

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Auswirkungen einer Defizienz der  
proteasomalen Untereinheit  $\beta 5$ /LMP7 auf die Funktion von  
Monozyten und Makrophagen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Max Pöttsch

aus Halle an der Saale

Datum der Promotion: 18.09.2020

## **Vorwort:**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Hewing B, Ludwig A, Dan C, **Pöttsch M**, Hannemann C, Petry A, Lauer D, Görlach A, Kaschina E, Müller DN, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Wilck N. Immunoproteasome subunit  $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis. *Scientific Reports*. 2017;7:13342.

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis..... III

Abbildungsverzeichnis ..... VI

Tabellenverzeichnis.....VII

Abkürzungsverzeichnis ..... VIII

Zusammenfassung ..... XI

Abstract .....XII

1 Einleitung..... - 1 -

    1.1 Die Atherosklerose ..... - 1 -

        1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren ..... - 1 -

        1.1.2 Die Pathogenese der Atherosklerose ..... - 1 -

        1.1.3 Makrophagenheterogenität in der Atherosklerose ..... - 2 -

    1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System ..... - 3 -

        1.2.1 Die Ubiquitinierung ..... - 4 -

        1.2.2 Das Proteasom ..... - 5 -

        1.2.3 Die Proteasomenheterogenität und das Immunoproteasom..... - 7 -

        1.2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Atherosklerose ..... - 8 -

    1.3 Herleitung der Fragestellung ..... - 10 -

2 Material und Methoden ..... - 12 -

    2.1 Geräte und Reagenzien..... - 12 -

        2.1.1 Geräte..... - 12 -

        2.1.2 Allgemeine Materialien ..... - 13 -

        2.1.3 Reagenzien..... - 14 -

        2.1.4 Zellkulturmedium ..... - 14 -

        2.1.5 Puffer ..... - 15 -

        2.1.6 Kits..... - 17 -

        2.1.7 Zytokine ..... - 17 -

        2.1.8 Antikörper ..... - 18 -

2.2 Zellkultur .....	- 20 -
2.2.1 Herstellung L929 Medium.....	- 20 -
2.2.2 Isolation der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) .....	- 20 -
2.2.3 Zellkultur von Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) .....	- 21 -
2.2.4 Makrophagenpolarisation .....	- 22 -
2.2.5 Untersuchungen zur Zellviabilität .....	- 22 -
2.3 Proteinspezifische Biochemische Methoden.....	- 22 -
2.3.1 Denaturierende Proteinextraktion .....	- 22 -
2.3.2 Native Proteinextraktion .....	- 23 -
2.3.3 Proteinvermessung.....	- 23 -
2.3.4 Western Blot .....	- 23 -
2.3.5 Native PAGE .....	- 25 -
2.3.6 Messung der Proteasomaktivität.....	- 26 -
2.3.7 Densitometrische Auswertung der Western Blots .....	- 27 -
2.4 Methoden zur Quantifizierung von messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA).....	- 28 -
2.4.1 RNA Isolierung.....	- 28 -
2.4.2 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) -Erststrangsynthese .....	- 28 -
2.4.3 Quantitative Real Time PCR (TaqMan®) .....	- 29 -
2.5 Durchflusszytometrie .....	- 29 -
2.6 Statistik.....	- 31 -
3 Ergebnisse.....	- 32 -
3.1 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von Makrophagen.....	- 32 -
3.2 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Makrophagenpolarisation.....	- 34 -
3.3 Einfluss der LMP7-Defizienz auf den Umgang von Makrophagen mit oxidativem Stress .....	- 36 -
3.3.1 Zellüberleben von LMP7-defizienten BMDM unter oxidativem Stress .....	- 36 -
3.3.2 Evaluation einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen in LMP7-defizienten BMDM .....	- 37 -

