeter in einer T75-Flasche ausgesät. Durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF/bFGF wurden die Zellen zur Proliferation gezwungen. Nach Entzug der Wachstumsfaktoren, indem neu passagierete Neurosphären als Einzel-Zell Kolonien vorlagen und in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, wurden die Zellen zur Differenzierung genötigt. Das Beifügen von Vitamin A förderte die neuronale Differenzierung. Die Differenzierung erfolgte für mindestens 7 Tage, höchstens 14. Zu behandelnden Substanzen wurden generell in den letzten 24h da zu gegeben. Diese Neurosphären besitzen die Eigenschaften der Multipotenz und Selbst-Erneuerung wie Stammzellen, trotz reiner Zellkultur-Erscheinung und somit künstlich. Neurosphären sind deswegen ein geeignetes Model, *in vitro* Studien zur Differenzierung und somit Neuronen zu erlangen

2.2.1.3 Isolation und Kultivierung von primären Neuronen

- mV10 Medium: Minimum Essential Medium (MEM) enthaltend 10 % (v/v) FKS, 60 % (v/v) Glukose, 200 mM Glutamin, 2,5 mg/mL Insulin, 1 M Hepes
- Proliferationsmedium P1: NBM enthaltend 2% (v/v) B27 Supplement (mit Vitamin A), 1% (v/v) Glutamax, 1% (v/v) P/S, 1% (v/v) FKS, 1 mM LiCl, 10 ng/mL NGF, 5 ng/mL EGF, 5 ng/mL bFGF
- Differenzierungsmedium P1: NBM enthaltend 2% (v/v) B27 Supplement (mit Vitamin A), 1% (v/v) Glutamax, 1% (v/v) P/S

Primäre Neuronen-Kultur wurden aus dem Hippocampus (HC)/Cortex (Ctx) von neugeborenen Mäusen (postnataler Tag 1; P1) aus LMP7 +/- oder LMP7-/- isoliert. Hierfür wurden die Mäuse narkotisiert, das Gehirn entnommen und in HBSS-/- gelagert. Unter einem Stereozoom Mikroskop (Leica) wurden die Areale des HC und des Ctx entnommen, befreit von Meningen und in einer 1%-igen Trypsin-Lösung verdaut. Nach einmaligem Waschen (HBSS+/-), wurden die isolierten Gehirnareale mit mV10 Medium dissoziiert und nach Absenken der nicht gewollten Bestandteile, wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei 1200 rpm, 4°C für sechs Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in mV10 Medium gelöst und mittels Tryptophan-Blau Lösung gezählt. Die Aussaat erfolgte auf Poly-O-Lysin beschichteten Platten oder MEA-Chips. Neuronen wurden in Serum-freiem Neurobasal Medium (NBM) mit dem Zusatz B27+ (welches Vitamin A beinhaltet) kultiviert. Die ersten beiden Tage fand die Kultivierung in Proliferations-Medium statt, danach wurde es in Differenzierungs-Medium ersetzt. Ein Mediumwechsel fand alle drei bis vier Tage statt. Die Kultivierung erfolgte über 14 bis 18 Tagen. Primäre neuronale Zellen wurden mit Tetrodotoxin (TTX;

1 μM) für 72 Stunden behandelt, wobei nach 1,5 Tagen eine erneute Zugabe der Substanz erfolgte. Bei einer Doppel-Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$, wurde $\text{IFN}\gamma$ in den letzten 24 Stunden vor dem Ernten dazu gegeben.

2.2.2 Multi-Elektroden-Array Chip

Die Aufnahme der Multi-Elektroden-Array (MEA) Chip Aktivität startet meist ab Tag 10 (Day *in vitro* 10) und wurde im Schnitt alle drei bis vier Tage gemessen. Waren die kultivierten Neuronen aktiv, so wurde das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ dazu gegeben und nach 24h-Inkubation erfolgte eine erneute Aktivitätsmessung. Um elektrophysiologische Aktivität an primären kultivierten Neuronen auf MEA Chips zu messen, wurde ein MEA Chip der Firma Multi Channel System (Reutlingen) verwendet, der 60 planaren Ti/TiN Mikroelektroden (200 μm lang, 30 μm Durchmesser) auf einem Quadrat mit einer Input-Impedanz von $<50 \Omega/\text{kU}$ nach den Angaben verwendet. Die Signale aller 60 Elektroden wurden simultan auf 25 kHz gebündelt und mit dem McRack-Programm, bereitgestellt von Multi Channel System, visualisiert. Spike und Burst Detektion erfolgte offline, analysiert am Spanner-Programm (Result GmbH, Düsseldorf). Individuell wurde für jeden Kanal der Grenzwert/Schwellenwert der Spikedetektion mit 6.2 Standardabweichungen der Durchschnitts-Geräuschamplitude während 10 % der Lernphase zu Beginn der Messung abgeglichen. Die refraktäre Absolutperiode an 4 ms und einem Maximum an 2 ms für die Spike-Weite wurde dem Spike-Detektions-Algorithmus auferlegt. Die Spike-Wellen wurden einzeln gespeichert und visuell nach Artefakten überprüft.

2.2.3 Langzeit-Depression

- ACSF: 125 mM NaCl, 1,8 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 2,4 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 26 mM NaHCO_3 und 10 mM D-Glucose, pH 7.4

Alle Eingriffe waren in Übereinstimmung des deutschen Tiergesetzes und wurden von der UKD genehmigt. Horizontale Schnitte von Hippocampus, ca. 400 μm dick, wurden an einem Campden Vibratom präpariert. Kurz zusammengefasst, die Mäuse wurden dekapiert, das Gehirn entnommen und in Eis-kaltem synthetischen Cerebralen Liquor (ACSF) für 2h bei Raumtemperatur gelagert. Jeder einzelne Gehirnschnitt wurde in eine Aufzeichnungs-Kammer des Typs ‚Submersion‘ transferiert und die Aufzeichnung der Aktivität begann. Die Langzeit – Depression wurde in der Neurophysiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf in Kooperation mit AG Sergeeva durchgeführt. Hippocampale Feldantwort der exzitatorischen postsynaptische Potentiale (fEPSPs)

wurden im Schaffer Kollateral Bereich des HC stimuliert und an dem CA1 des Stratum Radiatum oder Stratum Pyramidale aufgezeichnet. Hierfür wurden ACSF-gefüllte niederohmige Mikropipetten in einer Submersion-Typ Aufnahme-Kammer, die kontinuierlich mit ACSF mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 – 2 mL/min bei 32 °C gespült wurde, aufgenommen. Nachdem eine Initiierung der Stimulation/Antwort-Beziehung getestet wurde, wurde die Stimulationsintensität adjustiert, um die postsynaptische Antwort um 30 – 50 % ihrer maximalen Wertes zu induzieren. Die Stimulation Frequenz betrug 0.033 Hz. Signale wurden amplifiziert und ab 10 kHz digitalisiert und auf eine PC Harddiskette gespeichert für weitere Off-Line Analyse mit dem Softwareprogramm pClamp8 (Axon Instrumente). fEPSP Steigung wurde anhand einer Geraden gemessen.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 RNA Isolation

Die Isolierung der RNA erfolgte durch eine Phenol-Chloroform Extraktion mit einer ethanolischen Ausfällung aus der wässrigen Phase. Hierzu wurden die behandelten Zelllinien oder primären Zellen geerntet. Nach Zugabe von 1 mL peqGOLD Trifast™ erfolgte die Resuspension der Probe mittels Spritze, welches dann in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Nach der Zugabe von 200 µL Chloroform, wurde gemischt und es erfolgte eine Zentrifugation (10 000 x g, 5 – 10 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig in ein 2 mL Eppendorf Gefäß überführt und mit 100 % Ethanol auf 2 mL aufgefüllt. Wiederum wurde gemischt und zentrifugiert (gleiche Bedingungen). Der Überstand wurde verworfen und mit 75% eiskalten Ethanol auf 2 mL aufgefüllt. Hatte man eine Zellkultur mit geringer Zellzahl, so konnte man zur Unterstützung der Präzipitation die Proben bei –20°C für eine Stunde oder über Nacht lagern. Ansonsten, oder nach der Kalt-Lagerung, erfolgte eine erneute Zentrifugation (gleiche Bedingungen) und der Überstand wurde wiederum verworfen. Nach Lagerung der isolierten RNA für 5 – 10 Minuten im Thermoshaker bei 60°C, wurden 50 µL ddH₂O hinzugegeben. Die isolierte totalRNA wurde sofort in cDNA (copyDNA) umgeschrieben.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Für das Umschreiben der isolierten totalRNA wurde ein Mastermix aus 10 x RT-Puffer, Oligo-dTs, Magnesiumchlorid, dNTPs, RNase-Inhibitor und der Reversen Transkriptase benutzt. 500 ng bis 1 µg isolierte totalRNA wurden mit 2,5 µM Oligo dTs, 2,5 mM

dNTPs, 5,5 mM MgCl₂, 10 U RNase Inhibitor und 25 U reverse Transkriptase und dem dazugehörigen Puffer auf 20 µL Endvolumen gebracht. Bei dem Initiationsschritt von 25 °C für 10 min lagern sich die Oligo-dTs an die RNA. Die reverse Transkription erfolgte bei 48 °C für 30 min, gefolgt von der Inaktivierung bei 95 °C für 5 min. Die Kühlung auf 4 °C galt dem Erhalt der neu synthetisierten cDNA, die bei -20 °C aufbewahrt wurde.

2.2.4.3 Real-time PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR - polymerase chain reaction) dient der Vervielfältigung von DNA und ist Anfang der 80-iger Jahre von Kary Mullis entwickelt worden. Sie besteht aus drei folgenden Hauptschritten: der Denaturierung - der Hybridisierung (Annealing) – der Elongation. Diese Art der Vervielfältigung ist ein qualitativer Nachweis [91]. Die real-time PCR wurde an einem 7500 Pro Real-Time PCR System durchgeführt unter Verwendung des TaqMan oder SybrGreen Master Mixes (Applied Biosystem). Nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde die relative Expression des Zielgens berechnet. Es wurde jeweils ein Mastermix für jedes Zielgen sowie das Housekeeping-Gen angefertigt. Der Mastermix bestand aus dem 2 x PCR Mastermix (der Taq- Polymerase, dNTPs, Magnesiumchlorid und ROX enthielt oder SybrGreen), den entsprechenden Forward- und Reverse- Primer, den fluorgenen Sonden (Probes; falls vorhanden) und aus sterilem Wasser. Der Reaktionsansatz selbst besaß ein Volumen von 20 µL. Eine PCR beinhaltete 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus je 15s Denaturierung bei 95 °C und Annealing bei 60 °C besteht. Die relative Menge der RNA wurde an dem Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert.

2.2.4.4 gDNA Isolation

Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood&Tissue Kit von Qiagen. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers. Im kurzen zusammengefasst: mittels Proteinase K wurden die Zellen über Nacht bei 56 °C lysiert. Die lysierten Zellen werden auf eine Mini-Säule geladen, die eine DNA-bindende Membran enthält. Durch mehrmaliges Waschen werden überschüssige Komponenten herausgespült und die Eluierung der DNA erfolgt mittels RNA-freiem PCR Wasser. Die Konzentrationsbestimmung wurde an einem NanoDrop 2000 gemessen, wobei die gereinigte DNA eine $A_{260/280}$ Ratio von 1.7 bis 1.9 besitzt.

2.2.4.5 Methylierungs-spezifische PCR

Für die Bestimmung des DNA-Methylierungszustandes, wurde gDNA einer Bisulfite-Konvertierung nach den Angaben des Herstellers unterzogen (EpiTect Bisulfit Kit, Qiagen). Das heist, es wurde unmethyliertes Cytosin zu Uracil umgeschrieben, methyliertes dagegen blieb unverändert. Nach der Konvertierung wurde die Einzelstrang-DNA an die Membran der EpiTect Säule gebunden, mehrmals gewaschen. Nach der Desulfonierung der DNA erfolgten ein weiterer Waschschrift und die Elution der reinen, konvertierten DNA.

Für die Methylierungs-spezifische PCR (MSP) selbst, wurde eine spezielle Polymerase der Firma Qiagen verwendet (HotStarTaq® d-Tect Polymerase; EpiTect MSP Kit), die zusammen in fertigem Master Mix geliefert wurde. MSP-spezifische Primer wurden mit Bisulfite-konvertierte gDNA, RNA-freiem Wasser und dem MSP-Masternix zusammenpipettiert. Eine MS-PCR beinhaltete 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus je 15s Denaturierung bei 95 °C und Annealing bei 60 °C besteht.

LMP2 Promotor, IRF1 Bindungsstelle:

M-Fw: 5'-CGTTT TAGAGGAAGAAGAAATCGAAAGTC-3'
 U-Fw: 5'-GGTGT TTAGAGGAAGAAGAAATTGAAAGTT-3'
 M-U-Rv: 5'-ACAAAAATCCTACCCTCAATCTAAAATAA-3'

LMP7-Promotor, IRF1 Bindungsstelle:

M-Rv: 5'-CGACTCTACGACAAAAAATAAAAACG-3'
 U-Rv: 5'-CCATCAACTCTACAACAAAAAATAAAAACA-3'
 M-U-Fw: 5'-TTAGTTGGTTTTATTGATGTGGTAGTAGGA-3'

Abkürzungen: Fw – Forward; Rv – Reverse; M – methyliert; U - unmethyliert

2.2.5 Proteinbiochemie

2.2.5.1 Proteinisolation und –bestimmung

- RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 0,25 % Natriumdeoxy-cholate, 0,1 % SDS, 1mM EDTA

Die Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid, BCA) macht sich die Reduktion von Kupfer-2+ (Cu²⁺) zu Kupfer-1+ (Cu¹⁺) durch Proteine in alkalischer Lösung zunutze. Jede Probe unterlag einer Dreifach-Messung. Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und auf Eis mit Lysis-Puffer (RIPA) isoliert. Der Lysis-Puffer enthielt Proteaseinhibitoren, L-Vanadate (5 µL/mL), Leupeptin (1 mg/mL), Aprotinin (1 mg/mL) und Phenylmehtylsulfonylfluorid (PMSF, 10 µL/mL).

Nach erfolgter Homogenisierung der Probe wurde diese für 15 min bei 4 °C, 14 000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für die Proteinbestimmung mittels des BCA-Kit (Inter-Chem) verwendet. Hierfür wurde die Probe verdünnt (1:25) und anhand einer Standardkurve (bovines Serum-Albumin BSA) die Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) berechnet. Die Messung des Kupfer-Umsatzes erfolgte nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C an einem Spektrometer FIRMA bei 562 nm.

2.2.5.2 Western Blot Analyse und Immundetektion

- Ladepuffer: 4x Protein Ladepuffer (Li-Cor)
- MOPS-Puffer: 20x MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen)
- Waschpuffer: Phosphat-gepufferte Saline, 0.05% Tween-20
- Blockierungs-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 3% (v/v) Magermilch

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [92] basiert auf dem Prinzip, dass das anionische Detergenz SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit wird die Auftrennung nach Größe in einem elektrischen Feld der diskontinuierlichen SDS-PAGE gegeben.

Hierfür wurden die Proben in 4x Ladepuffer (Li-Cor) bei 95 °C für 5 min denaturiert, kurz zentrifugiert und in einer Menge von 35 – 55 μL /Tasche/Probe auf ein 8 – 16 %-iges Gradienten-Gel (Invitrogen) aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 120 Volt erfolgte die elektrophoretische Trennung der negativ-geladenen Proteine. Zur Orientierung während der Elektrophorese und zur späteren Einordnung der Molekulargewichte wurden 3,5 μL Protein Marker V (PeqLab, Deutschland) verwendet. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden per Dry-Blotting-Verfahren auf eine Polyvinyliden-Fluorid (PVDF) Membran transferiert und dort durch spezifische Antikörper identifiziert. Das Blot-Verfahren wurde nach dem iBlot-System der Firma Invitrogen durchgeführt. Der Transfer erfolgte bei 20 Volt für 10 Minuten.

Überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit Magermilchpulver für 45 min bei Raumtemperatur (RT) abgesättigt. Die Inkubation der primären Antikörper (Tabelle 2) wurde bei 4°C über Nacht bei leichtem Schütteln durchgeführt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit Wasch-Lösung gewaschen, für mindestens 1 h mit fluoreszierenden Sekundär-Antikörper (Li-Cor, IRDye) inkubiert und wiederholt gewaschen. Die Detektion der Antikörperreaktion wurde mit dem Odyssey Infrarot-Bild System (Li-Cor, USA) vollzogen, das emittierte Licht der Antikörper-gebundenen

Proteine wurde bei 680 nm oder 800 nm gemessen.

Als ein weiteres Detektionssystem wurde das ECL-Plus-System (Amersham, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden sekundäre Peroxidase-gekoppelten Antikörper benutzt. Unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die mit ECL benetzte Membrane mit einer Klarsichtfolie überdeckt und ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Deutschland) aufgelegt. Die Belichtungszeit des Films variierte je nach Signalstärke von einigen Sekunden bis zu 60 min.

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Western-Blot Antikörper

primäre Antikörper	Herkunft	hergestellt in	Verdünnung
anti-LMP2			
ab3328	Abcam	Kaninchen	1 : 2000
sc28809	Santa Cruz	Kaninchen	1 : 1000
anti-LMP7			
ab3329	Abcam	Kaninchen	1 : 1000
K63	AG Prof. Kloetzel	Kaninchen	1 : 15000
anti-GFAP	SySy/Chemicon	Maus	1 : 1000
anti-NeuN	Millipore	Maus	1 : 1000
anti-β-Actin	Sigma	Maus	1 : 5000

2.2.5.3 Chromatin-Immunpräzipitation - ChIP

- ChIP-Zell-Lysepuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 85 mM KCl, 0,5 % NP40
- Nucleus-Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1 % SDS
- ChIP-Verdünnungspuffer: 0,01 % SDS, 1,1 % Triton X, 1,1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 167 mM NaCl
- Waschpuffer, geringe Salzkonzentration: 0,1 % SDS, 1 % Triton X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl
- Waschpuffer, hohe Salzkonzentration: 0,1 % SDS, 1 % Triton X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl
- LiCl-Waschpuffer: 0,25 M LiCl, 1 % NP40, 1 % Na-deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8

Durch die Anwendung der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) kann eine Aussage über etwaige Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen getroffen werden. Bei dieser Methode wird die Eigenschaft des Protein-A ausgenutzt, unspezifisch die konstanten Beriche an Immunglobuline (Ig) der Klasse G (IgG) zu binden. Eine Kopplung von Protein-A an Agarose Kügelchen (Protein-A Sepharose) ermöglicht die Ausfällung eines Immunkomplexes. Durch die Separation des Komplexes mittels real-time PCR ist es möglich Protein-DNA Interaktionen zu detektieren.

Für die ChIP Analyse wurden HT-22 und BV-2 Zellen verwendet und die Proteine wurden nach unstimulierter oder IFN γ -Behandlung mit Formaldehyd vernetzt und sofort geerntet. Das Zellextrakt wurde in ChIP-Lysepuffer (enthalten Proteaseinhibitoren siehe Kapitel 2.2.5.2) lysiert und anschließend am Soniprep 150 (Sanyo, München) sonifiziert. Die somit entstandenen 200 bis 400 bp Fragmente wurden bei 4 °C mit Protein-A-Sepharose für eine Stunde vorinkubiert, um eine anschließende Inkubation mit 3-4 μ g Antikörper über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C zu vollziehen. Die Vernetzung der immun-präzipitierten DNA-Fragmente wurde bei 65 °C mit einer erhöhten NaCl-Konzentration aufgelöst. Nach mehrmaligen Waschen, erst hohe, dann geringe NaCl-Konzentration, erfolgte die DNA-Isolation nach den Anweisungen des DNA Aufreinigung-Kits (GE Healthcare).

LMP2 Promotor:

IRF1 Bindungsstelle: Fw – 5'-CGAGCTGGTGGAGCTGACTAG-3'
Rv – 5'-AGAAGAGGAGAATGAGATTCATGGA-3'

LMP7-Promotor:

IRF1 Bindungsstelle: Fw – 5'-TGATGTGGCAGCAGGAAAAC-3'
Rv – 5'-CACAGATCCAGTAACGCCATGA-3'

Abkürzungen: Fw – Forward; Rv – Reverse;

2.2.6 Immunfluoreszenz und –histologie

- Blockierungspuffer: PBS enthaltend 10 % (v/v) Ziegen Serum, 0,5 % (v/v) Triton X, 1% (v/v) BSA
- Färbepuffer: Blockierungspuffer 1:2 verdünnt mit PBS
- Waschpuffer: PBS, 0,1 % Triton X

a) Immunfluoreszenz

Primäre Zellen wurden hierfür auf Poly-L-Ornithin beschichtete Gläschen in einer 24-Well Platte ausgesät. Nach Beendigung der Behandlung, wurden die Gläschen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, kurz gewaschen und kurz mit 1 %-iger Tritonlösung permeabilisiert.

b) Immunhistologie

EAE-Gehirne wurden nach erfolgreicher Perfusion isoliert, halbiert (eine Hälfte für die Proteinbiochemie, sofortiges Wegfrieren; andere Hälfte für die Histologie) und fixiert. Nach Dehydrierung in Tissue-Tek (Sakotek) gebettet. Die Gehirne wurden am Kryostaten geschnitten und bei -20°C aufbewahrt. Die für die Histologie verwendeten

Gewebsschnitte wurden für mindestens eine Stunde luftgetrocknet und mit Dako-Pen (Dako) umrandet. Nach Fixierung mit 4% PFA und kurzem Spülen mit 1 %-iger Tritonlösung, erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen.

Die folgenden Schritte gelten sowohl für die Immunfluoreszenz als auch -histologie: Nach zwei-stündigem Blocken, folgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper, über Nacht bei 4°C mit leichtem Schütteln. Nach wiederholtem Waschschrift betrug die ein-stündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur. Die Zellkern-Färbung Hoechst 33258 wurde bei dem Waschschrift nach dem Sekundär-Antikörper hinzugefügt. Die verwendeten Antikörper, primär und sekundär, sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 gelistet. Immuno-Mount wurde als Eindeckmedium verwendet.

Tabelle 3 Aufzählung der primären Antikörper

primäre Antikörper	Herkunft	hergestellt in	Verdünnung
anti-LMP2 ab3328	Abcam	Kaninchen	1 : 5000
anti-LMP7 K63	AG Prof. Kloetzel	Kaninchen	1 : 2000/5000
anti-H2K	BioLegend	Biotin	1 : 200
anti-Map2	Chemicon	Hühnchen	1 : 500
anti-Tuj1	Millipore	Hühnchen	1 : 500
anti-Synapsin	SySy	Meerschwein	1 : 1000
anti-PSD95	Abcam	Maus	1 : 1000
anti-GFAP	SySy	Meerschwein	1 : 1000
anti-NeuN	Millipore	Maus	1 : 500
anti-NFM	Millipore	Maus	1 : 2000
anti-Iba1	Acris	Ziege	1 : 500

Tabelle 4 Aufzählung der sekundären Antikörper

sekundäre Antikörper	Herkunft	gerichtet gegen	Verdünnung
Cy2	Amersham Bioscience	Maus/Kaninchen	1 : 500
Cy3	Amersham Bioscience	Maus/Kaninchen/Meerschwein	1 : 500
Cy5	Millipore	Maus/Kaninchen/Meerschwein	1 : 500
Alexa 488	Millipore	Maus/Hühnchen/Kaninchen	1 : 500
Alexa 546	Millipore	Hühnchen/Kaninchen	1 : 500
Biotin-FITC	e-Bioscience	Biotin	1 : 400

2.2.6.1 Durchflusszytometrie

Zellen wurde geerntet und in Cell Wash (BD Bioscience; CW) resuspendiert. Biotin-anti-Maus H2K (Biolegend) wurde dazu gegeben (1:100), bei 4°C für 20 Minuten inkubiert und danach mit CW gewaschen. Der Zweit-Antikörper, Biotin-gelabelt (1:400, APC; e-Bioscience), wurde unter den gleichen Bedingungen wie der Erst-Antikörper gehandhabt. Nach erneutem Waschen mit CW, wurde die Analyse am Durchflußzytometer FACS Calibur™ (BD, Heidelberg) ausgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe des FACS Calibur Software Paket ermittelt (Mittlerer Fluoreszenz Intensität).