3.4 Die Zusammensetzung des 20S Kernkomplexes in LMP7-defizienten Makrophagen.....	- 41 -
3.4.1 mRNA Expression proteasomaler Untereinheiten in LMP7-defizienten Makrophagen .....	- 41 -
3.4.2 Konfiguration des 26S Proteasoms in LMP7-defizienten Makrophagen .....	- 42 -
3.5 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität von Makrophagen..	- 44 -
4 Diskussion .....	- 46 -
4.1 LMP7-defizientes Mausmodell und LMP7-defiziente Makrophagen.....	- 46 -
4.1.1 Besonderheiten des LMP7-defizienten Mausmodells .....	- 46 -
4.1.2 Besonderheiten der LMP7-defizienten BMDM .....	- 47 -
4.2 Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf die Funktion von Makrophagen.....	- 48 -
4.2.1 Auswirkung der LMP7-Defizienz auf die BMDM Reifung.....	- 48 -
4.2.2 Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Makrophagenpolarisation.....	- 49 -
4.3 Effekt der LMP7-Defizienz auf den Umgang der Makrophagen mit oxidativem Stress .....	- 50 -
4.4 Zusammensetzung des 20S Proteasoms bei LMP7-Defizienz in Makrophagen.....	- 52 -
4.4.1 Transkription der proteasomalen Untereinheiten .....	- 52 -
4.4.2 Translation und Assemblierung der katalytischen Untereinheiten .....	- 53 -
4.5 Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität der Proteasomen in Makrophagen .....	- 54 -
4.6 Fazit.....	- 55 -
4.7 Zukünftige Studien mit LMP7-selektiven Proteasominhibitoren .....	- 56 -
Literaturverzeichnis.....	XIII
Eidesstattliche Versicherung .....	XVIII
Lebenslauf .....	XX
Danksagung.....	XXI

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Schematische Übersicht über die Ubiquitinierungskaskade	- 4 -
Abb. 2	Schematische Zeichnung eines 26S Proteasoms	- 6 -
Abb. 3	Versuchsaufbau zur Polarisation der BMDM	- 22 -
Abb. 4	Schematischer Aufbau der Blotkammer	- 24 -
Abb. 5	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von murinen BMDM	- 32 -
Abb. 6	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von murinen BMDM	- 33 -
Abb. 7	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Polarisation von murinen BMDM	- 35 -
Abb. 8	Einfluss der LMP7-Defizienz auf das Überleben muriner BMDM unter Behandlung mit steigenden H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen	- 36 -
Abb. 9	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Akkumulation poly-ubiquitinerter Proteine in murinen BMDM unter IFN- $\gamma$ Stimulation	- 38 -
Abb. 10	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Anhäufung poly-ubiquitinerter Proteine in murinen BMDM unter einstündiger Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- 40 -
Abb. 11	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die mRNA-Expression proteasomaler Untereinheiten in murinen BMDM	- 41 -
Abb. 12	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Zusammensetzung des Proteasoms in murinen BMDM	- 42 -
Abb. 13	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität des Proteasoms in murinen BMDM	- 45 -
Abb.14	Mögliches Studiendesign zur weiteren Erforschung der Rolle der LMP7 Untereinheit auf die Pathogenese der Atherosklerose in vivo und in vitro	- 58 -

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geräte .....	- 12 -
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	- 13 -
Tabelle 3: Reagenzien .....	- 14 -
Tabelle 4: Zusammensetzung Zellkulturmedium.....	- 14 -
Tabelle 5: Puffer.....	- 15 -
Tabelle 6: Kits .....	- 17 -
Tabelle 7: Zytokine .....	- 17 -
Tabelle 8: Antikörper Durchflusszytometrie.....	- 18 -
Tabelle 9: Primär- und Sekundärantikörper .....	- 19 -

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	vollständiger Name
ALIS	Aggresome-like induced structures
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärts gestreutes Licht
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IEL	Internal Elastic Layer
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
IP	Immunoproteasom
LDL	Low-Density Lipoprotein

LDL-R	Low-Density Lipoprotein Rezeptor
LMP2	Low Molecular Mass Protein 2
LMP7	Low Molecular Mass Protein 7
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MECL-1	Multicatalytic Endopeptidase Complex Like 1
MHC-I	Major Histocompatibility Complex-Class I
mRNA	messenger Ribonukleinsäuren
NO	Stickstoffmonoxid
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phycoerythrin
Poly-Ub	Polyubiquitiniert
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RPMI	Roswell Memorial Park Institute
SOD-1	Superoxid-Dismutase-1
SSC	Seitwärts gestreutes Licht
Suc-LLVY-MCA	Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UE	Untereinheit
UB	Ubiquitin

VCAM-1	Vascular Cell Adhaesion Molecule-1
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