2.2.7 Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis

2.2.7.1 EAE Experiment

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche an lebenden Tieren entsprachen den Institutsrichtlinien und folgten den staatlichen Gesetzen. Die verwendeten Mäuse wurden unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen im eigenen Tierstall gezüchtet und sind dort einem 12:12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus in klimatisierten Käfigen gehalten. Die EAE-Experimente wurden zum einen in Neurowissenschaftlichen Forschungshaus I der Charité (G0268/08; April 2008), zum anderen in der Tierversuchsanstalt des Universitätsklinikum Düsseldorf (G184/10; November 2010) in Kooperation mit der AG Aktas durchgeführt. 6-8 Wochen alte C57Bl/6 oder LMP7-/- Mäuse wurden subcutan an den Flanken mit 200 µL Immunsat immunisiert. Das Immunsat enthielt zu gleichen Teilen PBS und CFA (Freud's Complete Adjuvant; Difco), 200 µg MOG₃₅₋₅₅ und 800 µg H37RA (Mycobacterium tuberculosis; Difco). Am Tag der Immunisierung sowie zwei Tage später wurde den Mäusen intraperitoneal (i.p.) 400 ng Pertussis Toxin (Ptx; List Biological Laboratories) verabreicht. Innerhalb der Versuche wurden die Tiere täglich auf Lähmungserscheinungen hin untersucht und der Krankheits- bzw. Behinderungsgrad durch folgenden Index (Scoring) bestimmt:

- 0 = gesund
- 1 = Schwanzparalyse (TPL)
- 2 = Parese der Hinterbeine (TPL+HPA-L)
- 3 = Plegie der Hinterbeine (TPL+RRW+HPL)
- 4 = Plegie der Vorderbeine (TPL+RRW+HPL+FPA)
- 5 = moribund, Tod durch EAE

TPL: vollständige Schwanzlähmung; RRW: gestörter Dreh-Reflex; HPA: partielle Lähmung der Hinterbeine; HPL: vollständige Lähmung der Hinterbeine

Ab einem Krankheitsgrad von 3 wurden die entsprechenden Tiere zweimal täglich untersucht und ihnen jeweils 200 µl einer 5%igen Glukoselösung i.p. injiziert. Bei anhaltender Verschlechterung wurden die Tiere aus dem Versuch genommen.

2.2.7.2 T-Lymphozyten-Proliferationsassay

- Waschmedium: RPMI-Medium enthaltend 1% (v/v) P/S
- Kultivierungsmedium: RPMI, 0,5 µM β-Mercapto-Ethanol, 1% (v/v) P/S, 1% (v/v) Glutamax, 10% (v/v) FKS

Hierfür wurden vor der Perfusion der Tiere die Lymphknoten entnommen, die Lymphozyten isoliert (verschiedene Zentrifugationsschritte mit dem Waschmedium inklusive Erythrozyten-Lyse) und diese wie folgt behandelt: unstimuliert (Kontroll-Zellen), 5 bzw. 25 µg/mL und 50 µg/mL MOG₃₅₋₅₅. Nach 48h erfolgte die Zugabe von radioaktiven-markiertem Deuterium (H-Isotop), die Inkorporation des markierten Wasserstoffes wurde nach weiteren 24h gemessen (Count). Die behandelten Zellen wurden den unbehandelten Zellen angeglichen (Bsp.: 5 µg/mL MOG-behandelte Zellen dividiert durch unstimulierte Zellen) und dieser Wert wurde als Index aufgeführt.

2.3 Statistische Analyse

Soweit nicht anders vermerkt, wurde jeweils eine Dreifach-Analyse aller Experimente durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde One-Way ANOVA gefolgt von Dunnett/Bonferri (für die Mehrfach-Behandlungen) oder der ungepaarte T-Test verwendet. Die Analyse fand mit dem Programm GraphPad Prism 5 statt. Alle Daten werden als Mittelwert inklusiver Standardfehler (SEM) angezeigt. Für die Signifikanz gilt folgendes:

P: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

2.4 Software

Folgende Software-Programme oder Pakete wurden während der Doktorarbeit verwendet:

Adobe Photoshop CS4

Adobe Illustrator CS4

ALGGEN Research Software

Graph Pad Prism 5

FACS Software Programm

Magellan Data Analyse Software

McRack 3.9.1 (Multi Channel System, Reutlingen)

incl. Spanner-Analyse Programm (Result, Düsseldorf)

Methyl Primer Express Software

Microsoft Office 2010

Reference Manager 11

Odyssey Imaging System Software

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Immunoproteasom-defizienten Tiere im Krankheitsverlauf der EAE

Der Beitrag des Immunoproteasoms zu inflammatorischen Prozessen wurde bereits in der Vergangenheit bei neurodegenerativen Erkrankungen [93], rheumatoider Arthritis [94] und bei viraler Infektion (LCMV) [95] gezeigt. Um die Rolle des Immunoproteasoms während der MS, beziehungsweise dem entsprechenden Tiermodell (EAE) zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weibliche LMP2-defiziente Mäuse (LMP2 $-/-$) gemeinsam mit Wildtyp(WT)-Geschwistern (LMP2 $+/+$) aktiv mit murinem Myelin-Oligodendrozyt-Glykoprotein der Sequenz 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) immunisiert. Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine LMP2-Defizienz zu Beginn der Erkrankung kaum einen Unterschied zu den Kontroll-Tieren zeigte (Abb. 7A). Zu einem späteren Zeitpunkt (ca. ab Tag 35 nach der Immunisierung) wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der autoimmunen Encephalomyelitis der Knock-out Tiere festgestellt. Zur Erkrankungs-Inzidenz ist zu sagen, dass bei den WT-Tieren sechs, bei den LMP2 $-/-$ Tieren neun erkrankt sind.

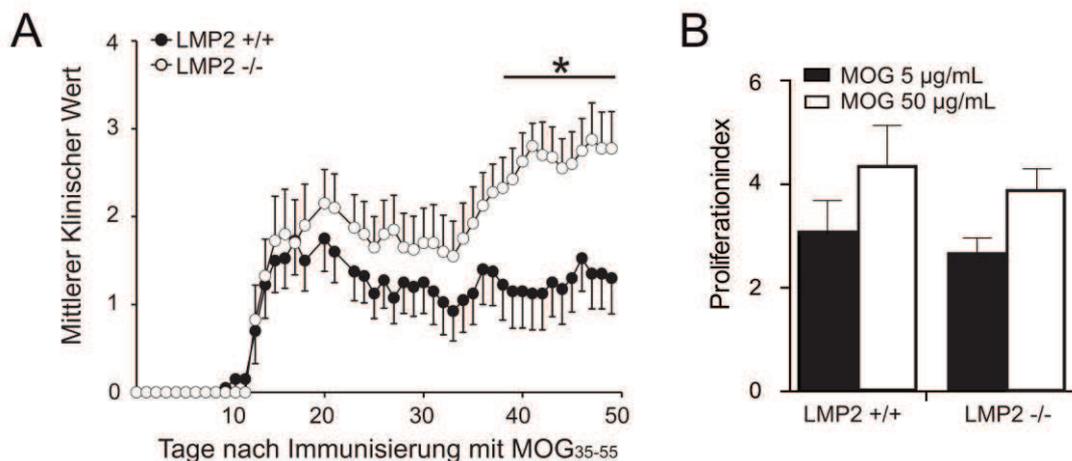


Abb. 7 Klinische Auswertung der aktiven EAE in LMP2 $-/-$ und LMP2 $+/+$ Mäusen. (A) Nach Immunisierung von LMP2 $+/+$ und LMP2 $-/-$ mit MOG₃₅₋₅₅ wurden die Versuchstiere täglich auf ihre klinischen Symptome untersucht, die im klinischen Wert zusammengefasst ist (siehe Kapitel 2.2.7.1). Dargestellt ist der mittlere Krankheitsverlauf der Versuchsgruppen, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (n = 10, Inzidenz: LMP2 $-/-$: 9; LMP2 $+/+$: 6) **(B)** Proliferationsassay der T-Lymphozyten isoliert aus den in A) beschriebenen Mäusen 50 Tage nach Immunisierung. Sowohl die Stimulation mit 5 µg/mL als auch 50 µg/mL MOG zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Genotypen. Dargestellt ist der Mittelwert aus allen 10 Tieren der Genotypen.

Die Funktion von der LMP2-Untereinheit scheint phänotypisch somit erst im späteren Verlauf der Krankheit sichtbar zu werden. Um den Einfluss des Immunoproteasoms auf die T-Zell-Aktivierung zu messen, wurden T-Zellen aus den Lymphknoten aller Tiere isoliert. Die Proliferation wurde nach drei-tägiger Inkubation in MOG₃₅₋₅₅-stimulierten T-Lymphozyten (5 und 50 µg/mL) gemessen. Der Proliferationsassay der Knock-out Tiere zeigte einen ähnlichen Index wie bei den Wildtyp-Tieren (Abb. 7B). Folglich resultierte die verstärkte Entzündung des ZNS nicht aus einer erhöhten Anzahl der T-Lymphozyten und ist somit nicht von der Immunantwort abhängig.

Das Fehlen der induzierbaren LMP2-Untereinheit steht nicht im Kontext mit einem nicht-funktionsfähigen Immunoproteasom-Komplex im Gegensatz zu einer fehlenden LMP7-Untereinheit. Die Anwesenheit der katalytisch-aktiven LMP7-Untereinheit spricht für das Vorhandensein von gemischten Proteasom-Populationen (siehe Kapitel 1.1.2). Ein funktionaler gemischter Proteasom-Komplex, in dem die LMP7-Untereinheit integriert ist, könnte den der vorgefundene Krankheits-Verlauf zu Beginn der Erkrankung in den LMP2-defizienten Mäuse erklären. Für weitere Analysen wurden aus diesem Grund LMP7-defiziente Mäuse verwendet, da eine fehlende LMP7-Untereinheit einen nicht-funktionellen Immunoproteasom-Komplex widerspiegelt. Die Existenz einer Triple Knock-out Mäuse (alle drei katalytisch-aktiven UE des iPs, siehe [96]) war während dieser Arbeit noch nicht gegeben.

Nach erfolgter aktiver Immunisierung mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid in LMP7-defizienten Mäusen, wurde der EAE-Verlauf beobachtet. Das Ergebnis der klinischen Bewertung (insgesamt sechs Tiere pro Gruppe) ist in Abb. 8A dargestellt. Im Gegensatz zu der LMP2-Defizienz, scheint eine LMP7-Defizienz bereits zu Beginn der Erkrankung einen relevanten Beitrag zur Krankheitsschwere zu leisten, wenn auch in unerwarteter Weise. Die Erkrankung begann bei den LMP7-defizienten Tieren zu einem früheren Zeitpunkt, und zeigte im Vergleich zu den Kontroll-Tieren verstärkte Lähmungserscheinungen während des EAE-Verlaufs (Abb. 8A). Zur Erkrankungs-Inzidenz ist zu sagen, dass bei den WT-Tieren zwei, bei den LMP7^{-/-} Tieren fünf erkrankt sind. Somit zeigte sich, dass das Fehlen der Immunoproteasom-Untereinheit LMP7 einen ungünstigen Einfluss auf die autoimmune Encephalomyelitis hatte.

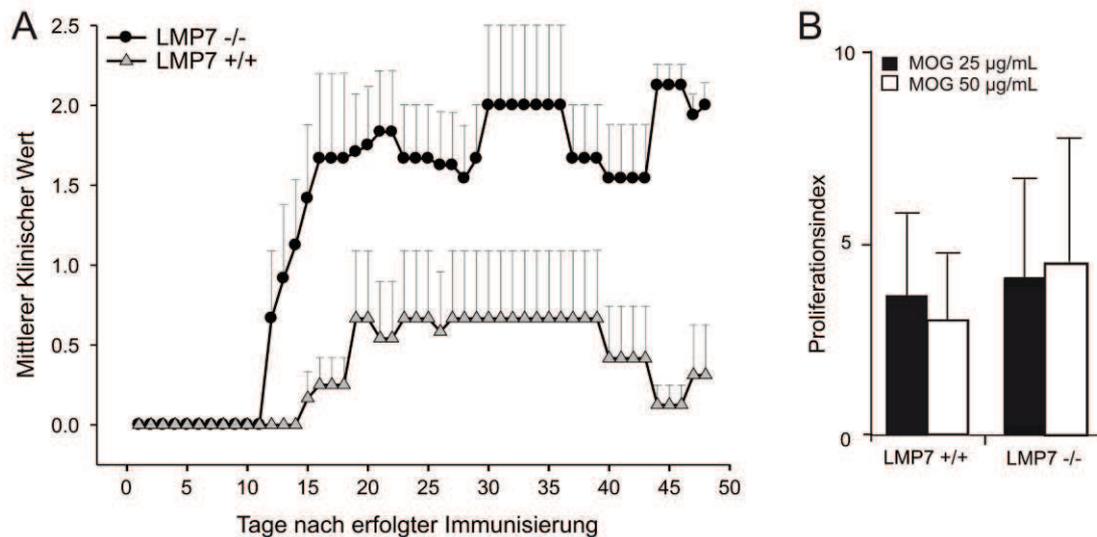


Abb. 8 Klinische Auswertung der aktiven EAE in LMP7 -/- und LMP7 +/+ Mäusen, immunisiert mit MOG₃₅₋₅₅. (A) Nach Immunisierung von LMP7 +/+ und LMP7 -/- Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ wurden die Versuchstiere täglich auf ihre klinischen Symptome untersucht, die im klinischen Wert zusammengefasst ist (siehe Kapitel 2.2.7.1). Dargestellt ist der mittlere Krankheitsverlauf der Versuchsgruppen, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. (n = 6 Tiere, Inzidenz: LMP7 -/- 5; LMP7 +/+ 2). (B) Proliferationsassay der T-Lymphozyten isoliert aus den in A) beschriebenen Mäusen 50 Tage nach Immunisierung. Sowohl die Stimulation mit 25 µg/mL als auch 50 µg/mL MOG₃₅₋₅₅ zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Dargestellt ist der Mittelwert aus allen 6 Tieren der Genotypen.

In den nächsten Schritten stellte sich daher die Frage, welche zugrundeliegenden Prozesse hierfür verantwortlich zu machen sind. Zu weiteren Untersuchungen wurden T-Lymphozyten aus den Lymphknoten isoliert und mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid (25 µg/mL und 50 µg/mL) stimuliert. Vergleichbar mit dem Stimulationsindex der T-Lymphozyten der LMP2-EAE konnte keine signifikante Veränderung in den LMP7-defizienten T-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-T-Lymphozyten beobachtet werden (Abb. 8B). Die Daten der LMP2 -/- als auch LMP7 -/- EAE weisen darauf hin, dass das fehlende Immunoproteasom keinen Effekt auf die T-Zell-Aktivierung bzw. auf peripher-immunologische Parameter in der hier zugrunde-liegende CD8⁺ T-Lymphozyten-vermittelten EAE hat.

Unter welchen experimentellen Bedingungen Neuronen das Immunoproteasom synthetisieren war ein Ziel dieser Arbeit. Der Anstoß für eine hippocampale Immunoproteasom-Überprüfung im Zusammenhang eines chronisch-entzündlichen Prozesses (EAE), ist die Integrität des Hippocampus bei Lernvorgängen und eine dort-befindliche andauernde Neurogenese. Im HC existieren viele verschiedene Arten an exzitatorischen Neuronen, somit sind neuronale Verbindungen wie Neurofilamente (NFM), Axone und Synapsen vertreten. Aus dem Hippocampus von drei, aber dennoch aktiv-immunisierten Wildtyp-Mäusen (mittlerer Krankheitswert: 0,5) und drei erkrankten

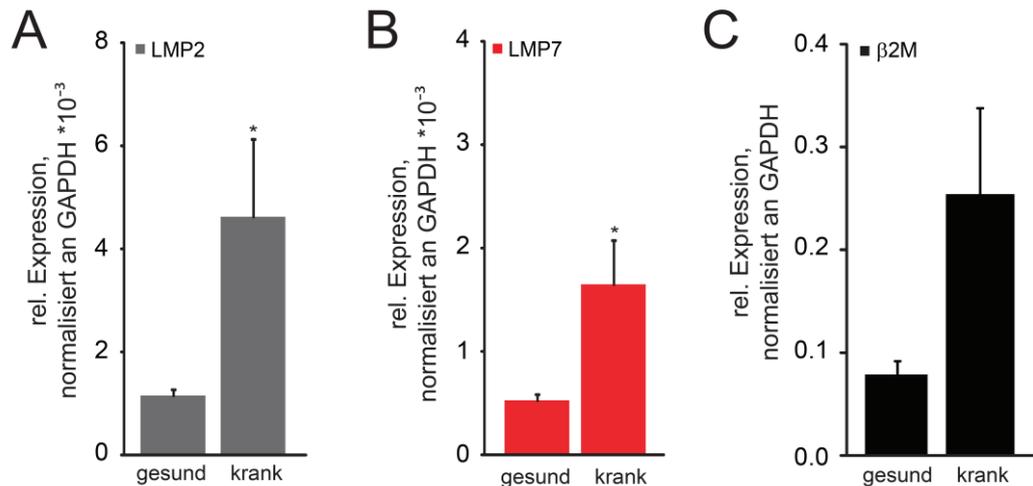


Abb. 9 Gen-Expression Analyse im HC von gesunden, dennoch immunisierten, und erkrankten EAE-Mäusen. (A-C) RNA-Expression für die induzierbaren Untereinheiten LMP2 (A; grau) und LMP7 (B; rot) und dem MHC I-Molekül β 2M (C; schwarz) im HC von EAE Tieren. (n = 3; Mittlerer Krankheitsverlauf: gesund: 0,5; krank: 2,6)

WT-Tieren (mittlerer Krankheitswert: 2,6) wurde die RNA isoliert und die Expression von LMP2 und LMP7 mittels relativer Genexpressions-Analyse (real-time PCR) verglichen (Abb. 9).

Während die RNA-Expression der induzierbaren Untereinheiten LMP2 und LMP7 nur schwach im gesunden HC exprimiert ist, waren ihre Transkript-Mengen im erkrankten HC signifikant erhöht (Abb. 9A+B). Zur Ermittlung des Beitrags am MHC I-Signalweg wurde die Expressionsanalyse von β 2M durchgeführt (Abb. 9C). Ein Anstieg der β 2M-mRNA-Expression spricht für den inflammatorischen Vorgang im Hippocampus, der eine Aktivierung des Immunsystems hervorhebt.

Das Beobachten einer erhöhten immunoproteasomalen Transkription im schweren Krankheitsgrad der EAE schließt nicht aus, dass die *de novo*-Synthese des induzierbaren Proteasoms in Neuronen stattgefunden hat. Da sich in den zuvor beschriebenen Untersuchungen kein Hinweis für einen Einfluss des Immunoproteasoms auf die Generierung der encephalitogenen Immunantwort fand, aber dennoch eine Hochregulation an LMP2 und LMP7 im HC finden ließ, wurden die Untersuchungen auf weitere Hirnareale ausgeweitet. Hierfür wurden die Großhirnhemisphären sowie das Kleinhirn der Tiere der LMP7-EAE nach Perfusion isoliert und für histologische Analysen verwendet. Der Schwerpunkt lag dabei auf der immunhistologischen Analyse von UPS-assoziierten Parametern. Grundsätzlich geht eine katalytische Dysfunktion im UPS mit einer Häufung von Ubiquitin-Proteinen einher. Dieses Phänomen konnte in LMP7-defizienten Tieren tatsächlich nachgewiesen werden.

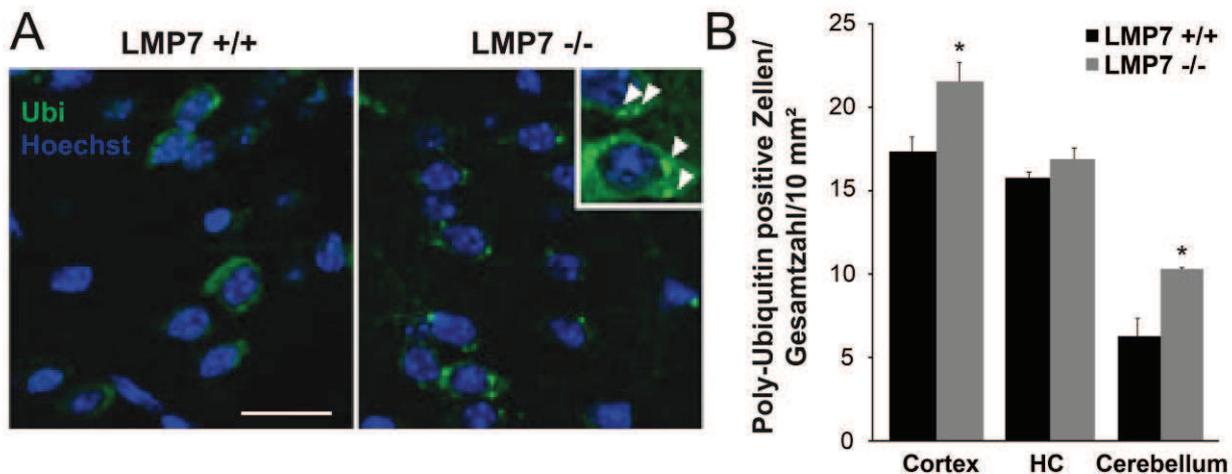


Abb. 10 Das Immunoproteasom ist essentiell für den proteolytischen Abbau im pro-inflammatorischen ZNS. (A) Immunhistologische Darstellung der Ubiquitinierung im Gehirn (Abbildung Cortex, Antikörper: FK1). Maßstab: 25 μ M (B) Die Quantifizierung der Ubiquitin-positiven Zellen (grün) wurde anhand der Gesamtzahl pro 10 mm^2 berechnet. Die Regionen des Cortex, des Hippocampus (HC) und des Cerebellums wurden zwischen LMP7 +/+ und LMP7 -/- verglichen.

Bei Abwesenheit der LMP7-Untereinheit und damit dem Fehlen eines funktionellen Immunoproteasoms waren verstärkt Ubiquitin-Aggregate in verschiedenen ZNS-Arealen nachweisbar (Abb. 10). Ein signifikanter Anstieg an Zellen mit Ubiquitin-Anlagerungen konnte im Cortex und Cerebellum, jedoch nicht im Hippocampus, gezeigt werden.

Angesichts dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, welche Zelltypen die induzierbaren Untereinheiten im ZNS produzierten. Hierzu erfolgte eine histologische Auswertung auf der Basis von Markern für Zellen des ZNS und eine Kolo-kalisation mit den entsprechenden Immunoproteasom-Untereinheiten. Zum Nachweis von Astrozyten wurde eine Färbung mit GFAP durchgeführt. Die Färbung von Neuronen erfolgte durch das nukleär lokalisierte Neuronenprotein NeuN. Microgliazellen wurden mit dem Calcium-bindenden Adaptermolekül Iba1 identifiziert. Das Hauptaugenmerk lag immer noch im Hippocampus, welcher exemplarisch in Abb. 11 und Abb. 12 gezeigt ist. Die übrigen Hirnareale wurden ebenso analysiert und ergaben ein ähnliches Bild.

Im HC konnte vor allem eine Kolo-kalisation der induzierbaren Untereinheiten mit Microgliazellen nachgewiesen werden (Abb. 11A). Die Assemblierung des Immunoproteasom-Komplexes in diesen Zellen wurde bereits beschrieben [97]. Hingegen fand die Immunoproteasom-Expression in Astrozyten nur vereinzelt statt (Abb. 11B).

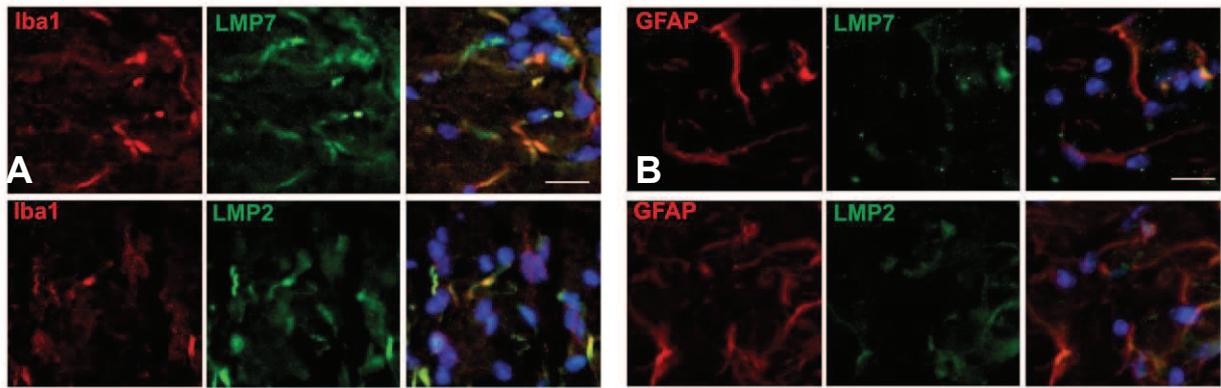


Abb. 11 Auswertung der Immunoproteasom-positiven Gliazellen im immunisierten murinen Gehirn. (A) Repräsentative Färbungen für Iba1 (rot) und LMP2 (grün, unten) bzw. LMP7 (grün, oben) im EAE-Gehirn. (B) Repräsentative Färbungen für GFAP (rot) und LMP2 (grün, unten) bzw. LMP7 (grün, oben) im EAE-Gehirn. Die Kolokalisation der beiden angefärbten Proteine wird jeweils im dritten Bild dargestellt. Gelb ist das Resultat einer Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz. Bei der Überlagerung ist der Zellkern (blau) mit Hoechst 33258 markiert. Maßstab: 20 µm; Mittlerer Klinischer Verlauf des gezeigten Tieres: 1.5

Interessanterweise gelang es trotz Einsatz zusätzlicher neuronaler Marker (NFM, NeuN) nicht, in Neuronen die Expression von LMP7 und LMP2 zu zeigen (Abb. 12A+B).

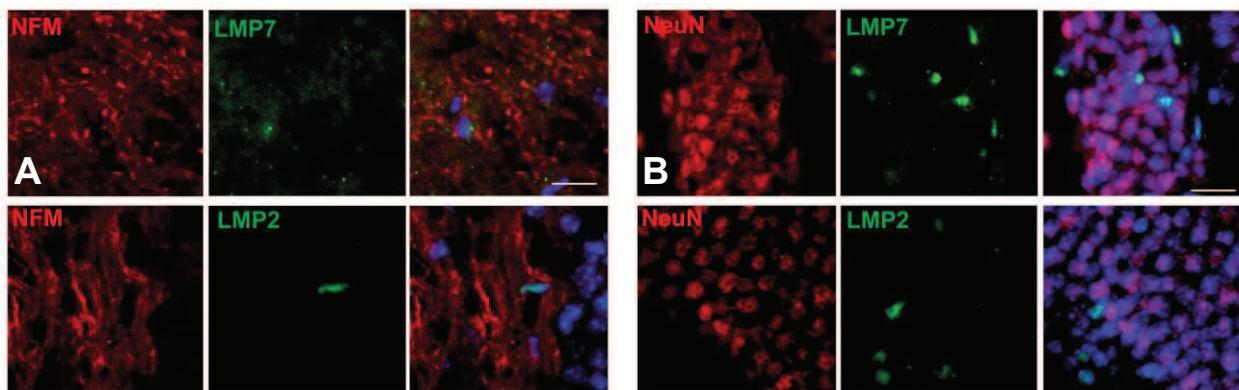


Abb. 12 Auswertung der Immunoproteasom-positiven neuronalen Zellen im inflammatorischen murinen Gehirn. (A) Repräsentative Färbungen für NFM (rot) und LMP2 (grün, unten) bzw. LMP7 (grün, oben) im Hippocampus von EAE-erkrankten Tieren. (B) Repräsentative Färbungen für NeuN (rot) und LMP2 (grün, unten) bzw. LMP7 (grün, oben) im Hippocampus von EAE-erkrankten Tieren. Die Überlagerung der Bilder zeigt keine durch gelb angezeigte Kolokalisation. Hoechst 33258 markierte Zellkerne in blau. Maßstab: 20 µm; Mittlerer Klinischer Verlauf des gezeigten Tieres: 2

Obwohl die initiale, gegen das ZNS-gerichtete Immunantwort offensichtlich nicht verändert war, trägt es zu einer Stressantwort im entzündeten Nervensystem bei. Hierfür spricht die Induktion der Ubiquitin-Aggregate in den verschiedenen Gehirn-Arealen beim Fehlen des Immunoproteasom-Komplexes. Die Expression der induzierbaren Untereinheiten war im Verlauf der EAE erhöht. Das Auffinden des Immunoproteasom-Komplexes in Microglia bzw. Gliazellen geben einen Hinweis auf einen entscheidenden Einfluss des induzierbaren Proteasoms im Verlauf einer autoimmunen Encephalomyelitis. Bemerkenswerterweise ließ sich das Immuno-

proteasom nicht in Neuronen nachweisen. Dieses Resultat weist auf eine Gliazellen-vermittelte Beteiligung des EAE-Verlaufes in LMP7-defizienten Mäusen hin.

3.2 Immunoproteasom in differenzierten neuronalen Vorläuferzellen

Die zuvor gezeigten Daten deuten darauf hin, dass im entzündeten ZNS Gliazellen, jedoch nicht Neurone, Immunoproteasom-Untereinheiten exprimieren. Eine *in vitro*-Analyse der Induzierbarkeit des Immunoproteasoms in neuronalen Zellen konnte klären, ob es sich hierbei um eine grundsätzliche Zell-spezifische Eigenschaft der Neuronen handelte. Hierzu wurden Neurosphären-Kulturen benutzt, neurale Stammzellen, die aus dem Gehirn 17-Tage alter, muriner Embryonen (E17) genommen werden und als multipotente Zellen nach Entzug der Wachstumsfaktoren (EGF/bFGF) zu den drei Zelltypen des Gehirns (Neuron, Astrozyt und Oligodendrozyt) differenzieren. Im Rahmen dieses synthetisch-hervorgerufenen Differenzierungsprozesses finden Differenzierungen statt, die dem Mikromilieu des ZNS ähneln, und in dieser Arbeit für mindestens sieben, meist jedoch nicht länger als 10 bis 14 Tage andauerte. Neuronen selbst benötigen mindestens 12-21 Tage zur vollständigen synaptischer Ausreifung [98]. Aus diesem Grund sind die differenzierten neuronalen Vorläuferzellen (diff. NVZ) als ein Konglomerat von Astrozyten, Oligodendrozyten und unreife Neuronen zu betrachten.

Zur kontrollierten Induktion des Immunoproteasoms wurde das pleiotrope pro-inflammatorische Zytokin $\text{IFN}\gamma$ verwendet, das auch in nicht-hämatopoetischen Zellen die *de novo*-Synthese des induzierbaren Proteasoms hervorruft [99]. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ konnte sowohl LMP7 als auch LMP2 auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden, während diese unter Kontroll-Bedingungen nicht synthetisiert wurden (Abb. 13A). Auf Protein-Ebene konnte nach 18-stündiger $\text{IFN}\gamma$ -Inkubation ein schwaches Signal für LMP7 identifiziert werden (Abb. 13B). Der Nachweis von NeuN und GFAP in den verwendeten Proteinextrakten zeigte, dass in den Kulturen sowohl Neuronen als auch Astrozyten vorhanden waren (Abb. 13B). Beide neurale Zelltypen waren unter den verschiedenen Bedingungen in einem konstanten Verhältnis anzutreffen, das auch von der $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung nicht beeinflusst wurde.

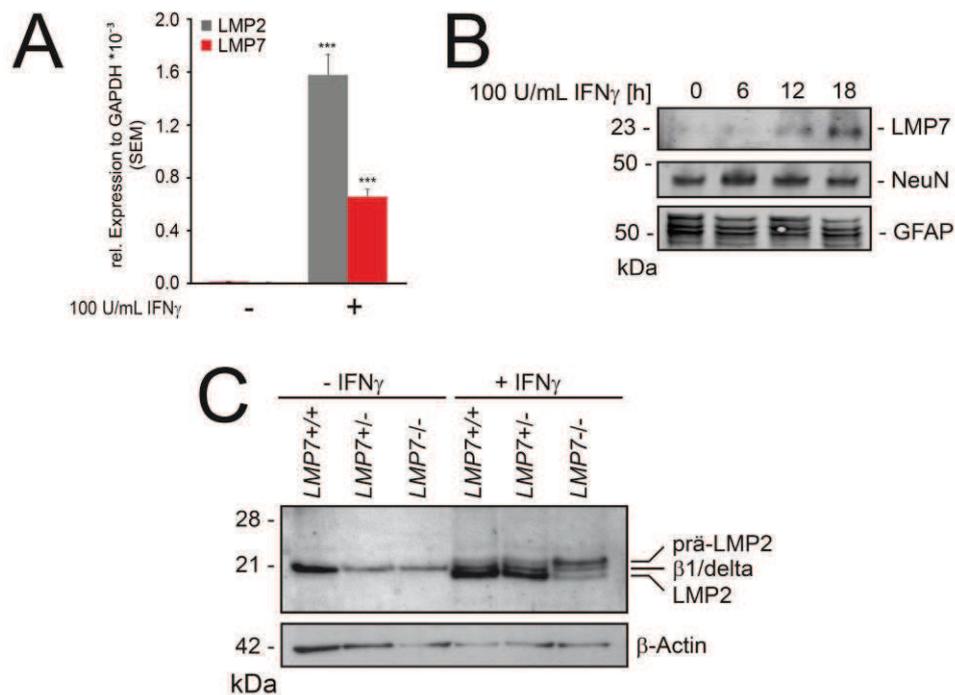


Abb. 13 Immunoproteasom-Analyse auf RNA- und Protein-Ebene in differenzierten NVZ. (A) LMP2 (grau) und LMP7 (rot) Detektion anhand real-time PCR Analyse. Die NVZs wurden für 10 Tage differenziert und in den letzten 24h erfolgte eine IFN γ -Behandlung. **(B)** Western Blot Analyse der iP Untereinheit LMP7 (Antikörper: K 63) inklusive neuraler Marker, NeuN und GFAP, nach zeit-abhängiger IFN γ Stimulation. **(C)** LMP7 ^{+/+}, LMP7 ^{+/-} und LMP7 ^{-/-} diff. NVZs wurden nach 6-tägiger Differenzierung für 24h mit IFN γ behandelt. Der LMP2-Nachweis wurde mit dem Santa Cruz Antikörper (SC-28809) durchgeführt. Der unspezifische LMP2-Antikörper detektiert ebenso die konstitutive β 1-UE und das Prä-Protein LMP2. Fehlt LMP7 akkumuliert Prä-LMP2 und das reife LMP2 wird kaum eingebaut. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Das LMP2-Protein konnte nach erfolgter Stimulation ebenso aufgefunden werden. Jedoch schränkte das kaum induzierbare LMP7 die vollständige Prozessierung des LMP2-Proteins ein. Dies war insbesondere in den LMP7-defizienten Kulturen nachweisbar, in denen eine Akkumulation des LMP2-Präproteins beobachtet werden konnte (Abb. 13C). Es konnte somit *in vitro* gezeigt werden, dass in einer gemischten-neuronalen Zellkultur und somit im ZNS die *de novo*-Synthese des Immunoproteasoms durch die Verfügbarkeit von LMP7 limitiert ist [16].

Anhand immunhistochemischer Färbungen wurde anschließend untersucht, ob in neuronalen Zellen der gemischten diff. NVZ-Kulturen das Immunoproteasom exprimiert wird. Ein Nachweis von LMP7 und die gleichzeitige Expression des neuronalen Markers β -III-Tubulin (Tuj1) konnte sowohl im unbehandelten Zustand als auch während der IFN γ -Stimulation nicht erbracht werden (Abb. 14).

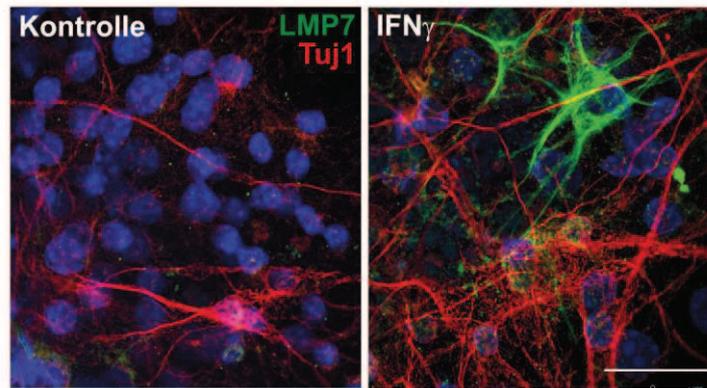


Abb. 14 LMP7-Detektion in differenzierten NVZ. 10 Tage diff. NVZ wurde unbehandelt (Kontrolle) und unter $\text{IFN}\gamma$ -Einfluss auf den neuronalen Marker β -III-Tubulin (Tuj1, rot) und die iP-Untereinheit LMP7 (grün; Antikörper: K63) gefärbt. Maßstab: 25 μm

Zusammengefasst kann das Immunoproteasom durch das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ generell in neuronalen Zellen (differenzierte Stammzellen) induziert werden. Als Ausnahme stellen sich Nervenzellen heraus, primär-unreife Neurone sind somit nicht in der Lage, nach diesem gängigen Stimulus die Immunoproteasom-Untereinheit LMP7 zu exprimieren.

3.3 Immunoproteasom-Expression der murinen hippocampalen Zelllinie HT-22

Um die bisherigen Resultate zu bestätigen, dass in Neuronen das Immunoproteasom unter entzündlichen Bedingungen nicht exprimiert wird, wurden weiterführende Experimente an der murinen, hippocampalen Zelllinie HT-22 durchgeführt. Ein Grund hierfür war eine entscheidende Einschränkung der bislang verwendeten primären Kulturen in deren geringen Anzahl von Neuronen. Dabei wurde eine ähnliche experimentelle Vorgehensweise gewählt wie bei der Untersuchung der diff. NVZ. Nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation wurde die Expression der induzierbaren Untereinheiten auf RNA- oder Protein-Ebene analysiert. Wie in Abb. 15 gezeigt, wurde LMP2 sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene induziert.

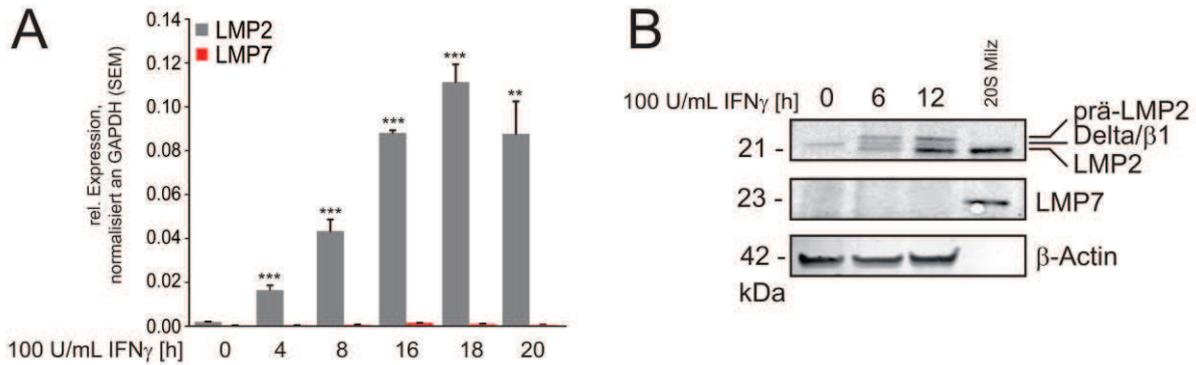


Abb. 15 Expression der Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 und LMP7 in der neuronalen hippocampalen Zelllinie HT-22. (A) RNA-Expression von LMP2 (grau) und LMP7 (rot) unter zeitabhängiger $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation im Verhältnis zur GAPDH-Expression. **(B)** LMP2 (Santa Cruz, SC-28809) und LMP7 (Antikörper: K63) Detektion auf Protein-Ebene nach 6- und 12-stündiger $\text{IFN}\gamma$ -Gabe. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. 20S isoliert aus der Milz wurde als Positivkontrolle verwendet.

Interessanterweise war nach $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung auch eine Induktion des Prä-Proteins LMP2 nachweisbar (Abb. 15B), das auf eine (zum Beispiel durch LMP7-Defizienz verursachte) unvollständige Immunoproteasom-Assemblierung hinwies. Tatsächlich konnte in der neuronalen Zelllinie HT-22 die Existenz der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 nicht gezeigt werden (Abb. 15A+B).

Der Nachweis des nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation neu synthetisierten LMP2-Proteins belegte jedoch, dass entsprechende $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren wie auch der für die $\text{IFN}\gamma$ -Signaltransduktion zuständige Jak-STAT Signalweg in den verwendeten HT-22 Zellen aktiv sind. Daher stellte sich die Frage nach den spezifischen Ursachen der nicht-Induzierbarkeit von LMP7 in Neuronen. Als mögliche Erklärung könnten epigenetischen Regulationsprozesse in Frage kommen. Derartige Adaptionen beinhalten transkriptionelle DNA-Methylierungs-Veränderungen [77], Histon-Modifikationen [100] und nicht-kodierende RNA-vermittelte Regulierung [101]. Zunächst wurde deshalb untersucht, ob DNA-Methylierungsprozesse am LMP7-Promotor für die fehlende LMP7-Induktion in neuronalen Zellen verantwortlich sein könnte. Hierzu wurden HT-22 Zellen mit 5-Azacytidin (5-Aza), einem Cytosin-Analogon und DNA-Methyltransferasen-Inhibitor [102], für drei Tage inkubiert.

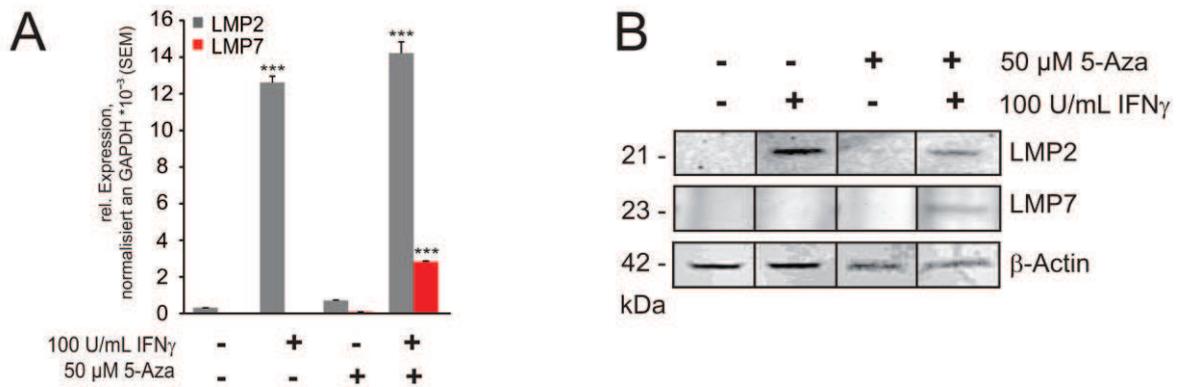


Abb. 16 Immunoproteasom-Analyse unter demethylierten und inflammatorischen Bedingungen in HT-22. (A) Expressionsanalyse an LMP2 (grau) und LMP7 (rot) in unbehandelten, IFN γ -stimulierten, 5-Aza und 5-Aza+IFN γ behandelten HT-22 Zellen. (B) Nachweis von LMP2- und LMP7-Protein unter normalen, inflammatorischen (IFN γ) und demethylierten (5-Aza) und in der Kombination an inflammatorischen und demethylierenden (5-Aza+IFN γ) Bedingungen. Als Ladekontrolle wurde β -Actin detektiert.

Wurden die HT-22 Zellen mit 5-Aza allein inkubiert, konnte allerdings keine LMP7-Expression induziert werden. Bemerkenswerterweise gelang dies aber in Kombination mit IFN γ : wurde die hippocampale Zelllinie mit 50 μ M 5-Aza für 72h vorinkubiert und erhielt während der letzten 24h der Inkubationszeit eine IFN γ -Stimulation, ließ sich tatsächlich das Transkript und das Protein LMP7 nachweisen (Abb. 16A+B). Die Hemmung der DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a und DNMT3b) wurde unter der 5-Aza-Gabe beobachtet.

Diese Beobachtung zeigte, dass die DNA-Methylierung in der Induzierbarkeit von der LMP7-Untereinheit in HT-22 Zellen eine entscheidende Rolle neben dem Zytokin IFN γ spielt. Eine DNA-Methylierung im LMP7-Promotor könnte in Neuronen die LMP7-Transkription beeinflussen. Zur Bestätigung dieser Schlussfolgerung wurde die Existenz von Methyl-CpGs in den Promotoren der induzierbaren Untereinheiten systematisch untersucht. Nach Generierung spezifischer Primer, die sowohl unmethylierte als auch methylierte DNA an der IRF1-Bindungsstelle erkennen, erfolgte die Ermittlung des DNA-Methylierungs-Zustandes mit Hilfe der Methylierungs-spezifischen PCR (MSP) (siehe Kapitel 2.2.4.5, Abb. 17B). IRF1 wurde ausgewählt, da dieser Jak-STAT-Transkriptionsfaktor die IFN γ -abhängige Induzierbarkeit von LMP7 vermittelt [24].

Als Positiv-Kontrolle wurde die microglären BV-2 Zellen verwendet, da diese Zellen bereits konstitutiv LMP7 auf einem geringen Niveau exprimieren und auf IFN γ mit einer erhöhten Expression von Immunoproteasom reagieren (Abb. 17A, [97]).

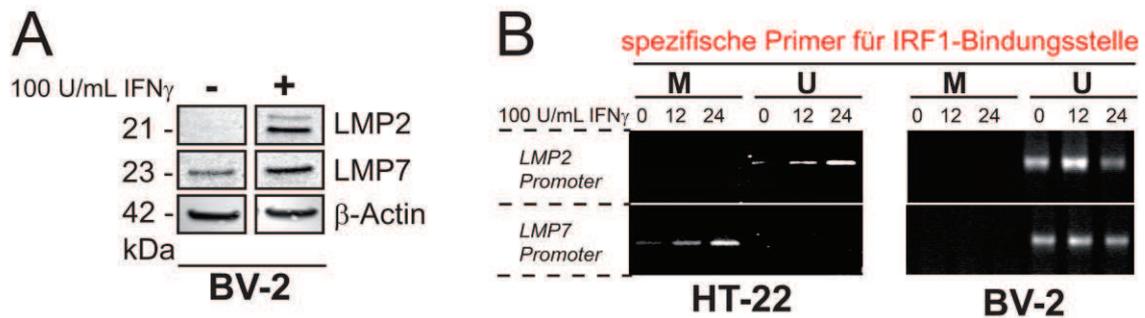


Abb. 17 Immunoproteasom-Expression in BV-2 Microgliazellen sowie Methylierungs-spezifische PCR in IFN γ -stimulierten HT-22 und BV-2 Zellen. (A) Western Blot für BV-2 Microglia-Zelllinie, unbehandelt und nach 24-stündiger IFN γ -Stimulation. Die Proteine LMP2 (Antikörper: Abcam), LMP7 (Antikörper: K63) und β -Actin sind dargestellt. **(B)** Die spezifischen MSP-Primer für die IRF1-Bindungsstelle wurden für die Analyse des Methylierungszustandes der iP-Promotor in unbehandelten und IFN γ -stimulierten HT-22 und BV-2 Zellen verwendet. U: unmethylierte DNA; M: methylierte DNA

In beiden Zelllinien lag der LMP2-Promotor an der IRF1-Bindungsstelle unmethyliert vor. Im Gegensatz zu den BV-2 Microgliazellen konnte eine Methylierung am LMP7-Promotor der HT-22 beobachtet werden (Abb. 17B). Dieses DNA-Methylierungsmuster beider LMP-Promotoren wurde unter dem Einfluss von IFN γ in beiden Zelllinien nicht verändert.

Eine MSP erlaubt eine quantitative Aussage der DNA-Methylierung, aber der damit verbundene Mechanismus kann nicht erklärt werden. Zum einen kann ein Methyl-CpG selbst eine blockierte Transkription verursachen, zum anderen kann erst durch das Anbinden von MBD-Proteinen die Genexpression an der Methyl-CpG Stelle stillgelegt werden [103]. Um ein präziseres Bild zur Protein-DNA-Interaktion an den immunoproteasomalen Promotoren zu erhalten, erfolgte eine Chromatin-Immunpräzipitation. Da das Hauptaugenmerk auf der IRF1-Bindungsstelle lag, wurden spezielle Primer für den LMP2- und LMP7-Promotor generiert (siehe Kapitel 2.2.5.3). Nach einer 8-stündigen IFN γ -Inkubation wurde das Chromatin mit dem Antikörper gegen MBD1 der neuronalen HT-22 und der microglären BV-2 Zellen präzipitiert und verglichen, ob der Mangel an nicht-bindenden IRF1 aus der Assoziation an MBD1 mit den Methyl-CpGs resultiert.