## Zusammenfassung

Klinische Manifestationen der Atherosklerose (z.B. Myokardinfarkt, Schlaganfall) stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäße an deren Pathogenese u.a. eine Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand und eine Dysregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems mit gestörter Proteinhomöostase beteiligt sind. Makrophagen exprimieren als Proteasom-Subtyp hauptsächlich Immunproteasom mit der katalytischen LMP7-Untereinheit. Der LMP7-Untereinheit werden eine besondere Rolle bei der Elimination beschädigter Proteine unter oxidativem Stress, sowie ein Einfluss auf inflammatorische Prozesse zugeordnet. Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Auswirkungen einer LMP7-Defizienz in murinen Makrophagen auf Atherosklerose-assoziierte Prozesse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine LMP7-Defizienz keinen relevanten Einfluss auf die Reifung und Polarisation von Makrophagen hat. Eine vermehrte Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen oder ein vermindertes Zellüberleben unter oxidativem oder inflammatorischen Stress konnte in den LMP7-defizienten Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des 26S Proteasoms in Makrophagen verändert ist. In der Messung der proteolytischen Aktivität der LMP7-defizienten Makrophagen konnten, hinsichtlich der Chymotrypsin-ähnlichen, Trypsin-ähnlichen, und Caspase-ähnlichen-Aktivität, keine Unterschiede zu LMP7-suffizienten Makrophagen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Defizienz der LMP7-Untereinheit keine nachteiligen Auswirkungen auf relevante, mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziierten, Funktionen von Makrophagen hat. Durch den Einbau der  $\beta 5$ -Untereinheit in konstitutives Proteasom und Intermediärproteasom, bleibt die proteolytische Aktivität der LMP7-defizienten Makrophagen erhalten. Eine von vorausgehenden Studien postulierte Schlüsselrolle der LMP7-Untereinheit für die Proteinhomöostase unter oxidativem Stress konnte im Modell der genetischen LMP7-Defizienz für Makrophagen nicht bestätigt werden.

## Abstract

Clinical manifestations of atherosclerosis (i.e. myocardial infarction or stroke) are the most common cause of death worldwide. Atherosclerosis represents a chronic inflammatory disease of the arterial wall. Its pathogenesis comprises an accumulation of macrophages in the arterial wall and an impairment of the UPS. Macrophages mainly express immunoproteasome, a subtype with LMP7 as a catalytic subunit. The LMP7 subunit is involved in the regulation of inflammatory processes, however, the exact role of the LMP7 subunit is still under investigation. Recent studies highlighted the importance of the LMP7 subunit for protein homeostasis under cytokine induced oxidative stress. By using a LMP7 deficient model, the present work aimed to investigate the impact of LMP7-deficiency on atherosclerosis associated processes in murine macrophages.

The *in vitro* maturation and polarization of macrophages was not affected by LMP7-deficiency. There was no accumulation of poly-ubiquitinated proteins or differences in cell viability after hydrogen peroxide treatment and IFN- $\gamma$  stimulation detectable between LMP7-deficient and LMP7-sufficient macrophages. LMP7-deficiency in macrophages led to an incorporation of the corresponding  $\beta 5$  subunit into a pool of proteasomes consisting of constitutive proteasomes and intermediate proteasomes. However, substrate turnover for chymotrypsin-like, caspase-like and trypsin-like activity in this pool of proteasomes in LMP7-deficient macrophages was similar to LMP7-sufficient macrophages.

In conclusion, the results show that LMP7-deficiency in macrophages has no major impact on important atherosclerosis-related processes. In LMP7-deficient macrophages incorporation of the corresponding  $\beta 5$  subunit into a pool of constitutive and intermediate proteasomes seems to preserve proteolytic activity. Taken together, these findings do not support the hypothesis that LMP7-deficiency alters protein homeostasis in cytokine induced oxidative stress.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Atherosklerose

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Insbesondere der akute Myokardinfarkt und der Schlaganfall führen zu den meisten Todesfällen, die durch CVD verursacht werden. Jährlich sterben weltweit ca. 16,7 Millionen Menschen an CVD.(1, 2) Dies entspricht etwa 30% aller Todesfälle.(3) Diese Zahl wird bis 2030 voraussichtlich auf 23,3 Millionen steigen.(4) Somit werden CVD auch weiterhin die weltweit häufigste Todesursache bleiben.(4) Ursächliche Pathologie der CVD ist die Atherosklerose. Die Atherosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess der arteriellen Gefäßwand.(5) Sie verläuft zunächst klinisch stumm und wird meist erst bei fluiddynamisch relevanter Einengung des Gefäßinnendurchmessers oder im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms symptomatisch. Neben nicht modifizierbaren Risikofaktoren wie z.B. Alter und Geschlecht konnten für die Entwicklung der Atherosklerose folgende modifizierbare Risikofaktoren nachgewiesen werden: Arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, ein erhöhter Low-Density-Lipoprotein (LDL) / High-Density-Lipoprotein (HDL) Quotient, Übergewicht, Diabetes Mellitus und Bewegungsmangel.(6) Häufig treten diese modifizierbaren Risikofaktoren in Kombination auf, wie z.B. beim metabolischen Syndrom.