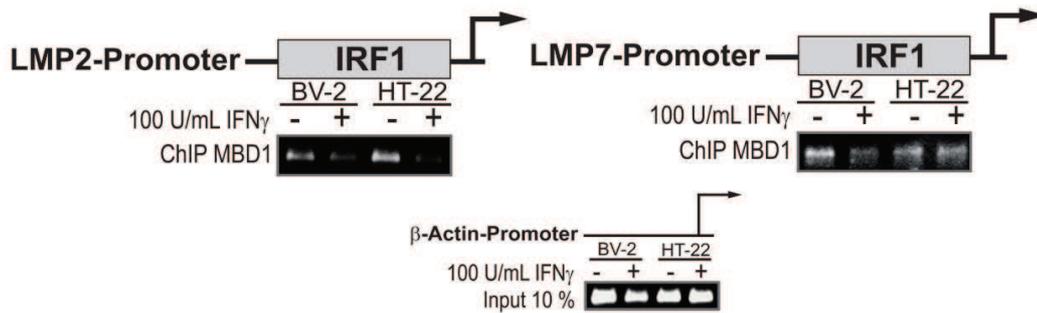


Abb. 18 Immunpräzipitation für MBD1 an der IRF1-Bindungsstelle des LMP2- und LMP7-Promotors. Sowohl BV-2 als auch HT-22 sind unstimuliert oder nach 8-stündiger IFN γ -Stimulation mit dem Antikörper gegen MBD1 immunpräzipitiert worden. Nach DNA-Isolation erfolgte eine real-time PCR mit den speziellen Primer für die IRF1-Bindungsstelle an den iP-Promotoren. Der Input wurde über den β -Actin Promotor analysiert.

Im unstimulierten Zustand konnte MBD1 an beiden untersuchten Promotoren in allen Zelltypen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem LMP2- und LMP7-Promotor in Microgliazellen zeigte sich, dass der neuronale LMP7-Promotor auch unter Zytokin-Stimulation von MBD1 besetzt ist (Abb. 18). Der Nachweis des konstitutiv am LMP7-Promotor gebundenen MBD1 korreliert mit der fehlenden Induzierbarkeit des LMP7-Gens in der hippocampalen neuronalen Zelllinie HT-22 sowie der nicht gefundenen Expression von LMP7 in Neuronen der EAE-Mäuse.

Zusammenfassend wird die Expression der neuronalen Immunoproteasom-Untereinheit LMP7 durch die Blockade der IRF1-Bindungsstelle in der murinen hippocampalen Zelllinie limitiert. Die Bindungsstelle wird von dem MBD-Protein MBD1 besetzt und hemmt eine IFN γ -vermittelte, funktionelle Immunoproteasom-Expression. Folglich regulieren epigenetische Faktoren die neuronale Immunoproteasom-Synthese *in vitro*.

3.4 Immunoproteasom in primären Neuronen

3.4.1 Immunoproteasom-Analyse in neuronalen P1-Kulturen

Die fehlende Induktion von LMP7 in Neuronen, sowohl in den differenzierten neuronalen Vorläuferzellen (Kapitel 3.2) als auch in der hippocampalen Zelllinie HT-22 (Kapitel 3.3), weist auf eine eindeutige Hemmung der Immunoproteasom-Expression in Neuronen unter physiologischen wie auch unter inflammatorischen Bedingungen hin. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob durch Blockade der neuronalen Aktivität das Immunoproteasom in Nervenzellen induzierbar ist. Als Vorbild dienten hier die Arbeiten von Neumann et al., in denen erst durch kombinierter Inkubation mit IFN γ und

Tetrodotoxin, einem gängigen Inhibitor der spannungsabhängigen Natriumkanäle, in Neuronen eine MHC I-Expression induziert werden konnte [42], [104]. Die Ergebnisse von Fehling und Kollegen zeigten, dass aus dem Fehlen der LMP7-Untereinheit eine verminderten Oberflächenexpression von MHC I-Molekül in Lymphozyten resultierte [105]. Im Analogieschluss ergab sich eine Untersuchung der LMP7-Induzierbarkeit unter den von Neumann et. al. verwendeten experimentellen Bedingungen.

Hierzu wurden Experimente mit primären Neuronen, isoliert am postnatalen Tag 1 (P1) aus dem murinem Hippocampus und Cortex, durchgeführt. Die P1-Kulturen werden durch reife Neuronen charakterisiert, welche nach circa 12-tägiger Inkubation in der primären Kultur aufzufinden sind. Reife Neuronen bilden Synapsen und besitzen somit die Fähigkeit der Impuls-Weiterleitung. Diese neuronale elektrische Aktivität kann mit Hilfe der Multi-Elektroden-Array (MEA) Chips gemessen werden. Die Darstellung dieser Messung der neuronalen Aktivität definiert sich in Spikes und Burst, wobei ein ‚Spike‘ eine Amplitude verkörpert und mindestens drei Spikes in einem definierten Zeitrahmen ‚Burst‘ genannt werden.

Unter der Voraussetzungen der synaptischen Reife und der Fähigkeit der elektrischen Impulsweiterleitung wurden die P1-Kulturen sowohl dem spannungsgesteuerten Natriumkanal-Blocker TTX als auch dem pro-inflammatorischen Zytokin $\text{IFN}\gamma$ ausgesetzt. Die Ionenkanäle sind für die Erzeugung der Aktionspotentiale zuständig und besitzen somit eine essentielle und kritische Funktion im ZNS [106]. TTX inhibiert die neuronale Aktivität binnen Sekunden (ersichtlich in den MEA-Chip-Ableitungen). Eine Langzeit-Inkubation mit TTX (3 Tage) geht mit einer erhöhten MHC I-Expression einher [42]. Aus diesem Grund wurde die drei-tägige 1 μM TTX-Inkubation als Basis verwendet. Die $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung folgte immer in den letzten 24 Stunden der TTX-Inkubation.

Die Detektion der Immunoproteasom-Expression unter dem Einfluss des Zytokins $\text{IFN}\gamma$ war mit den vorgefundenen Ergebnissen der $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten hippocampalen Zelllinie HT-22 vergleichbar. Die Expression von LMP2 konnte unter dem Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ festgestellt werden, dagegen fehlte LMP7 erneut (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu konnte überraschenderweise erstmals in den primären Neuronen die LMP7-Untereinheit sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene, nach

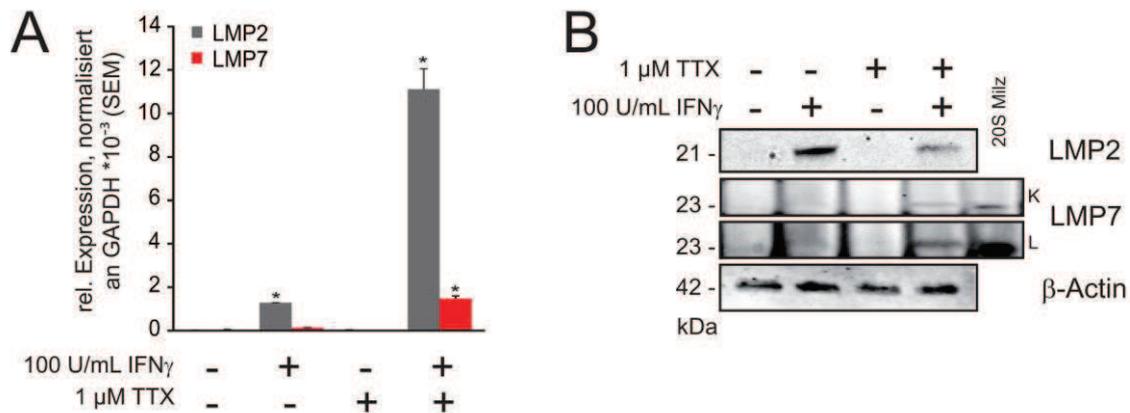


Abb. 19 Immunoproteasom-Detektion in primären Neuronen (P1-Kultur). (A) Relative Genexpressions-Analyse an LMP2 (grau) und LMP7 (rot) in unbehandelten, IFN γ -stimulierten, TTX-behandelten und sowohl TTX als auch IFN γ -stimulierten P1 Neuronen. (B) Proteinanalyse mittels Western Blot in P1-Neuronen. Folgende Antikörper wurden verwendet: LMP2 (Abcam), LMP7 (K63) und als Ladekontrolle β -Actin. Als Positivkontrolle wurde 50 ng pures 20S isoliert aus der Milz aufgetragen. Zur bessern Darstellung der LMP7-Bande, wurde der Blot unter normalen Umständen (K) und für eine länger Zeit (L) belichtet.

Inkubation mit TTX+IFN γ , nachgewiesen werden, (Abb. 19). Die Ko-Stimulation TTX+IFN γ ließ die Expression von LMP2 im Vergleich zu der IFN γ -behandelten Kontrolle um das 6-fache ansteigen. Die Detektion der LMP7 RNA war nur unter TTX+IFN γ messbar (Abb. 19A).

Das LMP7-Protein war außerdem schwach nachzuweisen. Isoliertes 20S aus der Maus-Milz, folglich ‚pures‘ Immunoproteasom, wurde bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine als Positiv-Kontrolle verwendet. Bei einer längeren Belichtungszeit konnte die LMP7-Bande bei TTX+IFN γ -Gabe stärker dargestellt werden (Abb. 19B-L).

Das Wachstum von Astrozyten wurde bewußt nicht unterdrückt, aus diesem Grund bestanden die P1-Kulturen nicht zu 100 % aus Neuronen. Die Gliazellen unterstützen Neuronen in ihrer elektrophysiologischen Aktivität und spiegeln *in vivo*-Verhältnisse wider. Da die induzierbare LMP7-Untereinheit in der primären neuralen Kultur detektiert wurde, stellte sich die Frage, welche neuronalen Zellen LMP7 synthetisieren. Demzufolge wurde eine immunzytologische Auswertung der LMP7-positiven Zellen durchgeführt. Das neuronale Zytoskelett-Protein Map2 (Mikrotubulin-assoziiertes Protein2) sowie das astrogläre Intermediärfilament GFAP dienten dabei der Identifizierung von Neuronen bzw. Astrozyten. Die Kolokalisation von LMP7 und GFAP konnte sowohl unter IFN γ - als auch TTX+IFN γ -Stimulation festgestellt werden, ersichtlich in Abb. 20.

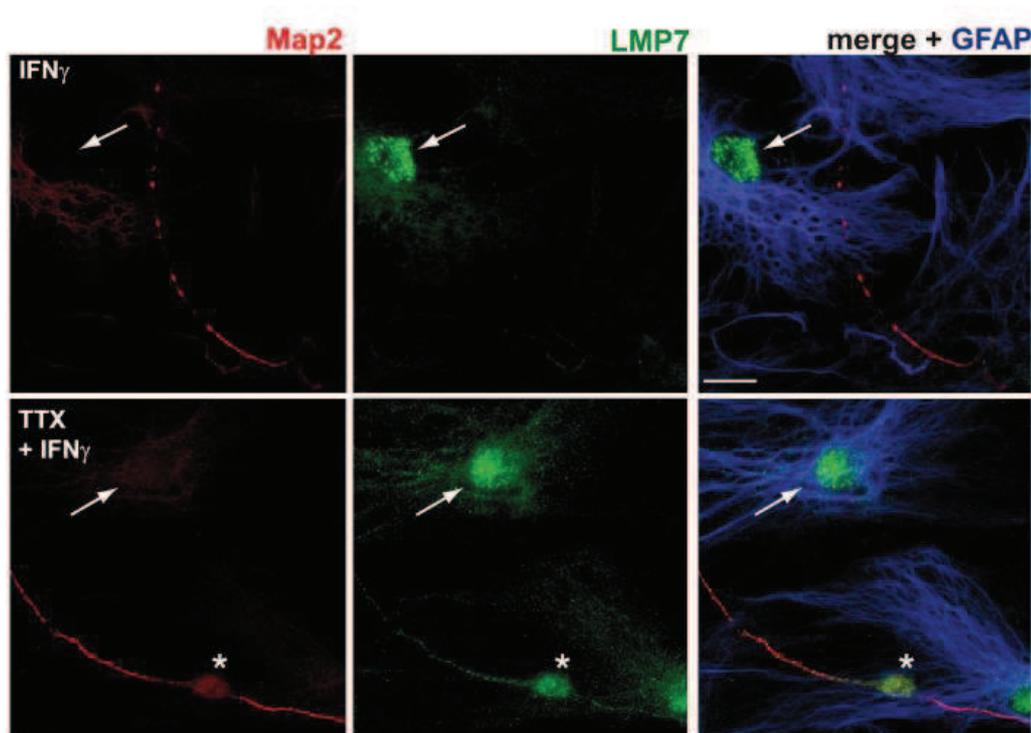


Abb. 20 Immunochemische Darstellung an LMP7, Map2 und GFAP in P1- Neuronen. Die Anwesenheit von Astrozyten wurde durch GFAP, die von Neuronen anhand Map2 ermittelt. Nur in der Kombination TTX + IFN γ wurden LMP7-positive Neuronen gefunden. Pfeile weisen auf LMP7-positive Astrozyten hin, ein Asteriks markiert ein LMP7-positives Neuron. Maßstab: 20 μ m

LMP7+/Map2+-Zellen konnten dagegen nur in der Anwesenheit des Natriumkanal-Blocker verknüpft mit der IFN γ -Stimulation beobachtet werden (Abb. 20). Die Existenz solcher Immunoproteasom-tragender Neurone war bereits bemerkenswert. Zu erwähnen ist eine verschwindend geringe Anzahl der LMP7-positiven Neuronen, die die Quantifizierung dieser Zellen unmöglich machte. Eine intrazelluläre Lokalisation von LMP7 war sowohl im Soma als auch in den Fortsätzen auffindbar, wobei eine spezifische punktförmige LMP7-Konzentration an den Dendriten auffiel.

3.4.2 Epigenetische Regulation des neuronalen LMP7-Promotors

In den HT-22 Zelllinien war die Methylierung der IRF1-Bindungsstelle ursächlich für dieses Phänomen verantwortlich. Deshalb stellte sich die Frage, ob durch die elektrophysiologische Aktivitätsblockade die induzierbare LMP7-Expression in Neuronen auch an epigenetischen Mechanismen gekoppelt ist.

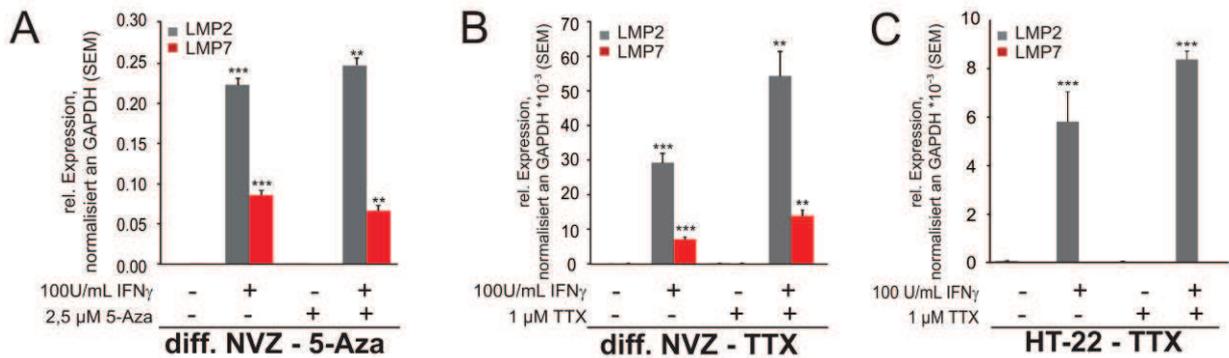


Abb. 21 Die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die induzierbare Proteasom-Expression in diff. NVZs und HT-22 Zellen. (A) RNA-Expression von LMP2 (grau) und LMP7 (rot) unter hypo-methylierenden und entzündlichen Bedingungen in diff. NVZ. **(B)** LMP2 (grau) und LMP7 (rot) RNA-Expression in diff. NVZs unter dem Einfluss von TTX und TTX+IFN γ . **(C)** Der Natriumkanal-Blocker TTX hat keinen Effekt auf die LMP7-Expression der hippocampalen HT-22 Zelllinie, auch nicht in Verbindung mit dem pleiotropen Zytokin IFN γ .

Das in der hippocampalen Zelllinie HT-22 verwendete Agens 5-Aza konnte allerdings aufgrund erhöhter toxischer Empfindlichkeit an den primären Neuronen nicht verwendet werden. Zwar gelang es, die diff. NVZ mit einer niedrigeren Konzentration an 5-Aza (2,5 μ M) ohne offenkundig dargestellte Apoptose zu behandeln, diese experimentell induzierte milde Hypo-Methylierung führte jedoch nicht zur Induktion des Immunoproteasoms (Abb. 21A).

Auch bei Hemmung der elektrischen Aktivität mittels des Natriumkanal-Blocker TTX, gefolgt von der IFN γ -Gabe, wie auch bei alleiniger IFN γ -Behandlung war in diesen unreifen Neuronen der diff. NVZs keine erhöhte Immunoproteasom-Expression nachweisbar (Abb. 21B). Ebenso reagierte die hippocampale HT-22 Zelllinie nicht auf eine Hochregulation der LMP7 Untereinheit aufgrund einer TTX+IFN γ -Behandlung (Abb. 21C).

Der Status der DNA-Methylierung an der IRF1-Bindungsstelle der zwei katalytisch-aktiven Immunoproteasom-Promotoren in den primären Neuronen wurde analysiert. Erneut wurden P1-Kulturen dem Aktivitätsblocker TTX ausgesetzt, gDNA isoliert und die Methode der MSP angewendet. Der LMP2-Promotor lag zu den experimentellen Bedingungen, un- und TTX-stimuliert, unmethyliert vor (Abb. 22). Im Gegensatz hierzu wies der LMP7-Promotor DNA-Methylierung auf, die nach dreitägiger TTX-Behandlung nicht mehr zu beobachten war. Das heißt unter dem Einfluss der einstweiligen Aktivitätshemmung wird der Status der DNA-Methylierung an der IRF1-Bindungsstelle des LMP7 Promotors in primären Neuronen modifiziert.

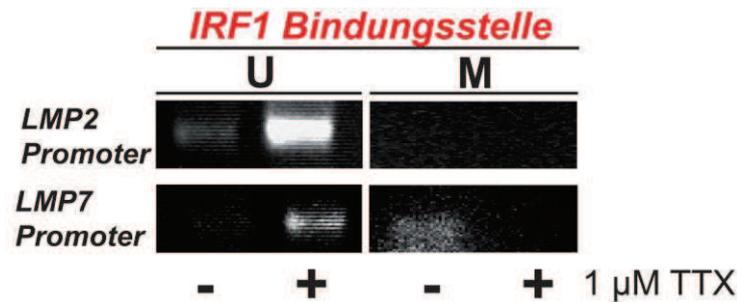


Abb. 22 Methylierungs-spezifische PCR in P1-Kultur unter dem Aspekt der Aktivitätsblockade. IRF1-spezifische MSP-Primer wurden für die Analyse des Methylierungszustandes der iP-Promotoren in TTX behandelten primären Neuronen verwendet. Zum Vergleich werden unbehandelte Neuronen gezeigt. U: unmethylierte DNA; M: methylierte DNA

Aufgrund der vorgefunden De-Methylierung des LMP7-Promotors in den primären Neuronen, stellte sich die Frage, welche Proteine bzw. Enzyme, die das Geschehen der Methylierung beeinflussen können, hier beteiligt sind. Die Untersuchung der DNMT-Enzyme und Methyl-CpG-bindenden Proteine ergab, dass die Expression der DNMTs von der gestörten Impulsweiterleitung nicht beeinflusst wurden. Alle MBDs hingegen wurden bei Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle durchweg im erhöhten Maße vorgefunden (Abb. 23). Eine transkriptionelle Hochregulation der Methyl-CpG bindenden Proteine weist auf eine epigenetische Modifikation nach TTX-Gabe hin, die nicht von den DNA-Methyltransferasen abhängig ist.

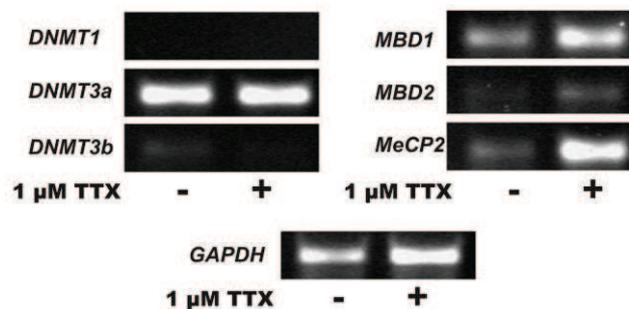


Abb. 23 DNMTs und MBD-Proteine in primären Neuronen mit inhibierter elektrischer Aktivität. Unter dem Einfluss der Impuls-Inhibition (3 Tage 1 µM TTX) wurden in P1-Kulturen Methyl-CpG-bindenden Proteine hochreguliert, wobei DNMTs nicht davon betroffen waren. Als Ladekontrolle wird GAPDH gezeigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Immunoproteasom in primären Neuronen nur unter spezifischen pathologischen Bedingungen vorgefunden wird. Die Hemmung der elektrophysiologischen Aktivität mit einem pro-inflammatorischen Stimulus kann die *de novo*-Synthese des iP_s in Neuronen erzwingen. Bemerkenswerterweise hatte die experimentelle Störung der Impulsweiterleitung einen epigenetischen Effekt, der LMP7-Promotor liegt an der IRF1-Bindungsstelle de-methyliert vor.