### 1.1.2 Die Pathogenese der Atherosklerose

Bereits kurz nach der Einführung des Begriffes „Arteriosclerosis“ durch Jean Lobstein 1829 wurden Theorien über die zugrunde liegenden Pathophysiologien aufgestellt. So postulierte Rudolf Virchow bereits Mitte des 19. Jahrhunderts, dass die Atherosklerose eine primär inflammatorische Erkrankung der großen und mittleren Arterien sei. Allerdings hielt sich bis Ende des 20. Jahrhunderts das Dogma einer passiven Akkumulierung von Lipiden in der Gefäßwand.(7) Dies änderte sich ab 1977 als *Ross et al.* die „response to injury“-Hypothese beschrieben (5, 8, 9), bei der davon ausgegangen wird, dass die Atherosklerose durch eine Verletzung des vaskulären Endothels hervorgerufen wird. Mit der, aus der Verletzung resultierenden, endothelialen Dysfunktion geht ein Barriereverlust einher. Dadurch können im Blut zirkulierende Lipoproteine die Intima (Innenschicht der Gefäßwand) infiltrieren. Prädilektionsstellen hierfür sind insbesondere Aufzweigungen von Arterien, an denen sowohl der laminare Blutfluss als auch die Durchgängigkeit der elastinhaltigen hydrophoben Lamina Interna gestört ist. Dies führt zu einer vermehrten Retention von LDL-Partikeln in der Intima durch die hier freiliegenden Proteoglykane und Kollagene.(10) Die verminderte Produktion von

Stickstoffmonoxid (NO) durch das dysfunktionale Endothel resultiert in der vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen auf der subendothelialen Seite, da NO als Radikalfänger wirkt.(11) Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren mit dem subendothelial retinierten LDL und oxidieren es. Oxidiertes LDL bewirkt als inflammatorischer Stimulus u.a. eine Expression von Leukozytenadhäsions- und -migrationsproteinen durch Endothelzellen (wie z.B. E-Selectin, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)). Dadurch kommt es zur vermehrten Infiltration von im Blut zirkulierenden Immunzellen, insbesondere von Monozyten und T-Lymphozyten. Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich aufgrund inflammatorischer Stimuli und des von Endothelzellen produzierten Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) zu Makrophagen.(12) Dieser Prozess wird durch die zusätzliche Produktion von M-CSF von bereits ausdifferenzierten Makrophagen amplifiziert. Die Makrophagen phagozytieren über Scavenger-Rezeptoren das oxidierte LDL. Durch die Akkumulation von phagozytierten LDL-Partikeln werden die Makrophagen zu Schaumzellen. Dieses frühe Plaquestadium wird als „Fatty Streak“ bezeichnet.(12) Gehen die Schaumzellen sowie andere Zellen aufgrund übermäßiger Cholesterinaufnahme in Apoptose, bleiben Zellüberreste und Cholesterinkristalle zurück. Dadurch kann ein sogenannter nekrotischer Kern entstehen.(13) Parallel wandern Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC) aus der Tunica Media in die Intima ein. Diese glatten Muskelzellen umschließen den nekrotischen Kern und produzieren extrazelluläre Matrixmoleküle in der Intima, vor allem Kollagen, Fibrinogen und Elastin. Diese Ummantelung des nekrotischen Kerns aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärmatrix wird als fibröse Kappe bezeichnet.(13) Durch von Makrophagen sezernierte Matrix-Metalloproteasen und der Apoptose von glatten Muskelzellen im inflammatorischen Milieu der Intima kann es im Verlauf der Atherosklerose zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe und somit zu instabilen Plaques kommen. (13) Rupturieren diese instabilen Plaques kommt es zu einem direkten Kontakt der Intima mit dem Gefäßlumen. Der Kontakt von Thrombozyten mit dem freiliegenden Kollagen aktiviert die Gerinnungskaskade, sodass ein Thrombus an der Gefäßwand entsteht. Der entstehende Thrombus führt zum Verschluss einer Arterie mit daraus resultierender Minderperfusion und Ischämie im Versorgungsgebiet peripher gelegener Stromgebiete.(5, 14)