3.4.3 MHC I-Expression unter dem Einfluss der Aktivitätsinhibierung

Das Immunoproteasom ist ebenso an der Antigen-Präsentation über den MHC I-Signalweg beteiligt wie das konstitutive Proteasom. LMP7-defiziente T-Lymphozyten präsentieren im Vergleich zu Wildtyp-Lymphozyten weniger MHC I an ihrer Oberfläche [105]. Mittlerweile ist es weitgehend akzeptiert, dass die MHC I-Expression unter anderem die synaptische Plastizität beeinflusst und in der ZNS-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (und *vice versa* [29], [30]). Wildtyp- bzw. LMP7-defiziente Neuronen wurden isoliert und nach 14-tägiger Wachstumsphase die Oberflächen-Expression von H2K^b anhand der Durchflusszytometrie in den experimentellen Bedingungen (Kontrolle, IFN γ -, TTX- und TTX+IFN γ -Stimulation) identifiziert (Abb. 24). In der Tat wurde eine geringere H2K^b-Expression in den LMP7-defizienten P1-Mischkulturen vorgefunden (Abb. 24A). Unter pro-inflammatorische Bedingungen konnte die H2K-Oberflächen Expression in beiden Genotypen unabhängig von der elektrischen Impulsweiterleitung erhöht vorgefunden werden. Die Inhibierung der elektrischen Aktivität selbst hatte keine Auswirkung auf die H2K-Oberflächen-Expression in den neuronalen Misch-Kulturen beider Genotypen. Es konnte kein

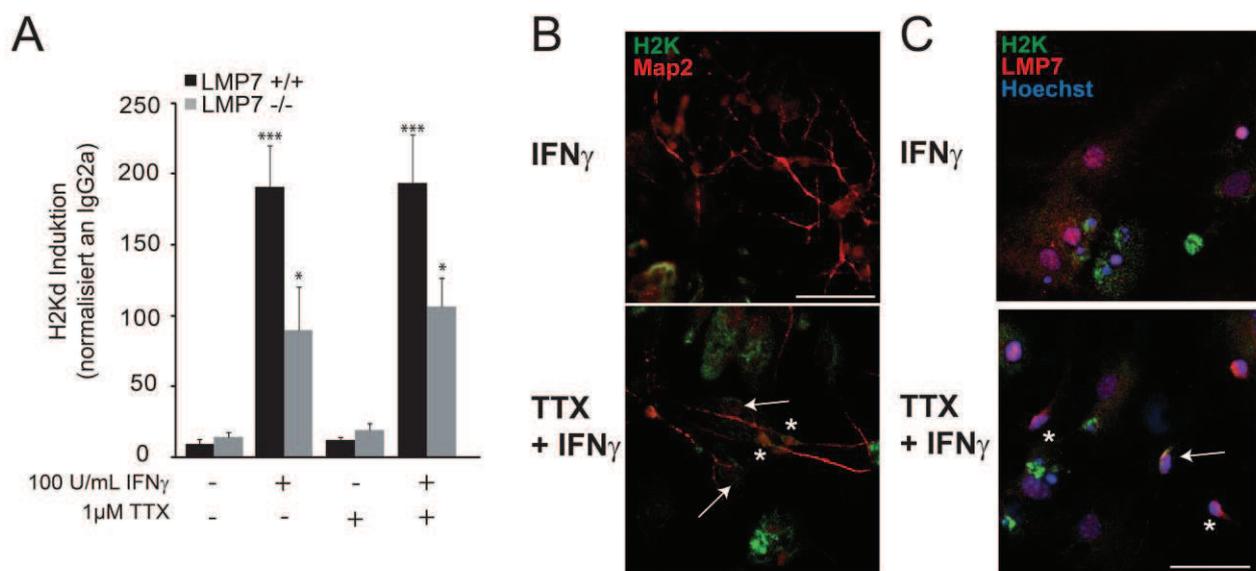


Abb. 24 Oberflächenexpression des H2K-Proteins auf primären Neuronen-Kulturen im pathologischen Umfeld. (A) H2K-Oberflächenexpression wurde mittels einem FACS-Gerät analysiert. Hierzu wurde der H2K-Wert an IgG2a normalisiert und die Induktion berechnet. Gezeigt wird der Einfluss von IFN γ , TTX und TTX+IFN γ auf die H2K-Expression in primären neuronalen Zellen verschiedener Genotypen. **(B)** Immunfluoreszenzfärbung für H2K (grün) und Map2 (rot) in P1-Kulturen, IFN γ - bzw. TTX+IFN γ -stimulierter Zustand. Nur in Kombination beider Substanzen konnte eine Kolokalisation in Neuronen gezeigt werden, mit Asterisk markiert. Pfeile weisen auf H2K-positive Astrozyten hin (GFAP-Färbung wird nicht gezeigt). **(C)** Immunfluoreszenzfärbung für H2K (grün) und LMP7 (rot) in IFN γ bzw. TTX+IFN γ behandelten neuronalen Zellen. Das gleichzeitige Auffinden an H2K und LMP7 in Neuronen (Pfeil) war nachweisbar, jedoch verschwindend gering. Neuronen, die nur LMP7 synthetisieren werden mit einem Asterisk dargestellt. Maßstab: 20 μ m

Unterschied zwischen den IFN γ - und TTX+IFN γ -stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Beide experimentellen Bedingungen ergaben gleichermaßen einen signifikanten Anstieg von dem Molekül H2K^b.

Somit stellte sich erneut die Frage, welche Zellen das MHC I-Protein H2K in den P1-Mischkulturen präsentieren. Neumann und Kollegen zeigten, dass das erhöhte Auffinden von MHC I nach TTX+IFN γ -Stimulation zu 100% in den Neuronen stattfand [42]. Die immunzytologische Färbungen GFAP für Astrozyten, Map2 für Neuronen wurden durchgeführt, die Kolokalisation mit H2K und den zwei verschiedenen neuronalen Marker wurde analysiert. Astrozyten synthetisierten sowohl unter alleiniger IFN γ - als auch kombinierter TTX+IFN γ -Verabreichung das Oberflächenprotein H2K (Abb. 24B). Ähnlich den Ergebnissen der LMP7-Lokalisation (Abb. 20) konnte nur eine geringe Menge an Neuronen (Map2-positiv), die H2K-Protein synthetisieren, unter dem Stimulus TTX+IFN γ nachgewiesen werden (Abb. 24B). Die Frage, ob eine gleichzeitige Expression von LMP7 und H2K in den Neuronen stattfindet, konnte mit der Hilfe von immunhistochemischen Färbungen geklärt werden. Eine Kolokalisation von der LMP7-Untereinheit mit H2K-Molekül in den primären Neuronen konnte nur unter den gleichen Bedingungen, TTX+IFN γ -Gabe, in geringer Menge beobachtet (Abb. 24C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass primäre neurale LMP7-defiziente Misch-Kulturen eine erniedrigte Oberflächen-Expression an MHC I-Molekül vorweisen. In isolierten, primären Neuronen wird die Expression von LMP7 und MHC I unterdrückt, die jedoch unter pathologischen Bedingungen (TTX+IFN γ) aufgehoben werden kann.

3.5 Immunoproteasom und elektrische Aktivität

Der Einfluss von MHC I auf die ZNS-Entwicklung und die synaptische Plastizität (zusammengefasst in [29], [30]), sowie die reduzierte Oberflächen-Expression von MHC I in LMP7-defizienten Neuronen (Abb. 24A), legen nahe, dass das Immunoproteasom einen Einfluss auf die elektrophysiologische Erregungsweiterleitung haben könnte. Daher erfolgte eine weitere Überprüfung des möglichen funktionellen Zusammenhanges. Hierzu wurden P1-Neuronen aus LMP7 +/+ und LMP7 -/- Mäusen isoliert und auf MEA Chips kultiviert (siehe Kapitel 2.2.2).

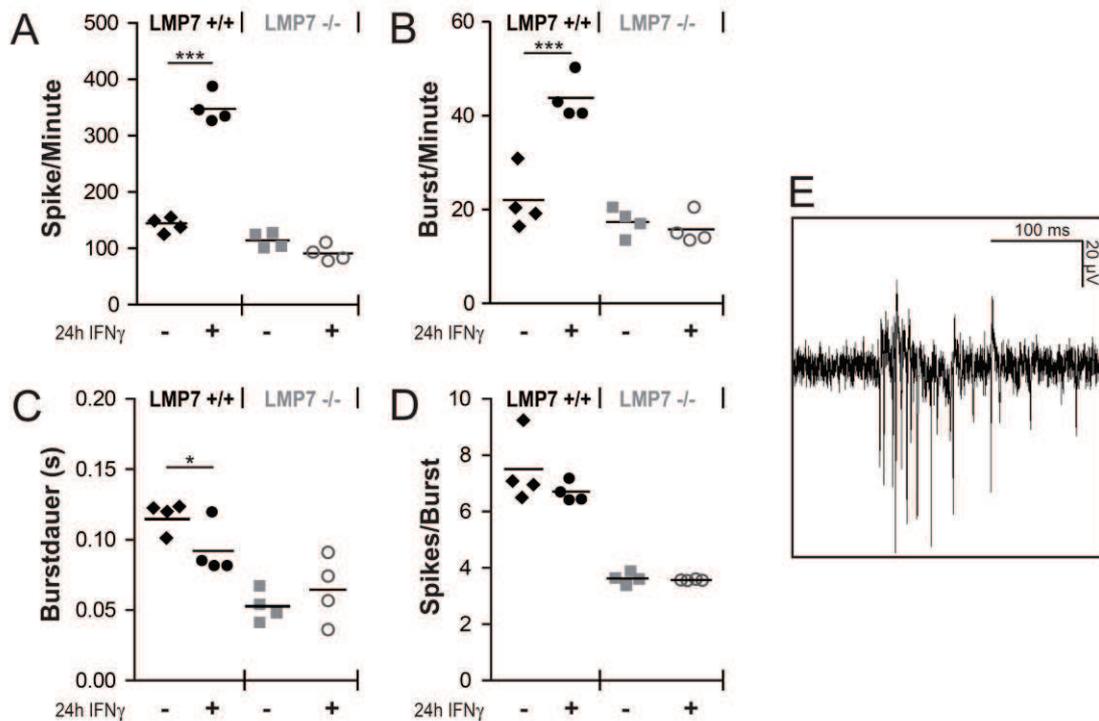


Abb. 25 Mittleres Aktivitäts-Level der LMP7^{+/+} und LMP7^{-/-} P1-Neuronen unter dem Einfluss von IFN γ . Die Messung der Aktivität von unbehandelten und IFN γ -stimulierten, primären Neuronen erfolgte am MEA-Chip System. Die Analyse wurde durch das Spanner-Programm ermittelt. **(A)** Anzahl der Spikes pro Minute, **(B)** Anzahl der Burst pro Minute, **(C)** die Burstzeit (s) und **(D)** die Anzahl der Spikes während eines Burst sind hier dargestellt. LMP7^{+/+} Neuronen sind in schwarzen, LMP7^{-/-} Neuronen in grauen Symbolen abgebildet. **(E)** Repräsentatives Bild für die elektrische Aktivität der P1-Neuronen gemessen am MEA-Detektionsgerät.

Zunächst wurde das Augenmerk auf pro-inflammatorische Prozesse gelegt. Das neuronale Netzwerk, welches Aktivität vorwies, wurde für 24h mit IFN γ behandelt, eine Messung der elektrischen Aktivität folgte. Die daraus resultierende Spanner-Analyse der gemessenen Aktivität der Neuronen wird in Abb. 25A-D, ein repräsentatives Bild der elektrischen Aktivität wird in Abb. 25E gezeigt.

Im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Neuronen reagierten die IFN γ -stimulierten primären WT-Neuronen mit einem Anstieg der elektrischen Aktivität (gestiegene Spike- und Burst-Anzahl (Abb. 25A+B)). Die Dauer der Burst' und die Anzahl der Spikes pro Burst änderten sich prinzipiell nicht während der 24-stündigen IFN γ -Behandlung (Abb. 25C+D). Diese Ratio blieb auch in den LMP7^{-/-} Neuronen (Abb. 25C+D) unverändert. Die LMP7-defizienten Neuronen wiesen generell eine kürzere Burstzeit sowie eine verminderte Anzahl der Spikes in den Bursts auf im Vergleich zu den WT-Neuronen (Abb. 25C+D). Der zuvor in den WT-Neuronen gezeigte Anstieg der elektrischen Aktivität unter der IFN γ -Stimulation fehlte in den LMP7-defizienten Neuronen (Abb. 25A+B). Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Immunoproteasom-Komplexes an der elektrischen Reizweiterleitung.

Jedoch konnte im Kapitel 3.4.1 gezeigt werden, dass Neuronen selbst unter $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation kein Immunoproteasom-Komplex synthetisieren.

Um eine möglicherweise bislang unbekannte Störung der Synapsen-Struktur in den LMP7-defizienten Neuronen auszuschließen, wurden die Neuronen der verschiedenen Genotypen zum einen auf das prä-synaptische Protein Synapsin (I und II), zum anderen auf das post-synaptische Protein PSD-95 untersucht.

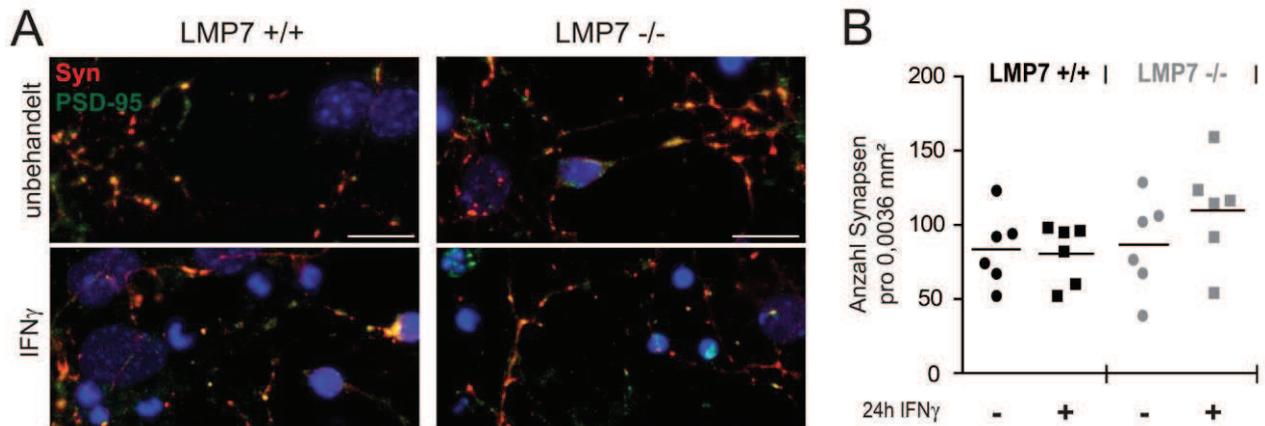


Abb. 26 Synaptische Proteine in LMP7+/+ und LMP7-/- Mischkulturen. (A) Das prä-synaptische Protein Synapsin (rot) und das postsynaptische Protein PSD-95 (grün) wurde in LMP7+/+ (links) und LMP7-/- (rechts) primären P1-Kulturen markiert. Keine Differenz wurde zwischen unbehandelten, $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten P1-Kulturen sowie zwischen den Genotypen gefunden. Maßstab: 20 μm (B) Auswertung der Punkt-förmigen Synapsin- und PSD-95-positiven Struktur in den P1-Mischkulturen der verschiedenen Genotypen, unstimuliert bzw. $\text{IFN}\gamma$ -behandelt. Nur eine Kolokalisation an Synapsin und PSD-95 wurde als Synapse gewertet. Die Auszählung erfolgte auf eine Fläche von 0,0036 mm^2 (n=3 pro Kultur).

Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede in den experimentellen Bedingungen (unbehandelt, $\text{IFN}\gamma$ stimuliert) und zwischen den beiden Genotypen (LMP7 +/+ vs. LMP7 -/-) (Abb. 26A+B). Sowohl das Fehlen von der LMP7-Untereinheit als auch nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation ließ sich kein Verlust oder eine gereizte Überexpression der synaptischen Proteine (Synapsin I und II, PSD-95) an den Synapsen der primären Neuronen nachweisen.

Die Beteiligung des Immunoproteasoms an der synaptischen Transmission ist überraschend, gleichwohl der Beitrag des konstitutiven Proteasom-Komplexes zur synaptischen Plastizität bereits dokumentiert wurde (siehe Kapitel 1.4.2). Unsere Arbeitsgruppe konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sergeeva, Institut für Neurophysiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, weiterführende Untersuchungen in Bezug auf komplexe, synaptische Transmissionsprozesse in LMP7-

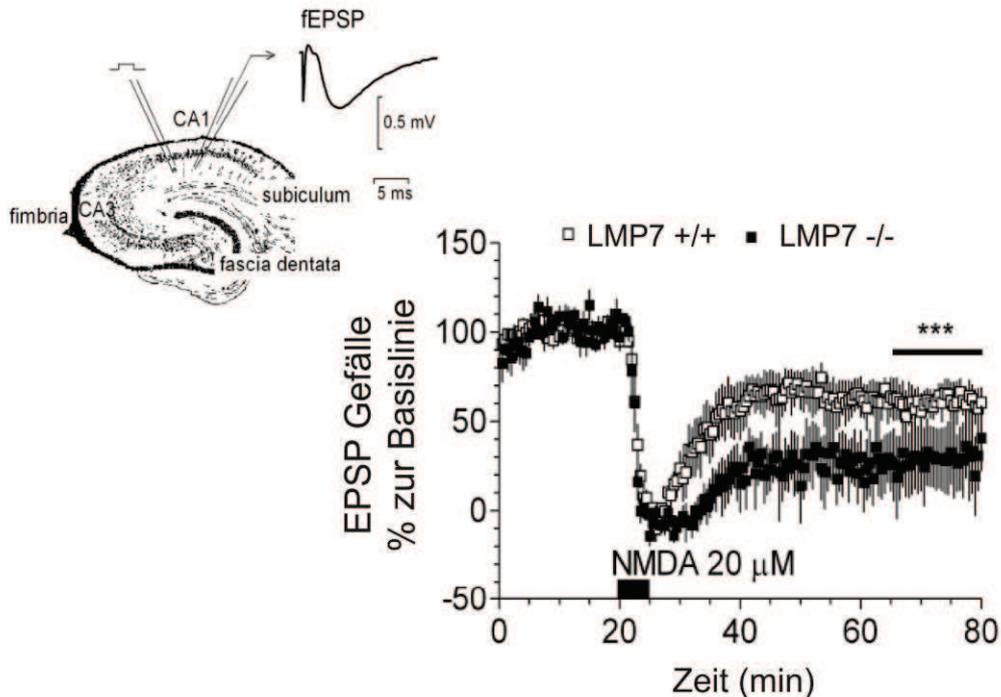


Abb. 27 Einfluss der Immunoproteasom-Untereinheit LMP7 auf Langzeitdepression (LTD). Feldpotential-Ableitungen im CA1 (Hippocampus) in LMP7 $-/-$ und Wildtyp-Mäusen. NMDA (5min) induzierte eine größere chemische LTD in LMP7-defizienten Mäusen als in WT, als Hinweis auf eine größere Suszeptibilität gegen oxidativem Stress. (n=3, ca. 6 Wochen alt und Geschwister)

defizienten Tieren durchführen. Hierfür wurde die chemisch induzierte Langzeit-Depression im Hippocampus von LMP7 $-/-$ und deren Wildtyp-Geschwistern untersucht. Die Messung erfolgte in der Schaeffer Kollateral CA1 Synapse des Hippocampus in akuten organotypischen Schnittkulturen. Eine graphische Darstellung der Elektrodenlage im Hippocampus wird in Abb. 27 gezeigt. Die chemische Stimulation mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) ergibt eine rasche Internalisierung des Glutamat-Rezeptors, worauf die Neurotransmission unterdrückt wird [107]. Die synaptische Unterdrückung hält über Stunden an und wird aus diesem Grund auch chemische LTD genannt. Es stellt ein gut-etabliertes Protokoll zur Ermittlung der synaptischen Plastizität in organotypischen Hippocampus-Kulturen oder auch in kultivierten hippocampalen Neuronen dar.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Kulturen zeigten Hirnschnitte mit einer LMP7-Defizienz eine signifikant-erhöhte chemische LTD (Abb. 27). Diese Beobachtung gibt einen ersten Hinweis auf die Beteiligung des neuralen Immunoproteasoms an der synaptischen Transmission. Bemerkenswerter Weise kann diese unterdrückte synaptische Reaktion nicht den Neuronen zugeschrieben werden, da die Immunoproteasom-Synthese nicht gezeigt werden konnte (Kapitel 3.1, 3.2, 3.3 und 3.4). Zu erwähnen ist, dass es zu

keinem Zeitpunkt einen ersichtlichen Effekt der basalen synaptischen Transmission bei der Input- bzw. Output-Generierung während der Aufnahme der Feld-exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (fEPSP) gab.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der MEA Chip-Analyse und der Langzeit-Depression den Schluss zu, dass das Immunoproteasom eine essentielle Rolle in der synaptischen Transmission spielt.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf dem induzierbaren Proteasom-Komplex, dem Immunoproteasom. Ziel war es, die Bedingungen zu untersuchen unter denen das neuronale Immunoproteasom im zentralen Nervensystem auffindbar ist. Zum einen wurde das Tiermodell der MS verwendet, welches einen inflammatorischen Prozess im Gehirn illustriert (Kapitel 3.1), zum anderen fanden *in vitro*-Untersuchungen in verschiedenen primären neuronalen Kulturen (differenzierte neurale Stammzellen, Kapitel 3.2, und primäre neuronale Kulturen, Kapitel 3.4) und einer hippocampalen neuronalen Zelllinie (HT-22, Kapitel 3.3) statt. Die immunoproteasomalen Analysen der primären Neurone gaben einen Hinweis auf die Beteiligung des Immunoproteasoms an der synaptischen Transmission, die in Kapitel 3.5 gezeigt wurde.

4.1 Immunoproteasom in EAE

Aufgrund der aktuellen Kenntnisse der EAE- (bzw. MS-) Pathogenese stellt sich folgendes Bild dar: Myelin-spezifische T-Lymphozyten werden in der Peripherie aktiviert und gelangen über einen mehrstufigen Migrations-Prozess in das ZNS. Dort werden sie von APZ reaktiviert, was zu Demyelinisierung, axonaler Schädigung und neuronalem Untergang führt. Mögliche Ansatzpunkte des proteasomalen Eingreifens im EAE-Krankheitsverlauf sind der MHC I-Signalweg sowie die *de novo*-Synthese der neuronalen Komponenten.

EAE als Tiermodell der MS kann als ein geeignetes Modell zur Analyse des UPS-Einflusses, insbesondere des Immunoproteasoms, in Bezug auf inflammatorische Erkrankungen des ZNS betrachtet werden. Das hier verwendete aktive EAE-Modell führt unter anderem zu einer CD8⁺ T-Lymphozyten-Aktivierung, wodurch die Beteiligung des UPS gewährleistet ist. Bei einem fehlenden iP-Komplex sollte die MHC I-Expression vermindert sein, die CD8⁺ T-Zellen Aktivierung ist nicht gegeben und die ZNS-Erkrankung sollte in einer geschwächten Form auftreten.

Eine der Hauptfunktionen des Immunoproteasoms ist die Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase bei inflammatorischen Vorgängen [11]. Zytokine wie IFN γ , sezerniert von T-, B-Lymphozyten und APCs, induzieren oxidativen Stress, wobei neu-synthetisierte Proteine besonders empfänglich gegenüber ROS-Verbindungen sind und somit

aufgrund ihrer gestörten Proteinfaltung vom UPS als Substrat erkannt werden [11], [17], [108]. Die aktivierten Immunzellen bzw. Microgliazellen setzen unter inflammatorischen Bedingungen Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ und Prostaglandine frei, was unter anderem zur Induktion des Immunoproteasoms in Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprunges führen kann [17].

Sowohl das Fehlen der induzierbaren LMP2-Untereinheit als auch der LMP7-Untereinheit resultierte nach Immunisierung mit dem MOG-Peptid in einem dramatisch entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungsbild der Encephalomyelitis (Abb. 7A und Abb. 8A). Dabei ist zu betonen, dass der Mangel an LMP7 von Beginn an, der LMP2-Mangel erst in einem späteren Stadium eine Auswirkung auf die experimentelle Encephalomyelitis hatte. Die ursprünglich aufgestellte Hypothese, dass das nicht-funktionelle Immunoproteasom unter dem Einfluss der autoimmunen Encephalomyelitis zu einem schwächeren Erkrankungsbild führt, konnte nicht bestätigt werden.

Die Daten der Veröffentlichung von Frausto und Kollegen konnten indessen in dieser Arbeit reproduziert werden. Kein signifikanter Unterschied zwischen den LMP2-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen war zu Beginn der Erkrankung nachweisbar (Abb. 7A und [109]). Allerdings lag das Augenmerk dieser Arbeitsgruppe auf der T-Lymphozyten-Aktivierung im ZNS, weshalb das EAE-Experiment am Tag 18 nach erfolgter Immunisierung beendet wurde. Die in dieser Arbeit gezeigte LMP2-EAE wurde über den Zeitraum von 50 Tagen untersucht. Eine signifikante Differenz zwischen den LMP2-defizienten und WT-Mäusen konnte jedoch erst ab Tag 35 nach erfolgter Immunisierung gezeigt werden. Der Einbau der LMP7-Untereinheit in die gemischte Population des Proteasom-Komplexes verhindert das frühzeitige Erkranken an einem autoimmunen neurodegenerativen Krankheitsbild. Das grundsätzliche Fehlen des voll-funktionellen Immunoproteasom-Komplexes führt letztendlich zu einem verstärkten Erkrankungsbild. Erstaunlicherweise konnte das Auftreten der verstärkten Encephalomyelitis nicht mit einer erhöhten T-Lymphozyten-Aktivierung in Verbindung gebracht werden (Abb. 7B).

Im Gegensatz zu der fehlenden LMP2-Untereinheit führte ein LMP7-Mangel von Anfang an zu einem verstärkten Erkrankungsbild der EAE (Abb. 8A). Auch hier konnte im Kontext keine auffällige Aktivierung der T-Lymphozyten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erbracht werden (Abb. 8B). Erst die Analysen der verschiedenen Hirnareale

zeigten eine Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten in den LMP7^{-/-} Tieren (Abb. 10). Aufgrund der fehlenden LMP7-Untereinheit liegt ein gestörter Abbau der DRiPs vor, der erneut zu einer Aktivierung der Microgliazellen führen kann und somit die Apoptose der Ubiquitin-angehäuften Zellen hervorruft. Die wiederkehrende Rekrutierung der Microgliazellen bzw. CTLs sowie die DRiPs-vermittelte Apoptose führen zu einem erneuten pro-inflammatorischen Prozess und verstärken die neurodegenerative Erkrankung im EAE-Gehirn. Diese Aussage wurde von unserer Arbeitsgruppe manifestiert und veröffentlicht [11].

Die Fragestellung welche Zelltypen des Gehirns das induzierbare Proteasom synthetisieren und somit für die Anhäufung von Ubiquitin-Konjugaten in den LMP7-defizienten Gehirn zuständig sein könnten, konnte geklärt werden (Abb. 11 und Abb. 12). Die Assemblierung des Immunoproteasoms war vor allem in Microgliazellen vereinzelt auch in Astrozyten nachweisbar. Der Einfluss der aktivierten Gliazellen könnte einen wichtigen Beitrag im Verlauf der EAE leisten. Im Unterschied zu den Gliazellen konnte das inkorporierte Immunoproteasom in Neuronen nicht nachgewiesen werden, obwohl ein erhöhtes Auffinden der induzierbaren Untereinheiten im Hippocampus der EAE-erkrankten Tieren für eine neuronale iP-Synthese sprach (Abb. 9). Bereits jetzt geben diese Daten den Hinweis, dass eine fehlende Immunoproteasom-Synthese der Microgliazellen für den Anstieg der vorgefundenen stärkeren entzündlichen Reaktion im ZNS verantwortlich ist. Der explizite Grund des drastischen Krankheitsverlaufes konnte bisher noch nicht geklärt werden.

In den letzten Jahren wurde das Augenmerk verstärkt auf die Regulation des UPS während einer Entzündungsreaktion im ZNS gerichtet. Die Gabe an Bortezomib, einem Borsäure-Dipeptid, welches die Proteasom-Aktivität inhibiert, resultierte in einem milderen Krankheitsverlauf in MOG₃₅₋₅₅-immunisierten C57Bl/6-Mäusen gemessen an den Kontroll-Tieren [110]. Ein ähnliches Bild wurde unter dem Einfluss des grünen Tee-Extraktes Epigallocatechin-3-Gallat (ECGC) in Proteolipid-Protein (PLP₁₃₉₋₁₅₁)-immunisierten SJL-Mäusen vorgefunden. SJL-Mäuse weisen einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf auf. Im Gegensatz dazu repräsentieren C57Bl/6 Mäusen ein beständiges Krankheitsbild. Sowohl die präventive als auch die therapeutische Behandlung mit ECGC ließ das Krankheitsbild einer EAE verschwinden. Das grüne Tee-Extrakt inhibiert die Aktivität des Proteasoms, wodurch zum einen eine Akkumulation an Poly-Ubiquitin inklusive dem NF κ B-Suppressor I κ B in T-Lymphozyten

provoziert wurde und zum anderen die ROS-Bildung in Neuronen selbst vermindert war [111]. Die Blockade der Proteasom-Aktivität mit Hilfe des grünen Tee-Extraktes führt zu einer Verbesserung einer neurodegenerativen Erkrankung durch eine allgemeine Unterdrückung der inflammatorischen Prozesse. Im Gegensatz hierzu führt ein fehlendes Immunoproteasom zu einer verstärkten Inflammation im ZNS. Aus den hier zugrunde liegenden Daten wird dem UPS, insbesondere dem induzierbaren Komplex, eine essentielle Rolle im Zusammenhang einer entzündlichen Reaktion im Gehirn zugeschrieben, dennoch muss der gestörte Signalweg, der durch ein fehlendes Immunoproteasom betroffen ist, noch systematisch geklärt werden.

4.2 Immunoproteasom in neuronalen Kulturen

4.2.1 Der Einfluss der DNA-Methylierung im neuronalen LMP7-Promotor

Gene des adaptiven (ebenso wie des angeborenen) Immunsystems, welche die Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 und LMP7 kodieren, rufen eine späte transkriptionelle Antwort hervor, da sie unter normalen Umständen in nicht-hämatopoetischen Gewebe bzw. Zellen unterdrückt sind. Dieser gewebespezifische Mechanismus der Stilllegung des Promotors ist meist unbekannt, die mögliche Beteiligung von epigenetischen Faktoren wie die Nukleosom-Reposition oder DNA-Methylierung können nie ausgeschlossen werden. Vor Kurzem wurde beschrieben, dass eine späte bzw. verzögerte Transkription eines Immun-Gens auf einen einzigen Faktor angewiesen sein kann, unabhängig von dem bereits gestarteten Transkriptions-Signal [112]. Die Regulation der Transkription über diesen Mechanismus fordert eine schnelle und effiziente Amplifizierung des korrekten Transkripts. Die Kontrolle eines Prozesses, der von zwei Schritten abhängig ist, setzt eine straffe Überwachung der Gen-Aktivität im normalen Zustand voraus. Eine derartige strenge Kontrolle der Genexpression ist vor allem im Gehirn zu finden.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass die neuronale elektrische Impulsweiterleitung in der Zelltyp-spezifischen Suppression des LMP7-Gens involviert ist. LMP7 ist die limitierende Immunoproteasom-Untereinheit. Die katalytisch-aktive, induzierbare Untereinheit wird für die effiziente Assemblierung des funktionalen Immunoproteasom-Komplexes benötigt. Der induzierbare Proteasom-Komplex führt zu einer verbesserten

Antigen-Prozessierung, welche unter anderem für eine stabile Oberflächen-Expression des MHC I-Moleküls in neuronalen Zellen verantwortlich ist.

Die Analyse der hippocampalen neuronalen Zelllinie HT-22 zeigt eine nicht-Induzierbarkeit der LMP7-Untereinheit (Kapitel 3.3). Hierfür verantwortlich sind epigenetische Faktoren, die die Transkription von LMP7 in dieser Zelllinie unterdrücken. Das Methyl-CpG-bindende Protein MBD1 besetzt die IRF1-Bindungsstelle des LMP7-Promotors, schematisch dargestellt in Abb. 28. Somit beeinflusst der Status der DNA-Methylierung die Empfänglichkeit der $\text{IFN}\gamma$ -Signaltransduktion. Jedoch ist das Binden von IRF1 an sein IRF-Element (5'- G(A)AAA^G/C^T/C^TGAAA^G/C^T/C^T-3') essentiell für die LMP7-Induzierbarkeit [24].

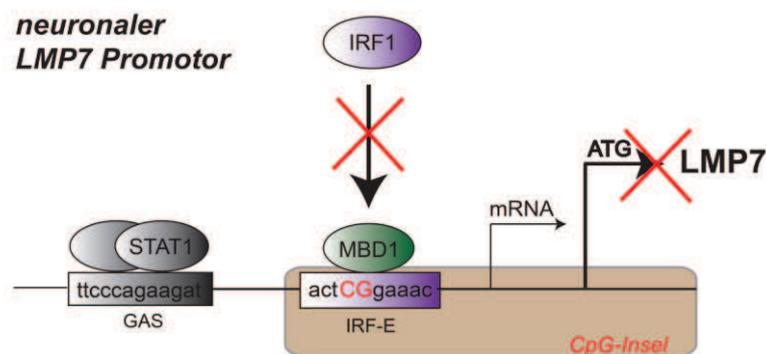


Abb. 28 Schematische Präsentation des neuronalen LMP7 Promotors. STAT1 bindet an der Gamma-Interferon-aktivierten Sequenz (GAS), dadurch wird der $\text{IFN}\gamma$ -Signalweg eingeleitet. IRF1 kann jedoch nicht an seinem IRF-Element (IRF-E) im neuronalen LMP7-Promotor binden, da dieses von MBD1 blockiert ist.

Die $\text{IFN}\gamma$ -abhängige LMP7-Initiierung in den HT-22 Zellen wird über eine Blockade der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) hervorgerufen (Abb. 16). Diese Enzyme sind für das Aufrechterhalten des DNA-Methyl-Musters einer Zelle zuständig. Werden sie blockiert, werden vorhandene Methyl-CpG revidiert und die Transkription (unterschiedlicher) Gene kann ermöglicht werden. Nicht nur in der hippocampalen HT-22 Zelllinie, sondern auch in der murinen MHC I-defizienten Zelllinie TC-1/A9 wird die Transkription des LMP7-Gens mit der Hilfe von epigenetischen Faktoren reguliert [113]. In dieser Veröffentlichung konnte die Expression von LMP7 unter demethylierenden (Agens: 5-Aza) und HDAC-inhibierenden (Agens: Trichostatin A) Konditionen gezeigt werden. Auch die Gabe beider Agentien führte zu einer LMP7-Induktion. Infolgedessen wird die straffe Überwachung der induzierbaren LMP7-Untereinheit nicht nur in einer neuronalen

sondern auch in anderen Zelllinien von dem Methyl-Status und dem Status der Histonmodifikation der DNA kontrolliert.

MBD1 reguliert nicht nur in der hier verwendeten hippocampalen neuronalen Zelllinie (HT-22), sondern auch in neuronalen Stammzellen die Transkription verschiedener neuronaler Gene. Das Fehlen von MBD1 weist generell keinen Entwicklungsdefekt in Mäusen auf, allerdings ist die Neurogenese reduziert und im Alter konnte ein Lern-Defizit festgestellt werden [103]. Der Einfluss auf die adulte Neurogenese konnte von Li und Kollegen im Jahre 2008 demonstriert werden. MBD1 blockiert den Promotor des exogenen basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (bFGF2) in einer ähnlichen Weise wie den LMP7-Promotor der HT-22 Zellen (Abb. 18). Eine Hochregulation von bFGF2 konnte nach der Behandlung mit 5-Aza beobachtet werden [114]. bFGF2 ist essentiell für die Neurogenese und neurale Entwicklung [115]. Eine ähnliche Situation wurde in Neuroepithel-Zellen gefunden. Die Stimulation mit dem leukämisch-inhibierenden Faktor LIF, welcher normalerweise eine Astrozyten-Differenzierung fördert, führt im Neuroepithel nicht zu einer GFAP-Expression, da die Transkription durch die Methyl-CpG-bindenden Proteine MBD1 und MeCP2 inhibiert wird [76].

Der CpG-assoziierte Repressor MBD1 ist wichtig für die Erhaltung der heterochromatinen Struktur [116] und besetzt das IRF-Element des LMP7-Promotors in neuronalen Zellen. Im Gegensatz hierzu wird MBD1 am microglialen LMP7-Promotor unter $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation freigesetzt (Abb. 18). Der Mechanismus, welcher sich hinter der Aufhebung der MBD1-Blockade verbirgt, ist jedoch noch unbekannt. Bisher wurde gezeigt, dass DNA-Methylierung (MBD1) eine STAT1-abhängige Transkription beeinflussen kann [117]. Dies deutet darauf hin, dass der $\text{IFN}\gamma$ -abhängige Signalweg der Neuronen davon betroffen sein könnte, da die Dissoziation von MBD1 in den Microgliazellen gegeben ist. Der Jak-STAT-Signalweg, ausgelöst über das pleiotrope Zytokin $\text{IFN}\gamma$, ist nicht betroffen, da andere $\text{IFN}\gamma$ -abhängige Gene wie LMP2 (sowie pSTAT1, β 2M, IRF1, TAP1, TAP2) induziert werden. Eine weitere, wichtige Besonderheit des MBD1-Proteins ist die Eigenschaft sich an unmethylierten und methylierte Promotoren zu binden [116]. In erster Linie fungiert es als Methyl-CpG-bindendes Protein, jedoch kann es sich ohne weiteres auch an einem unmethylierten CpG-Dinukleotid binden. Zusätzliche Analysen in Abhängigkeit der DNA-bindenden MBD1-Domäne für die neuronale Unterdrückung des LMP7-Gens werden benötigt.

Im Allgemeinen spielen MBD1 und MeCP2 eine maßgebende Rolle in der CpG-abhängigen Stilllegung der MHC I-zugehörigen Moleküle in neuronalen Zellen [103], [118]. Repräsentativ stehen sie für einen generellen Mechanismus, der für die ‚Immunantwort‘ im ‚immun-privilegierten‘ Nervengewebe verantwortlich ist. Insofern sind die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Beweise für den hyper-methylierten Zustand der ZNS-Gene [64], [119], die als wichtige Vorboten der neuronalen Entwicklung und des neuronalen Überlebens dienen.

4.2.2 Die Assemblierung des neuronalen Immunoproteasoms in Abhängigkeit der elektrischen Impulsweiterleitung

Histologische Untersuchungen stellen die neuronale Induktion von LMP2 und LMP7 meist nur in verschiedenen (humanen) ZNS-Erkrankungen dar. So wurde das murine LMP2-Protein (und LMP7-Protein) elektronenmikroskopisch in Neuronen im Mausmodell der Huntington-Erkrankung (HD) nachgewiesen. In derselben Publikation wurde in HD-Patienten das (neuronale) Auffinden von LMP2 und LMP7 in kortikalen und striatalen Sektionen dargestellt, wobei die ultrastrukturelle Analyse LMP7-positive Neuronen vorwies [120]. Huntington wird durch die Expansion an Polyglutamin im Exon 1 des Huntingtin-Gens charakterisiert und geht mit neuronaler Degeneration und dem Verlust an neuronaler Population besonders im Cortex und Striatum einher [121].

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung ist der Morbus Alzheimer. Kennzeichnend hierfür sind extrazelluläre Amyloid- β -Plaques und intrazelluläre veränderte Neurofibrillen, die mit einer Abwandlung des oxidativen Zustandes, einer Eisen- und mitochondrialen Dysregulation sowie einem inflammatorischen Prozess zusammenhängen [122]. Im humanen Alzheimer-erkrankten Gehirn konnte eine Kollokalisierung in Neuronen sowie Astrozyten und Oligodendrozyten der drei katalytisch-aktiven Immunoproteasom-Untereinheiten gezeigt werden [123], [124].

Humane Encephalitis, eine mögliche Folge-Erkrankung einer HIV-Infektion, führte zu einer Überlagerung der neuronalen Marker, NeuN, Neurofilament und Synaptophysin mit dem LMP2-Protein. Diese Art der ZNS-Inflammation kann mit kognitiven Verlust einher gehen, wird aber vorwiegend durch Läsionen definiert, die durch importierte HIV-Partikel im Gehirn provoziert werden [125].

Allen hier genannten humanen neurodegenerativen Erkrankungen ist eine neuronale Dysfunktion, ein unterbrochenes neuronales Netzwerk bzw. der Verlust an Neuronen,

aufgrund von gestörter sowie angegriffener neuronaler Aktivität gemein. Die Analyse der neuronalen Immunoproteasom-Expression in der Maus in dieser Arbeit stellt eine Annäherung an die humanen neurodegenerativen Erkrankungen dar, in denen der iP-Komplex in Neuronen gefunden worden ist. In der Maus waren der zugrundeliegende Mechanismus und die *in vitro*-Analysen des Immunoproteasoms bis jetzt auf primäre Gliazellen beschränkt [95], [126]. Es gestaltete sich als eine experimentelle Herausforderung, die funktionale *de novo*-Synthese des Immunoproteasoms in Neuronen zu charakterisieren. Die Ergebnisse der hippocampalen Zelllinie sprechen für eine blockierende DNA-Methylierung am LMP7-Promotor. Es konnte gezeigt werden, dass Neurone, die zur elektrischen Impulsweiterleitung fähig sind, die LMP7-Untereinheit nur exprimierten, wenn die Leitfähigkeit blockiert und die Gegebenheit eines pro-inflammatorischen Prozesses gegeben war (Abb. 19 und Abb. 20). Die Aktionspotential-Inhibierung erfolgte über Tetrodotoxin, einem spannungsabhängigen Natriumkanal-Blocker. Es existieren sowohl TTX-resistente als auch TTX-sensitive Natriumkanäle in den verschiedenen Zellen des ZNS [127].

Die Anwesenheit von spannungsabhängigen Natriumkanälen in aktivierten Gliazellen während der induzierten EAE (bzw. in der MS-Pathogenese) wurde in einigen Publikationen diskutiert. Die Hochregulation an Nav1.6, einem TTX-sensitiven Natriumkanal, in aktivierten Microgliazellen/Makrophagen in EAE und MS konnte gezeigt werden [128]. Hinzu kam eine dynamische Hochregulation an Nav1.5, einem TTX-resistenten Natriumkanal, in reaktivierten Astrozyten insbesondere in aktiven und chronischen Läsionen des MS-erkrankten Gehirns [129]. Darüber hinaus resultiert eine TTX-Behandlung in einer gesunkenen Phagozytose-Eigenschaft der aktivierten Microgliazellen [128].

Die inhibierte Reizweiterleitung mit Hilfe von TTX spiegelt die pathologische Situation wider, die während einer neuronalen Degeneration bzw. eines axonalen Verlustes, auch Axotomie oder Denervation genannt, vorgefunden wird. Das hier zugrunde liegende Ergebnis zeigt, dass ein neuronaler Aktivitäts-abhängiger Signalweg für die LMP7-Suppression in Neuronen verantwortlich ist. Das heißt, die existierende DNA-Methylierung der IRF1-Bindungsstelle des neuronalen LMP7-Promotors geht mit Hilfe der Aktionspotential-Inhibierung in einen unmethylierten Zustand über (Abb. 22). Die in dieser Arbeit verwendete drei-tägige TTX-Gabe führt nicht zu einer ersichtlichen Toxizität in den primären neuronalen Kulturen. Längere TTX-Exposition (5 bis 12 Tage)

verursachen hingegen neuronalen Zelltod, der sich nur auf Nerven- aber nicht auf Gliazellen bezieht [130].

Umfangreiche Daten dokumentieren die Regulation der Gentranskription durch neuronale Aktivität [131] und die möglicherweise daraus resultierende Beeinflussung des DNA-Methylierung-Zustandes an Promotoren von spezifischen neuronalen Genen [132], [133], [134]. Hervorgerufen durch die Impulsweiterleitung kann eine konzertierte Steuerung der Aktivitäts-abhängigen Faktoren vermittelt werden. Diese Faktoren werden für das vollständige Programm der Genexpression an funktionellen, sich formierenden und reifen Synapsen benötigt.

Das Spektrum aller synaptisch-aktiven Gene, die von der Reizweiterleitung negativ bzw. positiv reguliert werden, wurde anhand einer zwei-tägigen TTX-Behandlung in primären neuronalen Ratten-Kulturen von Kitamura und Kollegen analysiert [135]. Hier wurden Munc13-1, ein Faktor der für das Primen und Andocken der synaptischen Vesikel verantwortlich ist, Shank2, ein post-synaptisches Gerüst-Protein und Rgs2, ein Regulator des trimerischen G-Protein-Signalweges, als die Schlüsselfaktoren der TTX-blockierten Reizweiterleitung identifiziert. Leider konzentrierte sich diese Analyse nur auf synaptische Proteine. Eine Microarray-Analyse (Affimetrix GeneChip) in humanen Gliazellen (HTB-138) konnte ein Verhältnis zwischen Natriumkanalblocker TTX und Immunoproteasom zeigen. Alle drei katalytisch-aktiven Immunoproteasom Untereinheiten wurden unter TTX-Einwirkung (10 und 20 μM , 2-tägige Inkubation) erhöht aufgefunden [136].

Ein Zusammenhang zwischen der Substanz TTX und dem Zustand der DNA-Methylierung in Neuronen wurde bislang kaum in der Literatur beschrieben. Eine dreitägige TTX-Inkubation (1 μM) ruft eine Dissoziation von MeCP2 am neuronalen NMDA-Rezeptor NR2B-Promotor hervor, induziert durch die De-Methylierung des Promotors [137]. Die Resultate dieser Arbeit erklären einen alternativen Einfluss der Blockade der elektrischen Aktivität auf den DNA-Methyl-Status eines Promotors und reflektieren ein ähnliches Ergebnis wie hier am LMP7-Promotor in Neuronen. Demzufolge blockiert TTX nicht nur die elektrischen Aktionspotentiale in den Neuronen über die spannungsabhängigen Natriumkanäle, sondern beeinflusst auch das DNA-Methylierungs-Schema. Die Frage ist trotzdem unausweichlich, ob die Änderung des Methylierungsmuster nicht doch durch die gestörte synaptische Aktivität hervorgerufen

wird. Die Tatsache, dass die unreifen Neuronen, hier in dieser Arbeit die HT-22 Zelllinie und die diff. NVZ, nicht auf den drei-tägigen TTX-Stimulus mit einer erhöhten LMP7-Expression reagierten (Abb. 21B+C), spricht für die Abhängigkeit der Immunoproteasom-Synthese von der elektrischen Impulsweiterleitung in reifen Neuronen. In weiteren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass eine längerfristige Blockade der elektrischen Reizweiterleitung die *de novo*-Synthese synaptischer Proteine verändert ([138] und Kapitel 4.3.2) und epigenetische Faktoren von dieser gestörten neuronalen elektrischen Aktivität beeinflusst werden [133], [134].

Eine weitere Studie veranschaulichte, dass die Aktionspotential-Blockade hervorgerufen durch TTX, mit einer geringeren Proteasom-Aktivität einhergeht [47]. Diese Arbeitsgruppe verwendete zum einen ein GFP-fusioniertes CL1 Degron, welches als UPS-Reporter anerkannt ist. Die spezifische Sequenz liegt ubiquitiniert vor und wird von dem 20S-Komplex abgebaut [139]. Ein GFP-fusioniertes Ornithin-Decarboxylase Degron wurde ebenfalls eingesetzt, da es Ubiquitin-unabhängig von dem Proteasom-Komplex abgebaut wird. Sowohl die Stimulation der elektrischen Aktivität mit Hilfe von Bicucullin, als auch die Aktionspotential-Blockade mit TTX zeigten einen Einfluss auf die proteasomale Aktivität in den Dendriten von Neuronen, isoliert aus dem Hippocampus von Ratten. Die Verstärkung der Aktivität führte zu einem zügigen Abbau der Degron-Sequenz (sowohl Ubiquitin-abhängig als auch -unabhängig). Die Inhibition der Aktivität endete in einem verminderten Abbau beider Degron-Sequenzen. Zu betonen ist die 30-minütige Bicucullin-/TTX-Gabe in dieser Veröffentlichung, die nicht mit der hier angewendeten drei-tägigen TTX-Inkubation verglichen werden kann. Die ermittelten Ergebnisse der Djakovic-Veröffentlichung weisen dennoch darauf hin, dass sich das neuronale Proteasom schnell den gegebenen Umständen der aktivierenden oder inhibierenden synaptischen Aktivität anpasst. Demgegenüber steht die Hypothese der späten Langzeit-Depression, die eine Proteasom-abhängige Veränderung der synaptischen Proteine-Synthese aufgrund der veränderten Aktivität verfolgt [138] und im Kapitel 4.3.2 diskutiert wird. Die *de novo*-Synthese synaptischer Proteine ist ein dynamischer Aktivitäts-abhängiger Effekt, der in gleicher Weise auf den konstitutiven und induzierbaren Proteasom-Komplex angewiesen sein könnte. Die immunoproteasomale Beteiligung konnte bis heute nicht geklärt werden.

Nennenswert ist außerdem die gleichzeitige Hochregulation der MHC I-abhängigen Antigen-prozessierenden Proteine TAP1/TAP2 in Neuronen unter dem Einfluss von

TTX und $\text{IFN}\gamma$ [42]. Auf diese Weise wird eine vollkommene Aktivierung des Immunoproteasom-Komplexes und des MHC I-Signalwegs in Neuronen gegeben. Ob das Auffinden dieser Moleküle in Neuronen ein Vorteil oder eher ein ‚Hilferuf‘ darstellt, bleibt dennoch offen und wird in den folgenden Kapiteln diskutiert (Kapitel 4.2.3 und 4.3). Denn neuronale Aktivität kann die Expression von Immun-Molekülen auf benachbarten Gliazellen negativ regulieren [140].