### **1.1.3 Makrophagenheterogenität in der Atherosklerose**

Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose.(15) Man unterscheidet bei den Makrophagen verschiedene Subpopulationen.(16) Klassisch aktivierte M1-Makrophagen und alternativ aktivierte M2-Makrophagen.(17) Die als inflammatorisch

angesehenen M1-Makrophagen werden z.B. durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) aktiviert, ein inflammatorisches Zytokin, das *in vivo* von Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) sezerniert wird. Darüber hinaus erfolgt die Differenzierung zu M1-Makrophagen durch andere inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch Lipopolysaccharid (LPS) oder oxidiertes LDL.(12) Aktivierte M1-Makrophagen sezernieren inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 und TNF- $\alpha$ , produzieren vermehrt ROS und besitzen eine erhöhte Phagozytosekapazität.(18) Im Gegensatz dazu unterscheidet man die alternativ aktivierten Makrophagen (M2-Makrophagen). M2-Makrophagen werden durch anti-inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-4 (IL-4) aus Th2-Zellen aktiviert und sezernieren daraufhin Faktoren, die zur Bildung von Extrazellulärmatrix anregen. M2-Makrophagen fördern dadurch die Wundheilung. M2-Makrophagen reagieren auf die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. LPS und Interleukin-1, indem sie große Mengen an Interleukin-10 sezernieren, ein hochpotentes anti-inflammatorisches Zytokin, das überschießende Immunreaktionen verhindern kann.(19)

*In vivo* ist die Polarisierung zu verschiedenen Makrophagensubtypen vom Zytokinmilieu der unmittelbaren Umgebung abhängig.(20) In atherosklerotischen Plaques herrscht ein sich ständig änderndes und sehr heterogenes Milieu an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Lipiden und anderen Faktoren, die einen Einfluss auf die Differenzierung von Makrophagen haben können. Man findet sowohl M1- als auch M2-Subpopulationen in humanen und murinen atherosklerotischen Plaques.(20) Es konnte gezeigt werden, dass während der Atherogenese der Gehalt sowohl an M1- als auch an M2-Makrophagen in den Plaques zunimmt. Innerhalb der Plaques zeigt sich jedoch eine unterschiedliche Verteilung der Subpopulationen. In den instabilen Plaquebereichen, vor allem an den Schulterregionen von Plaques, lassen sich vermehrt M1-Makrophagen nachweisen. M2-Makrophagen finden sich hingegen vermehrt in der Adventitia.(21)

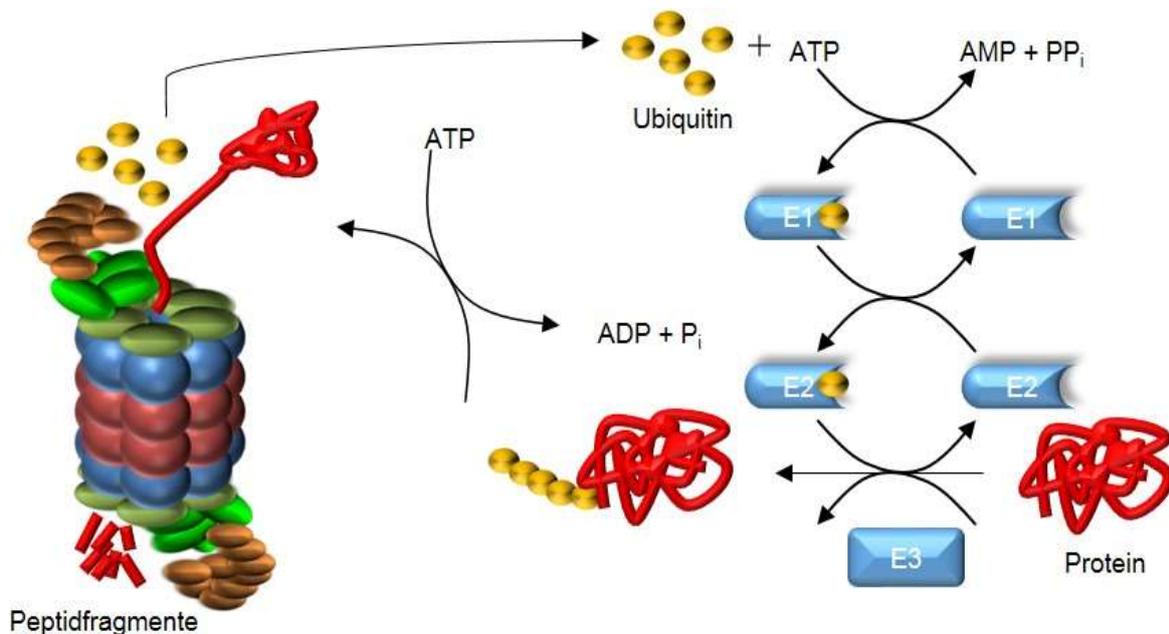
## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der intrazelluläre, selektive Abbau von Proteinen bei Eukaryoten erfolgt durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Dieses System ist von zentraler Bedeutung für die Proteinhomeostase jeder einzelnen Zelle. So werden nicht nur defekte oder fehlgefaltete Proteine abgebaut, sondern über den Abbau von Transkriptionsfaktoren, Zyklinen und Membranrezeptoren viele wichtige Prozesse in der Zelle beeinflusst.(22) Das UPS besteht aus zwei Komponenten: Zunächst wird in der Ubiquitinierungskaskade das Protein durch die Bindung von Ubiquitin für den Abbau markiert. Der Abbau des Proteins findet nachfolgend im

Proteasom statt. Das Proteasom kommt in allen eukaryotischen Zellen im Zytosol, Zellkern, sowie am endoplasmatischen Retikulum vor und macht etwa 1% des Gesamtzellproteins aus, wobei die Konzentration je nach Zelltyp variiert. Es spaltet die Proteine in kurze Peptide, die dann von zytoplasmatischen Exopeptidasen hydrolysiert werden.(23)

### 1.2.1 Die Ubiquitinierung

Die Markierung der Proteine für den proteasomalen Abbau erfolgt durch die kovalente Bindung des Proteins an Ubiquitin (Ub), ein 7,5kD großes Molekül bestehend aus 76 Aminosäuren (AS). Die Ubiquitinierungskaskade ist ATP-abhängig und beinhaltet drei Enzyme (E1-E3). Sie führt zur Bindung einer Polyubiquitinkette (poly-Ub) an das Protein.(24) Im ersten Schritt der Kaskade wird ein Glycinrest am C-terminalen Ende des Ub durch das Ubiquitin Activating Enzyme (E1) unter ATP-Verbrauch aktiviert und über eine Thiol-Ester-Bindung an ein Cystinrest des E1 gebunden. Im nächsten Schritt wird das Ub auf eines von mehreren Ub-Träger-Proteinen (Ubiquitin Conjugating Enzyme, E2) übertragen. Über das E2 wird das Ub auf das Substrat, an dem ein spezifische Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) gebunden ist, transferiert. Die E3 katalysiert den letzten Schritt: Die kovalente Bindung des Ub an einen Lysinrest des Substrats.(22, 25) Die Anheftung weiterer Ub-Moleküle zur Bildung von Polyubiquitinketten erfolgt nach demselben Prinzip.(26) Die folgende schematische Zeichnung veranschaulicht die Ubiquitinierungskaskade:



**Abb.1: Schematische Übersicht über die Ubiquitinierungskaskade.** (modifiziert nach Wilck et al. (27)) ADP – Adenosin Diphosphat; ATP – Adenosin Triphosphat; AMP – Adenosin Monophosphat; PP – Phosphat; E1 – Ubiquitin Activating Enzyme; E2 – Ubiquitin Conjugating Enzyme; E3 – Ubiquitin Protein Ligase