4.2.3 Neuronale MHC I- und LMP7-Expression

Die zentrale Rolle des Immunoproteasoms in der Antigen-Präsentation wurde erst vor Kurzem von Neum dokumentiert [96]. Die Generation einer Triple Knock-out Maus für die katalytisch-aktiven Untereinheiten des Immunoproteasoms resultierte in einer verminderten H2K^b - und H2D^b -Oberflächen-Präsentation in B-Lymphozyten und DZ. Im Vergleich zu den Triple Knock-out Tieren konnte keine auffällige MHC I-Expression in den Immunzellen von LMP2- und Mecl1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Dennoch ähnelt die vorgefundene MHC I-Expression der Triple Knock-out Immunzellen dem Fehlen der LMP7-Untereinheit, die ebenso eine verminderte MHC I-Oberflächen-Expression hervorruft [96], [105]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LMP7-defiziente neurale Mischkulturen das gleiche Phänomen besitzen, eine verminderte MHC I-Oberflächen-Expression (Abb. 24A) gemessen an den WT-Mischkulturen. Primäre LMP7-defiziente neurale Mischkulturen weisen eine geringere H2K^b -Expression nach $\text{IFN}\gamma$ - und TTX+ $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation auf. Im Gegensatz zu den neuronalen Zellen, die nur mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert wurden, konnte keine Hochregulation des H2K -Moleküls auf der Oberfläche von TTX+ $\text{IFN}\gamma$ -behandelten Zellen nachgewiesen werden, somit scheint die neurale H2K -Expression nur von dem pro-inflammatorischen Stimulus abhängig zu sein. Das gezielte Verwenden von primären gemischten neuronalen Kulturen und die daraus folgende Anwesenheit von Gliazellen verhindert die beobachtete Hochregulation an H2K -Molekül in allen Neuronen, gezeigt in der Veröffentlichung von Neumann und Kollegen aus dem Jahre 1997 [42]. Die Ergebnisse des Einzel-Zell-Nachweises dieser Publikation konnte aus diesem Grund nicht reproduziert werden.

Eine vereinzelte Darstellung von Neuronen, die selbst H2K^b synthetisieren, konnte bei der Blockade des Aktionspotentials in Verbindung mit dem pro-inflammatorischen Zytokin $\text{IFN}\gamma$ erbracht werden (Abb. 24B). Interessanterweise konnte unter diesen

Bedingungen zwar LMP7-positive Neuronen gezeigt werden, die auch H2K produzieren, aber die alleinige H2K-Expression in Neuronen konnte nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung weist auf eine zentrale Rolle der Peptid-Generierung und die daraus resultierende stabile MHC I-Expression in Abhängigkeit des Immunoproteasoms in Nervenzellen hin. Der Zusammenhang zwischen diesen Faktoren in Neuronen wird im Kapitel 4.3 näher diskutiert.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Induktion von MHC I in Neuronen durch TTX+IFN γ eine Neurit-Transection und eine Fas-Ligand-abhängige Apoptose auslöst, wenn die Neuronen CD8⁺ T-Lymphozyten und einem H2D^b-spezifischen Peptid ausgesetzt werden [141]. Ein weiteres Experiment zeigte, dass die Überexpression an H2D^b in Neuronen zu einer Veränderung in der Hippocampus-Morphologie führte und die Neuroreparatur beeinträchtigte [142]. Abgesehen von diesen Ergebnissen ist veranschaulicht worden, dass ZNS-Nervenzellen MHC I exprimieren, wenn deren Synapsen eine Aktivitäts-abhängige Reposition durchlaufen. Andererseits weisen MHC I-defiziente Mäuse neurologische Anomalien auf (zusammengefasst in [30]). Allein diese gegensätzlichen Darstellungen der neuronalen MHC I-Expression und die sich daraus entwickelnden Auffälligkeiten lassen das Immun-Molekül MHC I in Neuronen schwer kategorisieren. Hier wird in dieser Arbeit ein Punkt erreicht, der die neuronale MHC I-Expression kritisch hinterfragt und die adaptive Funktion in Neuronen nicht ersichtlich ist. Die gemeinsam-auftretende Faktoren elektrische Aktivität, neuronale MHC I-Expression sowie das neuronale Immunoproteasom benötigen weiterführende Experimente zur vollständigen Klärung der Existenz und für die Relevanz in Neuronen.

4.3 Die synaptische Transmission und der neuronale Immunoproteasom-Komplexes

4.3.1 Neuronale MHC I- und Immunoproteasom-Expression in Abhängigkeit der synaptischen Plastizität

Im letzten Jahrzehnt ist wiederkehrend dokumentiert worden, dass der Oberflächenmarker MHC I in Verbindung mit der synaptischen Plastizität steht. Die hier in dieser Arbeit vorgelegten Daten, ebenso wie die Daten der Neumann-Publikation [42], sind *in vitro*-Experimente, die die MHC I-Expression in isolierten,

kultivierten Neuronen analysieren. Meist wurde unter diesen experimentellen Bedingungen das MHC I-Molekül unter pro-inflammatorischen, aber nicht unter physiologischen Umständen gefunden (Kapitel 3.4), [42]. Im Gegensatz hierzu stehen die *in vivo*-Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass MHC I-Gene im Gehirn dynamisch reguliert werden. Neurone, die vor allem eine Aktivitäts-abhängige Änderung erleben, exprimieren MHC I-Gene im ZNS [29], [30]. Die Analyse der Langzeit-Plastizität in MHC I-defizienten Mäusen [kombinierter Knock-out an β 2M & TAP] demonstrierte letztendlich eine Verknüpfung der neuronalen MHC I-Expression mit der neuronalen elektrischen Aktivität. In der CA1-Region des Hippocampus der MHC I-defizienten Mäuse war die LTP erhöht, hingegen fehlte jede Reaktion auf die Stimulation der LTD [30]. Die Schlussfolgerung, dass neuronale MHC I-Proteine die synaptische Plastizität regulieren, konnte somit gezeigt werden.

Abgesehen von diesen Ergebnissen konnte das Molekül MHC I post-synaptisch (Kokalisation mit PSD-95) bzw. in der Nähe von Synapsen in kultivierten, murinen, hippocampalen Neuronen lokalisiert werden [30]. Diese Resultate geben einen Hinweis auf keine ‚normale‘ MHC I-Expression in Neuronen im gesunden Gehirn, aber zeigen, dass die MHC I-Moleküle von der neuronalen Aktivität reguliert werden. Ein weiterer Hinweis auf eine adaptive Funktion des neuronalen MHC I-Moleküls.

Des Weiteren stehen diese Beobachtungen im Einklang mit der LMP7-Expression in Neuronen, die ebenfalls in Abhängigkeit der elektrischen Aktivität beobachtet wurde (siehe Kapitel 3.4 und 3.5). Die LMP7-Expression führt zu einer MHC I-Expression in primären Neuronen (Abb. 24C). Es liegt nun die Vermutung nahe, dass ein intaktes Immunoproteasom eine Voraussetzung für eine MHC I-Oberflächen-Expression in Nervenzellen ist. Beide Moleküle werden über elektrische Aktivität reguliert und in der Nähe von Synapsen vorgefunden ([30] und Abb. 20). Die erhöhte LTD in den LMP7 -/- Mäusen zeigt (Abb. 27), dass das Immunoproteasom von der synaptischen Plastizität reguliert wird, jedoch auf eine andere Weise als bei den MHC I-defizienten Mäusen [30]. Die Induktion der LTD im Hippocampus der MHC I-defizienten Mäuse erfolgte über einen Frequenz-Stimulus. Die chemische LTD in der hier vorliegenden Arbeit wurde über NMDA induziert, zwei unterschiedlich neurophysiologische Modelle werden hier verwendet. Die Verbindung der synaptischen Plastizität und/oder der neuronalen MHC I-Expression mit dem neuronalen Immunoproteasom wird mit den Daten der hier vorgelegten Arbeit unterstützt.

4.3.2 LMP7 und neuronale Aktivität

Allgemein anerkannt ist die zentrale Rolle des Immunoproteasoms bei der effizienten Antigen-Prozessierung für die MHC I-Peptide im Vergleich zu dem konstitutiven Proteasom-Komplex. In der Vergangenheit unterstrichen verschiedenste Arbeiten weitere angepasste Funktionen des Immunoproteasoms. Eine zusätzliche Aufgabe ist die Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase infolge eines beschleunigten Substratumsatzes induziert durch das Immunoproteasom bei einer viralen Infektion [143]. Eine weitere Funktion ist der wichtige Beitrag des Immunoproteasoms bei der angeborenen Immunantwort [144]. Eine entscheidende Aufgabe neben der effizienten MHC I-Peptid-Fragment-Generierung konnte vor Kurzem von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden. Das Immunoproteasom ist für die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase während eines inflammatorischen Prozesse zuständig. Pro-inflammatorische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ induzieren in einer Zelle oxidativen Stress (ROS), der zu neu-geformten und geschädigten Proteine oder auch DRiPs führen kann. Diese werden von dem Proteasom-Komplex, unter inflammatorischen Bedingungen eben auch von dem iP-Komplex, erkannt und abgebaut. Eine beschleunigte Abbau-Rate der Poly-Ubiquitin-gebundenen Proteine ist ebenso gegeben [11], [14], [17]. Ist aufgrund der fehlenden LMP7-Untereinheit kein funktionaler iP-Komplex vorhanden, so kommt es zu einer Anhäufung der DRiPs. Diese Akkumulation führt über den Weg der Apoptose zum Zelltod. [11].

Die erweiterten, angepassten Funktionen des Immunoproteasoms, die zentrale Rolle des konstitutiven Proteasom-Komplexes in der synaptischen Transmission sowie die neuronale Immunoproteasom-Synthese unter dem Einfluss der elektrischen Impulsstörung ließen darauf schließen, dass das induzierbare Proteasom auch von der synaptischen Aktivität abhängig ist. Ausgehend von dem $\text{IFN}\gamma$ -induzierten oxidativen Stress und der Notwendigkeit für den korrekten Abbau der DRiPs [11] wurde der Einfluss des pro-inflammatorischen Zytokins auf die elektrische Aktivität in primären WT- und LMP7-defizienten Kulturen untersucht (Abb. 25). Die Hochregulation des neuronalen Aktionspotentials in Gegenwart der ROS ($\text{IFN}\gamma$ -Stimulation) konnte nur in der Wildtyp-Kultur beobachtet werden. Die fehlende Reaktion auf den $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus in den Knock-out Kulturen ähnelt dem niedrigen MHC I-Expressionsmuster in den LMP7-defizienten Kulturen (neurale Zellen (Abb. 24A) und Immunzellen [96], [105]). Die Abhängigkeit der Immunoproteasom-Synthese von der synaptischen Aktivität wird

durch diese Daten bestärkt. Die Analyse der synaptischen Proteine, Synapsin und PSD-95 (Abb. 26), ergab jedoch keinen Hinweis auf eine vorliegende Mutation in den LMP7-defizienten Neuronen bzw. keine signifikante Veränderung der Synapsen unter dem Zytokin-Einfluss. Diese Ergebnisse geben erneut Hinweise auf eine entscheidende Rolle der Immunoproteasom-Synthese in Gliazellen. Dennoch ist eine exakte Analyse des Synaptosoms in den LMP7-/- Tieren erforderlich.

Bereits veröffentlichte Ergebnisse bezüglich der Reizweiterleitung und des pro-inflammatorische Zytokin $\text{IFN}\gamma$, stellen ein ähnliches Bild in isolierten Ratten-Neuronen dar. Die Neumann-Publikation aus dem Jahre 1997 untersuchte ebenfalls die neuronale Aktivität unter dem Einfluss der drei-tägigen $\text{IFN}\gamma$ -Gabe, die zu einer Anhäufung der Aktionspotentiale führte [42]. Organotypische Kulturen aus dem Hypothalamus von Ratten weisen ebenfalls eine erhöhten Aktivitäts-Rate unter zwei-tägiger $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation auf [145].

Wie jedoch ist nun der (induzierbare) Proteasom-Komplex mit der elektrischen Aktivität verknüpft?

Eine Immunoproteasom-abhängige Regulation der synaptischen Wirksamkeit wird in dieser Arbeit mit dem Lerneffekt und der Erinnerungsformation in Zusammenhang gebracht. Die Induktion des chemischen LTD mit 20 μM NMDA wurde gewählt, da dies ein post-synaptischer Prozess ist, der für das biochemische und biophysikalische Studium der synaptischen Plastizität verwendet wird und als etabliertes Modell anerkannt ist [146]. Die Aminosäuren Glutamat und Aspartat (NMDA) sind im Prinzip die exzitatorischen Neurotransmitter des Gehirns. Die vorgefundene verstärkte Depression der synaptischen Aktivität in LMP7-defizienten hippocampalen organotypischen Kulturen (Abb. 27) war dennoch überraschend, da keine neuronale Induzierbarkeit von LMP7 im *in vivo*- und *in vitro*-Kapitel beobachtet werden konnte (Kapitel 3.1 und 3.4). Demzufolge ist die Beteiligung des Immunoproteasoms in Gliazellen von größerer Bedeutung als bis jetzt angenommen. Astrozyten spielen eine entscheidende Rolle in der axonalen Impulsweiterleitung [147]. So könnte durch den Defekt des nicht-vorhandenen Immunoproteasoms eine gestörte Glutamat-Aufnahme der Astrozyten für das erhöhte Auffinden der LTD sowie die gestörte elektrische Aktivität in den LMP7-defizienten Neuronen verantwortlich sein (Abb. 25 und Abb. 27). Andererseits spricht die existierende Akkumulation der DRiPs in den LMP7-defizienten

Tieren [11] für ein gestörtes Gleichgewicht im Immunoproteasom-abhängigen Protein-Turnover der Astrozyten, was wiederum die elektrische Leitfähigkeit der Neuronen beeinflussen kann.

Eine durch das UPS-vermittelte Regulierung von Lernprozessen konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden. Eine bilaterale Infusion von Lactacystin, einem Proteasom-Inhibitor, in die CA1-Region des Hippocampus induzierte ein Zeit-abhängiges Defizit des Erlernens [43]. Hingegen zeigte die NMDA-induzierte AMPA-Rezeptor Endozytose (eine weitere Form der LTD) keinen Unterschied zwischen den unbehandelten und MG132-behandelten Neuronen [148]. Jedoch ergab die proteasomale Inhibition, über MG132 gemessen, am Glutamat-Rezeptor-abhängigen Weg eine ähnliche LTD [148] wie die von uns beobachtete verstärkte chemische LTD im Hippocampus der LMP7 ^{-/-} Mäuse. Somit kann eine unterschiedliche Induktion der Langzeit-Depression in verschiedenster Weise eine Reaktion der Synapsen hervorrufen und wird folglich von vielen Faktoren beeinflusst. Aus diesem Grund bzw. aus diesen Gründen sind weitere Untersuchungen über die Beteiligung des Immunoproteasoms an der synaptischen Transmission notwendig.

Im Gegensatz zur Abschwächung der synaptischen Signalübertragung, hier in dieser Arbeit als chemische LTD definiert, steht die langandauernde Verstärkung der synaptischen Reizweiterleitung, dargestellt in der Langzeit-Potenzierung. Die Beteiligung der Zytokins IFN γ an der synaptischen Plastizität wurde von Griffin und Kollegen beobachtet. Organotypische akute hippocampalen Kulturen, isoliert aus adulten Ratten, zeigten einen Anstieg des Zytokins IFN γ im Zusammenhang einer verminderten LTP im Vergleich zu den organotypischen Kulturen isoliert aus dem Hippocampus von jungen Ratten [149].

Eine von Cai und Kollegen aufgestellte Hypothese besagt, dass der proteasomale Substratumsatz eine entscheidende Rolle in der synaptischen Kennzeichnung und der Plastizitäts-relevanten Proteinhomöostase an stimulierten Synapsen spielt. Diese Publikation untersuchte den Zusammenhang des UPS in den verschiedenen Arten der LTP. Eine ‚späte‘ LTP beinhaltet eine hervorgerufene, durch die synaptische Aktivität erzwungene, synaptische Protein-Synthese, welche durch den proteasomale Abbau gesteuert werden kann. Genau diese Art der ‚späten‘ LTP fordert die Anwesenheit des funktionellen UPS, denn die Beteiligung des Proteasoms führt zur weiterführenden

synaptischen Veränderungen. Dies beeinflusst die chemische Impulsweiterleitung und wird in der Veröffentlichung als ‚Tagging‘ bezeichnet. Im Gegensatz dazu ist die ‚kurzverweilende‘ LTP vom UPS unabhängig [138], was im Widerspruch zu der Djakovic-Veröffentlichung steht ([47], siehe Kapitel 4.2.2). Djakovic und Kollegen demonstrierten, dass die Proteasom-Aktivität sich den Umständen der synaptischen Aktivität sofort anpasst. Erneut handelt es sich hier um zwei unterschiedliche neurobiologische Methoden, die einen Hinweis auf die Beteiligung des Proteasoms an der synaptischen Transmission geben, aber untereinander nicht verglichen werden können. Die Publikation von Cai und Kollegen trägt zum Verständnis des proteasomalen Umsatzes während der *de novo*-Synthese in Synapsen bei. Dies geschieht jedoch nur im Zusammenhang mit einer fortdauernden Aktivität, was wiederum mit der späten Reaktion des LMP7-Gens in Neuronen korrelieren könnte. Wichtig ist es nun, die immunoproteasomalen Untereinheiten in den verschiedenen Zellen des ZNS mit Hilfe von histologischen Analysen zu untersuchen. Somit könnte man die Beteiligung des neuronalen bzw. neuronalen Immunoproteasoms den spezifischen ZNS-Zellen zuordnen und des Weiteren die Abhängigkeit des neuronalen Immunoproteasoms von der synaptischen Aktivität untersuchen.

Die hier vorgelegte Arbeit charakterisiert erstmalig das Immunoproteasom in den verschiedenen Zellen des ZNS. Im ersten Teil konnte gezeigt werden, daß eine physiologische Differenz in den Immunoproteasom-defizienten Tieren während einer neurodegenerative Erkrankung existiert. Der Beitrag des Immunoproteasom-Komplexes in Gliazellen im Verlauf einer Entzündung im ZNS spielt eine entscheidende Rolle. Die Immunoproteasom-Synthese wird in Neuronen unter physiologischen Bedingungen (*in vivo* und *in vitro*) unterdrückt. Die *in vitro*-Experimente ergaben eine LMP7-Induktion in primären Neuronen im Zusammenhang einer gestörten elektrischen Aktivität in Abhängigkeit des pro-inflammatorischen Stimulus (IFN γ). Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die LMP7-Expression in (humanen) Neuronen auch ohne den Einfluss des pro-inflammatorischen IFN γ existiert. Die Illustration an LMP7-positiven pyramidalen und granulären Neuronen im Hippocampus und Cortex von Epilepsiebefallenen Gehirnen ist eine manifestierte Darstellung für die Verknüpfung der neuronalen Immunoproteasom-Assemblierung und synaptischer Plastizität [150].

Die Daten der Mishto-Veröffentlichung lassen gemeinsam mit den vorgelegten (murinen) Ergebnissen dieser Arbeit und dem Auffinden der LMP2- und LMP7-

Untereinheiten in (humanen) neurodegenerativen Erkrankungen (siehe Kapitel 4.2.2) folgenden Schluss zu:

Werden reife Neuronen in ihrer Impulsweiterleitung gestört, das neuronale Netzwerk bricht zusammen bzw. es liegt ein neuronaler Verlust vor, so wird die *de novo*-Assemblierung des Immunoproteasoms in Neuronen induziert. Diese ‚defekten‘ Neurone beginnen auch das Molekül MHC I an der Oberfläche zu präsentieren. Die *de novo*-Synthese des neuronalen Immunoproteasoms (und die Expression des Oberflächen-Markers MHC I) wird in gesunden, elektrisch-aktiven Neuronen infolgedessen streng kontrolliert.

5 Zusammenfassung

Als Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom Systems (UPS) ist das Proteasom als eine ATP-abhängige multi-katalytische Protease an verschiedenen essentiellen Prozessen in eukaryotischen Zellen beteiligt. Eine wichtige Funktion ist die Generierung von Peptiden, die von dem Molekül MHC I auf der Zelloberfläche den CD8+ T-Lymphozyten präsentiert werden. Zahlreiche Untersuchungen dokumentieren, dass ein gestörtes UPS mit vielen neurologischen oder neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht. Unter inflammatorischen Prozessen findet durch einen Austausch der katalytisch-aktiven konstitutiven gegen die katalytisch-aktiven induzierbaren Untereinheiten die Bildung des Immunoproteasoms (iP) statt. Das iP bewirkt eine effizientere Peptid-Generierung und eine erhöhte Protein-Abbau-Rate. In neuronalen Zellen wurde dieser induzierbare Proteasom-Komplex vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet. Dennoch ist die Funktion des iP in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) bislang ungeklärt.

Fokus dieser Arbeit war das Immunoproteasom in neuronalen Zellen *in vitro* und *in vivo* unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis, erkrankten Immunoproteasom-defiziente Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen früher und schwerer. Während des inflammatorischen Prozesses im ZNS konnte eine Immunoproteasom-Synthese in Gliazellen, jedoch nicht in Neuronen beobachtet werden. Das Fehlen eines iP-Komplexes führte in den Zellen des ZNS zu einer Akkumulation von Poly-Ubiquitin-Konjugaten, und in der Folge zur Apoptose und einem verstärkten pro-inflammatorischen Stimulus.

Die *in vitro*-Experimente mit neuronalen Zellkulturen (HT-22, neurale differenzierte Vorläuferzellen, primäre neuronale Mischkultur) zeigten, dass Neurone auch unter physiologischen Bedingungen keinen iP-Komplex synthetisieren. Die *in vivo*-Daten konnten dadurch bestätigt werden, dass das pro-inflammatorische Zytokin Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) nur in den Gliazellen der primären Kulturen die *de novo*-Synthese des iP induzierte. Es zeigte sich, dass die Bindungsstelle des Interferon-regulierenden Faktors 1 (IRF1) im neuronalen Promotor der für die Assemblierung und proteolytischen Aktivität des iP essentiellen Untereinheit LMP7 methyliert vorliegt. In den primären, reifen Neuronen konnte eine Induktion der LMP7-Untereinheit in Abhängigkeit der Aktionspotential-Blockade mit dem Zytokin $\text{IFN}\gamma$ gezeigt werden. Überraschenderweise

konnte in isolierten, primären Neuronen eine Korrelation zwischen der Oberflächenexpression des MHC I-Moleküls und der Immunoproteasom-Synthese beobachtet werden. Außerdem konnte eine Beteiligung des iPs an der synaptischen Plastizität dokumentiert werden, das Fehlen des ‚neuronalen‘ Immunoproteasoms resultierte in einer verminderten elektrischen Aktivität unter pro-inflammatorischen Bedingungen und in einer signifikant erhöhten chemischen Langzeit-Depression.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen erstmalig, dass unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen die Expression des Immunoproteasoms in Neuronen epigenetisch und in Abhängigkeit von der elektrischen Aktivität reguliert wird, und die wichtige Funktion des Immunoproteasoms während einer neurodegenerativen Erkrankungen daher auf seine Rolle in Gliazellen zurückzuführen ist.

6 Abstract

The proteasome, one crucial component of the ubiquitin-proteasome system (UPS), assists as an ATP-dependent multi-catalytic protease in different essential processes of eukaryotic cells. The generation of peptides, which are presented on the cell-surface to CD8⁺ t-lymphocytes, is one of the main functions of the proteasome. A dysfunction of the UPS is connected to various neurological or neurodegenerative diseases. Under inflammatory stimuli the exchange of the catalytically active subunits, which transforms the constitutive proteasome into the inducible proteasome, results in the *de novo* synthesis of the immunoproteasome (iP). The iP implicates a more efficient peptide-generation for the MHC I complex caused by a higher protein-turnover. The inducible proteasome is known to be expressed in neural cells especially in neurodegenerative diseases. The precise function, however, has not been revealed so far in the cells of the central nervous system (CNS).

Main focus of the investigations was to define the role of the iP in neural cells in *in vitro* and *in vivo* experiments under physiological and pathophysiological conditions like neuroinflammation. By the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis, the animal model of multiple sclerosis, in immunoproteasome-deficient mice an earlier onset and higher severity of the disease in these animals was discovered. The *de novo*-synthesis of the iP was only observed in glia-cells but not in neurons during pro-inflammatory processes in the CNS. Animals without an iP-complex accumulated more poly-ubiquitin conjugates resulting in apoptosis and enhanced pro-inflammatory stimuli. *In vitro* experiments revealed that neuronal cells (HT-22, differentiated neural progenitor cells and primary neurons) do not synthesize the iP-complex under physiological conditions and by induction of the iP with the pro-inflammatory cytokine interferon-gamma (IFN γ) in glia-cells the *in vivo* data was confirmed. Furthermore it was shown that the interferon regulatory factor 1 (IRF1) binding site of the neuronal promoter of the LMP7 subunit, which is essential for the assembly and the proteolytic activity of the iP, is methylated. Interestingly, inhibition of action potential combined with IFN γ treatment lead to the synthesis of the iP-complex in electrically active neurons. In addition a correlation between the neuronal surface expression of the MHC I molecule and the *de novo* synthesis of the iP was also determined in isolated primary neurons. Aside from that the involvement of the inducible proteasome-complex in the synaptic plasticity was observed. Immunoproteasome-deficient neural cells were characterized by a

diminished electrical activity under pro-inflammatory stimuli and an enhanced chemical long-term depression.