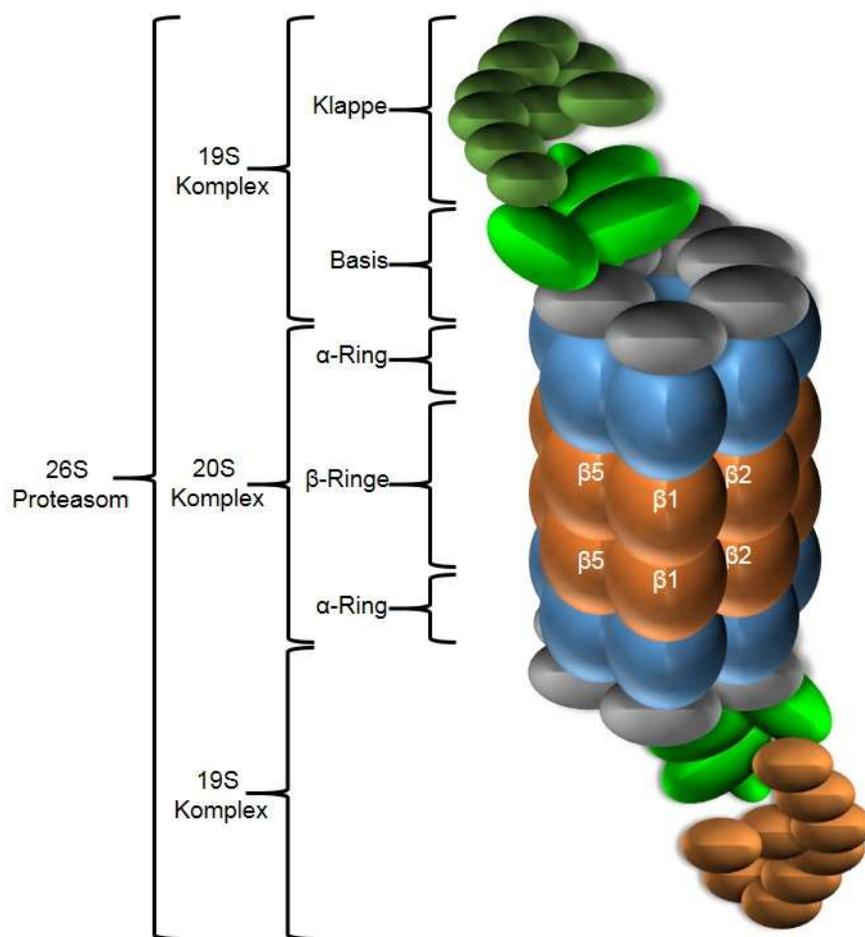
### 1.2.2 Das Proteasom

Die Hydrolyse der Proteine erfolgt in einem 10x15 nm großen Proteasomkomplex, bestehend aus einem tonnenförmigen 20S Kern (Core Particle) und einer bzw. zwei verschiedenen regulatorischen Einheiten (19S Regulatory Particle), die wie ein bzw. zwei Deckel den 20S Kernkomplex umschließen. In der Gesamtheit werden 19S Partikel und 20S Kern als 26S Proteasom bezeichnet. (siehe Abb. 2)

Der 20S Kernkomplex setzt sich aus vier aufeinanderliegenden Ringen zusammen. Von diesen vier Ringen sind die jeweils außenliegenden identisch und bestehen aus je sieben verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ). Sie stellen die Eintrittspforte für die Proteine bzw. die Austrittspforte für die gespaltenen Peptide dar. Liegt das Proteasom als freier 20S Kernkomplex vor, sind die  $\alpha$ -Ringe verschlossen, um einen unkontrollierten Proteinabbau zu verhindern. Die inneren zwei Ringe sind ebenfalls identisch und bestehen aus je sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ). In den  $\beta$ -Ringen befinden sich je drei katalytische Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ , an deren Innenseite die Hydrolyse der Proteinbindungen erfolgt. Die drei katalytischen Untereinheiten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivität:  $\beta 1$  besitzt eine Caspase-ähnliche Aktivität (schneidet nach sauren Aminosäuren),  $\beta 2$  eine Trypsin-ähnliche Aktivität (schneidet nach basischen Aminosäuren),  $\beta 5$  eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (schneidet nach hydrophoben Aminosäuren). (28)

Um die  $\alpha$ -Ringe des 20S Kernkomplexes zu öffnen werden die regulatorischen 19S Partikel (auch als PA700 bezeichnet) benötigt. Die regulatorischen 19S Partikel setzen sich aus zwei Teilen zusammen: Einer Klappe (lid) und einer Basis (base). Die Klappe dient vor allem der Deubiquitylierung der gebundenen Substrate und dem Recycling des Ubiquitins. Die Basis bindet über Ubiquitinrezeptoren das abzubauenende Protein und entfaltet es. Gleichzeitig wird ATP-abhängig der äußere  $\alpha$ -Ring des 20S Kernkomplexes geöffnet, so dass das abzubauenende Protein zu den katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten gelangt. (29)

Die nachfolgende Zeichnung veranschaulicht den Aufbau eines 26S Proteasoms:



**Abb. 2: Schematische Zeichnung eines 26S Proteasoms.** Modifiziert nach Wilck et al. (27)

### 1.2.3 Die Proteasomenheterogenität und das Immunproteasom

Der oben beschriebene Aufbau des Proteasoms wird als konstitutives Proteasom oder Standardproteasom bezeichnet. Neben dem konstitutiven Proteasom gibt es noch weitere Proteasom-Subtypen, die sich strukturell in der Zusammensetzung ihrer katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten und in ihrer Funktion unterscheiden: das Immunproteasom, das Thymoproteasom und das Spermatoproteasom.(30)

Das Immunproteasom (IP) ist der vorrangig exprimierte Proteasom-Subtyp in Immunzellen, insbesondere in antigenpräsentierenden Zellen.(31) In nicht-immunologischen Zellen kann das IP durch inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder LPS induziert werden und wird dann anstatt des konstitutiven Proteasom per *De-Novo-Synthese* gebildet. Die beiden  $\beta$ -Ringe des 20S Komplexes enthalten die drei katalytischen Untereinheiten LMP2 ( $\beta$ 1i), MECL-1 ( $\beta$ 2i), und LMP7 ( $\beta$ 5i) anstelle von  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5. Das katalytische Zentrum der LMP2-Untereinheit besitzt im Gegensatz zu  $\beta$ 1 eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und schneidet nach hydrophoben AS.(30) Dies ist wichtig für die verbesserte Produktion von passenden Epitopen für die Histocampability Complex Class I Moleküle (MHC-I). Diese Epitope werden an den MHC-I Molekülen an der Zelloberfläche aller Zellen den zytotoxischen T-Zellen präsentiert und spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort. Das aktive Zentrum der MECL-1 Untereinheit unterscheidet sich im Gegensatz dazu kaum von dem der  $\beta$ 2-Untereinheit, sodass dessen genaue Funktion noch relativ unklar ist.(30)