This work shows for the first time, that in neurons the expression of the immuno-proteasome is regulated by epigenetic factors and electrical activity and that the important function of the iP during neurodegenerative diseases is attributed to its crucial role in glia-cells.

Literaturverzeichnis

- 1 Kloetzel PM, Soza A, Stohwasser R. The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol Chem* 1999 Mar;380(3):293-7.
- 2 Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 2009 Aug;30(4):191-296.
- 3 Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002 Apr;82(2):373-428.
- 4 Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 2007 Jan 12;315(5809):201-5.
- 5 Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):179-87.
- 6 Rock KL, York IA, Saric T, et al. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 2002;80:1-70.
- 7 Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004 Nov 29;1695(1-3):225-33.
- 8 Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 2000 Nov 1;383(1):1-16.
- 9 Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011 Dec;11(12):823-36.
- 10 Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993 Sep 16;365(6443):264-7.
- 11 Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010 Aug 20;142(4):613-24.

- 12 Kruger E, Kuckelkorn U, Sijts A, et al. The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;148:81-104.
- 13 Strehl B, Seifert U, Kruger E, et al. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005 Oct;207:19-30.
- 14 Seifert U, Kruger E. Remodelling of the ubiquitin-proteasome system in response to interferons. *Biochem Soc Trans* 2008 Oct;36(Pt 5):879-84.
- 15 Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, et al. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today* 1996 Sep;17(9):429-35.
- 16 Griffin TA, Nandi D, Cruz M, et al. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 1998 Jan 5;187(1):97-104.
- 17 Kruger E, Kloetzel PM. Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Current Opinion in Immunology* 2012 Feb;24(1):77-83.
- 18 Rock KL, Farfan-Arribas DJ, Shen L. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* 2010 Jan 1;184(1):9-15.
- 19 Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004 Feb;75(2):163-89.
- 20 Ensoli F, Fiorelli V, Lugaresi A, et al. Lymphomononuclear cells from multiple sclerosis patients spontaneously produce high levels of oncostatin M, tumor necrosis factors alpha and beta, and interferon gamma. *Mult Scler* 2002 Aug;8(4):284-8.
- 21 Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* 2004 Dec;2(12):e405.
- 22 Williams BR. Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur J Biochem* 1991 Aug 15;200(1):1-11.

-
- 23 Kroger A, Koster M, Schroeder K, et al. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 2002 Jan;22(1):5-14.
- 24 Namiki S, Nakamura T, Oshima S, et al. IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett* 2005 May 23;579(13):2781-7.
- 25 Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 1975 Jul 3;256(5512):50-2.
- 26 Janeway C.A., Travers P. *Immunology*. Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- 27 Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, et al. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 2005 Oct;207:145-57.
- 28 Blanchard N, Shastri N. Coping with loss of perfection in the MHC class I peptide repertoire. *Curr Opin Immunol* 2008 Feb;20(1):82-8.
- 29 Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 2009 Oct 15;64(1):93-109.
- 30 Shatz CJ. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 2009 Oct 15;64(1):40-5.
- 31 Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973 Nov 9;62(1):1-35.
- 32 Couillard-Despres S, Winkler J, Uyanik G, et al. Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? *Curr Mol Med* 2001 Dec;1(6):677-88.
- 33 Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 2008 Jan;331(1):243-50.
- 34 Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2001 Apr;2(4):287-93.
- 35 Neumeister B, Grabosch A, Basak O, et al. Neural progenitors of the postnatal and adult mouse forebrain retain the ability to self-replicate, form

neurospheres, and undergo multipotent differentiation in vivo. *Stem Cells* 2009 Mar;27(3):714-23.

36 Upadhyya SC, Ding L, Smith TK, et al. Differential regulation of proteasome activity in the nucleus and the synaptic terminals. *Neurochem Int* 2006 Mar;48(4):296-305.

37 Yi JJ, Ehlers MD. Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron* 2005 Sep 1;47(5):629-32.

38 Cajigas IJ, Will T, Schuman EM. Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J* 2010 Aug 18;29(16):2746-52.

39 Groves P.M., Rebec G.V. *Introduction to Biological Psychology*. Wm C. Brown Publishers, 1988.

40 Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, et al. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta* 2004 Mar 23;1662(1-2):113-37.

41 Fatt P, Katz B. The effect of sodium ions on neuromuscular transmission. *J Physiol* 1952 Sep;118(1):73-87.

42 Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 1997 Jan 20;185(2):305-16.

43 Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, et al. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci* 2001 Dec;14(11):1820-6.

44 Bingol B, Schuman EM. Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* 2006 Jun 29;441(7097):1144-8.

45 Ehlers MD. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 2003 Mar;6(3):231-42.

- 46 Patrick GN. Synapse formation and plasticity: recent insights from the perspective of the ubiquitin proteasome system. *Curr Opin Neurobiol* 2006 Feb;16(1):90-4.
- 47 Djakovic SN, Schwarz LA, Barylko B, et al. Regulation of the proteasome by neuronal activity and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 2009 Sep 25;284(39):26655-65.
- 48 Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE. Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 2006 Nov 1;26(44):11333-41.
- 49 Patrick GN, Bingol B, Weld HA, et al. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* 2003 Dec 2;13(23):2073-81.
- 50 Mehler MF. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol* 2008 Dec 11;86(4):305-41.
- 51 Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999 Apr;9(2):158-63.
- 52 Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000 Oct;9(16):2395-402.
- 53 Naveh-Many T, Cedar H. Active gene sequences are undermethylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Jul;78(7):4246-50.
- 54 Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 15;90(24):11995-9.
- 55 Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003 Mar;33 Suppl:245-54.
- 56 Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 2001 Dec;1(6):749-58.

- 57 Razin A, Kafri T. DNA methylation from embryo to adult. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1994;48:53-81.
- 58 Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006 Feb;31(2):89-97.
- 59 Xu F, Mao C, Ding Y, et al. Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem* 2010;17(33):4052-71.
- 60 Sharma S, De Carvalho DD, Jeong S, et al. Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLoS Genet* 2011;7(2):e1001286.
- 61 Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999 Oct 29;99(3):247-57.
- 62 Riccio A. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nat Neurosci* 2010 Nov;13(11):1330-7.
- 63 Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992 Jun 12;69(6):915-26.
- 64 Feng J, Zhou Y, Campbell SL, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 2010 Apr;13(4):423-30.
- 65 Fatemi M, Wade PA. MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J Cell Sci* 2006 Aug 1;119(Pt 15):3033-7.
- 66 Hendrich B, Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:55-74.
- 67 Koch C, Stratling WH. DNA binding of methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human MCF7 cells. *Biochemistry* 2004 May 4;43(17):5011-21.

-
- 68 Yu F, Thiesen J, Stratling WH. Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 2000 May 15;28(10):2201-6.
- 69 Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 2004 Aug 27;15(4):595-605.
- 70 Feng J, Chang H, Li E, et al. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res* 2005 Mar 15;79(6):734-46.
- 71 Watanabe D, Uchiyama K, Hanaoka K. Transition of mouse de novo methyltransferases expression from Dnmt3b to Dnmt3a during neural progenitor cell development. *Neuroscience* 2006 Oct 27;142(3):727-37.
- 72 Fan G, Beard C, Chen RZ, et al. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J Neurosci* 2001 Feb 1;21(3):788-97.
- 73 Feng J, Fan G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol* 2009;89:67-84.
- 74 Martinowich K, Hattori D, Wu H, et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 2003 Oct 31;302(5646):890-3.
- 75 Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 2001 Sep 1;21(17):6706-17.
- 76 Setoguchi H, Namihira M, Kohyama J, et al. Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res* 2006 Oct;84(5):969-79.

- 77 Kohyama J, Kojima T, Takatsuka E, et al. Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Nov 18;105(46):18012-7.
- 78 Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 1998 Jun;4(3):93-8.
- 79 Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998 Feb;4(1):12-5.
- 80 Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, et al. Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1995 Jan;37(1):82-8.
- 81 Scotet E, Peyrat MA, Saulquin X, et al. Frequent enrichment for CD8 T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions: towards a reassessment of the physiopathological significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur J Immunol* 1999 Mar;29(3):973-85.
- 82 Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000 Aug 7;192(3):393-404.
- 83 Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998 Jan 29;338(5):278-85.
- 84 Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, et al. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 2002 Mar;125(Pt 3):551-61.
- 85 Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* 2007;2(7):e664.
- 86 Mishto M, Bellavista E, Ligorio C, et al. Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population. *PLoS One* 2010;5(2):e9287.

- 87 Wekerle H. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Acta Neurol (Napoli)* 1991 Apr;13(2):197-204.
- 88 Gold SM, Heesen C. Stress and disease progression in multiple sclerosis and its animal models. *Neuroimmunomodulation* 2006;13(5-6):318-26.
- 89 Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006 Jul;60(1):12-21.
- 90 Sun D, Whitaker JN, Huang Z, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2001 Jun 15;166(12):7579-87.
- 91 Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006 Apr;27(2-3):95-125.
- 92 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- 93 Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 2007;8 Suppl 1:S3.
- 94 Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 2009 Jul;15(7):781-7.
- 95 Kremer M, Henn A, Kolb C, et al. Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *J Immunol* 2010 Nov 1;185(9):5549-60.
- 96 Kincaid EZ, Che JW, York I, et al. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol* 2011 Dec 25.
- 97 Stohwasser R, Giesebrecht J, Kraft R, et al. Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia* 2000 Feb 15;29(4):355-65.

- 98 Lee SH, Sheng M. Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol* 2000 Feb;10(1):125-31.
- 99 Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, et al. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jun 28;102(26):9241-6.
- 100 MacDonald JL, Roskams AJ. Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol* 2009 Jul;88(3):170-83.
- 101 Wu H, Sun YE. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res* 2006 Apr;59(4 Pt 2):21R-5R.
- 102 Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002 Aug 12;21(35):5483-95.
- 103 Zhao X, Ueba T, Christie BR, et al. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 May 27;100(11):6777-82.
- 104 Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, et al. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 1995 Jul 28;269(5223):549-52.
- 105 Fehling HJ, Swat W, Laplace C, et al. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 1994 Aug 26;265(5176):1234-7.
- 106 Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003;4(3):207.
- 107 Delgado JY, Coba M, Anderson CN, et al. NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840. *J Neurosci* 2007 Nov 28;27(48):13210-21.
- 108 Watanabe Y, Suzuki O, Haruyama T, et al. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem* 2003 May 15;89(2):244-53.

- 109 Frausto RF, Crocker SJ, Eam B, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental allergic encephalomyelitis and T cell responses are unaffected by immunoproteasome deficiency. *J Neuroimmunol* 2007 Dec;192(1-2):124-33.
- 110 Fissolo N, Kraus M, Reich M, et al. Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation. *Eur J Immunol* 2008 Sep;38(9):2401-11.
- 111 Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004 Nov 1;173(9):5794-800.
- 112 Escoubet-Lozach L, Benner C, Kaikkonen MU, et al. Mechanisms Establishing TLR4-Responsive Activation States of Inflammatory Response Genes. *PLoS Genet* 2011 Dec;7(12):e1002401.
- 113 Manning J, Indrova M, Lubyova B, et al. Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 2008 Feb;123(2):218-27.
- 114 Li X, Barkho BZ, Luo Y, et al. Epigenetic regulation of the stem cell mitogen Fgf-2 by Mbd1 in adult neural stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 2008 Oct 10;283(41):27644-52.
- 115 Werner S, Unsicker K, von Bohlen und HO. Fibroblast growth factor-2 deficiency causes defects in adult hippocampal neurogenesis, which are not rescued by exogenous fibroblast growth factor-2. *J Neurosci Res* 2011 Oct;89(10):1605-17.
- 116 Clouaire T, de Las Heras JI, Merusi C, et al. Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 2010 Aug;38(14):4620-34.
- 117 McGough JM, Yang D, Huang S, et al. DNA methylation represses IFN-gamma-induced and signal transducer and activator of transcription 1-mediated IFN

regulatory factor 8 activation in colon carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2008 Dec;6(12):1841-51.

118 Miralves J, Magdeleine E, Kaddoum L, et al. High levels of MeCP2 depress MHC class I expression in neuronal cells. *PLoS One* 2007;2(12):e1354.

119 Fan G, Martinowich K, Chin MH, et al. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 2005 Aug;132(15):3345-56.

120 Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, et al. Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 2003 Dec 17;23(37):11653-61.

121 Southwell AL, Patterson PH. Gene therapy in mouse models of huntington disease. *Neuroscientist* 2011 Apr;17(2):153-62.

122 Galimberti D, Scarpini E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:252-66.

123 Mishto M, Bellavista E, Santoro A, et al. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 2006 Jan;27(1):54-66.

124 Nijholt DA, de Graaf TR, van Haastert ES, et al. Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 2011 Jun;18(6):1071-81.

125 Nguyen TP, Soukup VM, Gelman BB. Persistent hijacking of brain proteasomes in HIV-associated dementia. *Am J Pathol* 2010 Feb;176(2):893-902.

126 Siele D, Janek K, Jungblut K.R., et al. Molecular properties of proteasomes in cerebral astrocytes and an astrocytic cell line. 2012.

127 Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, et al. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem* 2004 Jul 9;279(28):29341-50.

- 128 Craner MJ, Damarjian TG, Liu S, et al. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* 2005 Jan 15;49(2):220-9.
- 129 Black JA, Newcombe J, Waxman SG. Astrocytes within multiple sclerosis lesions upregulate sodium channel Nav1.5. *Brain* 2010 Mar;133(Pt 3):835-46.
- 130 Schonfeld-Dado E, Fishbein I, Segal M. Degeneration of cultured cortical neurons following prolonged inactivation: molecular mechanisms. *J Neurochem* 2009 Aug;110(4):1203-13.
- 131 West AE, Greenberg ME. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 Jun;3(6).
- 132 Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci* 2008 Jan 9;28(2):395-406.
- 133 Ma DK, Jang MH, Guo JU, et al. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009 Feb 20;323(5917):1074-7.
- 134 Guo JU, Ma DK, Mo H, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 2011 Oct;14(10):1345-51.
- 135 Kitamura C, Takahashi M, Kondoh Y, et al. Identification of synaptic activity-dependent genes by exposure of cultured cortical neurons to tetrodotoxin followed by its withdrawal. *J Neurosci Res* 2007 Aug 15;85(11):2385-99.
- 136 Raghavendra Prasad HS, Qi Z, Srinivasan KN, et al. Potential effects of tetrodotoxin exposure to human glial cells postulated using microarray approach. *Toxicol* 2004 Nov;44(6):597-608.
- 137 Lee S, Kim W, Ham BJ, et al. Activity-dependent NR2B expression is mediated by MeCP2-dependent epigenetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Dec 19;377(3):930-4.

- 138 Cai F, Frey JU, Sanna PP, et al. Protein degradation by the proteasome is required for synaptic tagging and the heterosynaptic stabilization of hippocampal late-phase long-term potentiation. *Neuroscience* 2010 Sep 15;169(4):1520-6.
- 139 Bett JS, Cook C, Petrucelli L, et al. The Ubiquitin-Proteasome Reporter GFPu Does Not Accumulate in Neurons of the R6/2 Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Plos One* 2009 Apr 8;4(4).
- 140 Neumann H, Boucraut J, Hahnel C, et al. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci* 1996 Dec;8(12):2582-90.
- 141 Medana I, Martinic MA, Wekerle H, et al. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001 Sep;159(3):809-15.
- 142 Wu ZP, Washburn L, Bilousova TV, et al. Enhanced neuronal expression of major histocompatibility complex class I leads to aberrations in neurodevelopment and neurorepair. *J Neuroimmunol* 2011 Mar;232(1-2):8-16.
- 143 Opitz E, Koch A, Klingel K, et al. Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *PLoS Pathog* 2011 Sep;7(9):e1002233.
- 144 Hensley SE, Zanker D, Dolan BP, et al. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J Immunol* 2010 Apr 15;184(8):4115-22.
- 145 Kwak Y, Lundkvist GB, Brask J, et al. Interferon-gamma alters electrical activity and clock gene expression in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Biol Rhythms* 2008 Apr;23(2):150-9.
- 146 Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, et al. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 1998 Nov;21(5):1151-62.
- 147 Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 2008 Jul;88(3):983-1008.

148 Citri A, Soler-Llavina G, Bhattacharyya S, et al. N-methyl-D-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Neurosci* 2009 Oct;30(8):1443-50.

149 Griffin R, Nally R, Nolan Y, et al. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *J Neurochem* 2006 Nov;99(4):1263-72.

150 Mishto M, Ligorio C, Bellavista E, et al. Immunoproteasome expression is induced in mesial temporal lobe epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Apr 29;408(1):65-70.

Abkürzungen

5-Aza	5-aza-2-Deoxycytidin/5-Azacytidin
ACSF	synthetischer Cerebraler Liquor engl: <i>artificial cerebral spinal fluid</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BDNF	engl: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
β2M	beta-2-Mikroglobulin
CTL	zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten
Ctx	Cortex
diff.	differenziert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: <i>-acid</i>)
DRiPs	defekte ribosomale Produkte
DZ	dendritische Zellen
E17	embryonaler Tag 17
ECGC	Epigallocatechin-3-Gallat
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor (engl: <i>-growth factor</i>)
ERAAP	ER-Aminopeptidase assoziiert mit Antigen-Prozessierung
ER	endoplasmatischer Retikulum
bFGF	basaler Fibroblastenwachstumsfaktor
FKS	Fötale Kälberserum
Fw	engl: <i>forward</i>

GAF	Gamma-Interferon-aktivierender Faktor
GAS	Gamma-Interferon-aktivierende Sequenz
GD	Gyrus Dentatus
GFAP	engl: <i>Glial fibrillary acidic protein</i> , Marker für Astrozyten
HC	Hippocampus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Iba1	ionisiertes Calcium-bindendes Adapter Molekül 1
IFN γ	Interferon gamma
iP	Immunoproteasom
IRF-E	Interferon-regulierender Faktor - Element
IRF1	Interferon-regulierender Faktor 1
ISRE	Interferon-stimulierendes Response-Element
LIF	leukämisch-inhibierender Faktor
LMP	engl: <i>low molecular protein</i>
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
Map2	Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2, Marker für Neuronen
MEA-Chip	Multi-Elektroden Array Chip
Mecl 1	engl: <i>multicatalytic endopeptidase complex-like 1</i>
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I engl: <i>major histocompatibility complex class I</i>
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
MS	Multiple Sklerose

NeuN	nukleäres Neuronenprotein
NF- κ B	Nukleärer Faktor – kappa Beta
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSZ	neurale Stammzellen
NVZ	neurale Vorläuferzellen
P1	postnataler Tag 1
PLP	Proteolipid-Protein
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSD-95	Postsynaptisches Dichteprotein 95
RNA	Ribonukleinsäure (engl: <i>-acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	engl: <i>rounds per minute</i>
Rv	engl: <i>reverse</i>
SGZ	Subgranuläre Zone
SVZ	Subventrikuläre Zone
TAP	Transporter assoziiert mit Antigen Präsentation
TNF α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
Tuj1	β -III-Tubulin, Marker für Neuronen
TTX	Tetrodotoxin
UE	Untereinheiten
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationen

Prozorovski, T., U. Schulze-Topphoff, R. Glumm, J. Baumgart, F. Schröter, O. Ninnemann, E. E. Siegert, I. Bendix, O. Brustle, R. Nitsch, F. Zipp and O. Aktas, Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors, *Nat. Cell Biol.*, 10(4), 385-394, 2008.

Schulze-Topphoff U, A. Prat, T. Prozorovski, V. Siffrin, M. Paterka, J. Herz, I. Bendix, I. Ifergan, I. Schadock, M.A. Mori, J. Van Horssen, F. Schröter, A. Smorodchenko, M.H. Han, M. Bader, L. Steinman, O. Aktas, F. Zipp. Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system, *Nat. Med.* 15(7), 788-93, 2009.

Seifert, U., L. P. Bialy, F. Ebstein, D. Bech-Otschir, A. Voigt, F. Schröter, T. Prozorovski, N. Lange, J. Steffen, M. Rieger, U. Kuckelkorn, O. Aktas, P. M. Kloetzel and E. Kruger, Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress, *Cell*, 142(4), 613-624, 2010.

Manuskript in Vorbereitung:

Schröter F., T. Prozorovski, A. Chepkova, J.M. Klose, B. Dahlmann, E. Kruger, H.P. Hartung, O. Seergeva, P.M. Kloetzel and O. Aktas, Activity-dependent expression of immunoproteasome subunit LMP7 in neuronal cells.

Konferenzbeiträge

- 2008 Liebenwalde, Germany: Berlin Neuroscience Forum:
“Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors”
(Poster)
- 2011 a) Essen, Germany: Stammzellenkonferenz 6th International Meeting:
“SIRT1 regulates neural stem cell homeostasis and plays a role in response to
cellular stress” (Poster)
- b) Riccione, Italy: German Society for Immunology (DGfI) & the Italian Society for
Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA), Joint Annual Meeting:
“An antigen presentation-independent role of the immunoproteasome subunit
LMP7 in dendritic cell function” (Poster)
- c) Prag, Czech Republic: 10th European Meeting on Glial Cells in Health and
Disease: “Role of SIRT1 in oligodendrocytes progenitors in autoimmune
neuroinflammation”(Poster)
- d) Bergisch-Gladbach, Germany: Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
(BMFZ) -Meeting 2011: „The inducible proteasome in neurons under normal and
pathological conditions” (Vortrag)
- e) Amsterdam, Netherlands: 5th Joint Triennial Congress of European and
Americas Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis
(EctriMS & ActriMS):
- 1) “Effect of immunoproteasome on neurological and immunological parameters
in the course of autoimmune disease” (Poster)
 - 2) “Characterisation of SIRT1 expression in the course of autoimmune
demyelination” (Poster)

Danksagung

An erster Stelle sei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kloetzel, herzlichst gedankt für die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Institut anzufertigen und für die Betreuung der thematischen Fragestellung. Vor allem durch seine kritische Betrachtung meiner Arbeit brachte er mich des Öfteren auf einen neuen Weg. Für seinen dauerhaften Einsatz für den Monographie-Antrag bin ich unendlich dankbar.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dahlmann, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir in manchen kritischen Diskussionen neue Wege aufzeigte.

Ebenso sei Prof. Dr. Aktas gedankt, der mir die Möglichkeit gab, dieses interessante Arbeitsgebiet kennen zu lernen und bei den auftretenden Problemen hinter mir stand. Auch der Arbeitsgruppe ‚Aktas‘ (wirklich allen) gilt mein besonderer Dank für die freundlichen Aufnahme und die tatkräftige Diskussions-Bereitschaft mit diesem schweren Thema („Schwarzbrot“ – nicht schon wieder!). Ohne die aufmunternde Art von Tim wäre diese Arbeit niemals vollendet worden. Ein herzliches Dankeschön geht an Jasmin, die mir tatkräftig zur Seite stand und mich unterstützte. Carsten und Reiner bin ich für ihre Unterstützung im sprachlichen Feld sehr dankbar.

Auch Prof. Dr. Sergeeva in Düsseldorf darf meiner Dankesliste nicht vergessen werden. Ohne die Kooperation der beiden Arbeitsgruppen (AG Aktas und AG Sergeeva) wären die Daten dieser Arbeit nicht vollkommen.

Einen weiteren Dank erhält Frederic Ebstein, der mich auf den Gedanken der Methylierung gebracht hat.

Elisa ohne Dich wäre alles anders und unsere gegenseitige Unterstützung in dieser Phase unseres Lebens bleibt unvergesslich!

All meinen Freunden (besonders René, Alice und Mel) und meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den notwendigen Halt, der während solch einer Arbeit nicht zu unterschätzen ist.

Erklärung

Ich, Friederike Schröter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ‚Das induzierbare Ubiquitin-Proteasom System in Neuronen unter pro-inflammatorischen Bedingungen‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 31. Mai 2012

Friederike Schröter