Per Röntgen-Kristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass das aktive Zentrum der LMP7-Untereinheit verschiedene strukturelle Unterschiede zur  $\beta$ 5-Untereinheit aufweist, welche die hydrolytischen Eigenschaften beeinflussen.(32) Diese strukturellen Veränderungen führen zu der optimierten Produktion von Epitopen für die MHC-I durch das IP.(32-34) Die LMP7-Untereinheit scheint dadurch eine Rolle in der Epitop-Produktion bei Viruserkrankungen zu spielen. Eine LMP7-Defizienz führte in Mäusen bei Infektion mit dem Coxsackie-B3-Virus zu einer stärkeren Herzmuskelschädigung als in der Wildtypvergleichsgruppe.(35) Zudem konnte gezeigt werden, dass es bei einer genetischen Defizienz aller drei immunoproteasomalen Untereinheiten in Mäusen zu einer erheblich geringeren Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen nach einer Infektion mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) kommt.(36)

Als weitere Funktion des IP, insbesondere der LMP7-Untereinheit, wird die Erhaltung der Proteinhomöostase der Zelle unter oxidativem Stress diskutiert. Oxidativer Stress führt in Zellen vermehrt zu fehlgefalteten oder durch Oxidation beschädigten Proteinen, welche in

Aggregaten, sogenannten Aggresome-like induced structures (ALIS), akkumulieren.(35, 37) Eine übermäßige Anhäufung solcher ALIS führt zur Apoptose. Da das IP in nicht-leukozytären Zellen durch Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  induziert wird, welche gleichzeitig mit oxidativem Stress einhergehen, wurde angenommen, dass das IP dem konstitutiven Proteasom im Abbau der defekten Proteine überlegen sei. Grundlage dieser Hypothese war eine Studie von *Seiffert et al.*(38) Es konnte gezeigt werden, dass es in LMP7-defizienten Fibroblasten unter IFN- $\gamma$  Stimulation zu einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen und ALIS, sowie zu einer vermehrten Apoptose kam, welche in LMP7-suffizienten Fibroblasten nicht beobachtet werden konnte.(38) Eine nachfolgende Studie aus zwei unabhängigen Laboren konnte diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen, sodass die Rolle der LMP7-Untereinheit und des IP bei der Protektion der Zelle gegenüber oxidativem Stress weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen bleibt.(39, 40)

Die LMP7-Untereinheit scheint zudem an der T-Zelldifferenzierung beteiligt zu sein. In Mäusen mit LMP7-Defizienz oder selektiver medikamentöser LMP7-Inhibition wird die Differenzierung naiver CD4-Zellen zu inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen supprimiert und die Differenzierung zu anti-inflammatorischen, regulatorischen T-Zellen erhöht.(41) Diese Ergebnisse gehen einher mit Befunden von Arbeiten, die darauf hinweisen, dass die LMP7-Untereinheit eine zentrale Rolle bei Autoimmunerkrankungen einnimmt. Durch eine selektive medikamentöse Inhibition der LMP7-Untereinheit konnte eine Verbesserung von klinischen Symptomen in murinen Modellen von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, Systemischer Lupus Erythematoses und Hashimoto Thyreoditis, erzielt werden.(42) In der experimentellen Autoimmunenzephalitis, einem murinen Modell der Multiplen Sklerose, kam es zu einer Verbesserung der klinischen Scores unter Therapie mit einem spezifischen LMP7-Inhibitor. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LMP7-Untereinheit inflammatorische Immunantworten verstärkt.(43)

#### **1.2.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Atherosklerose**

Viele Mechanismen in der Pathogenese der Atherosklerose, wie z.B. Inflammation, Apoptose, Cholesterinstoffwechsel oder Umgang mit oxidativem Stress, werden direkt oder indirekt vom UPS reguliert.(27) Es wird diskutiert, ob neben der inflammatorischen Komponente zudem die Beeinträchtigung der Proteinqualitätskontrolle ein Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt und somit die Atherosklerose Merkmale einer „Protein Quality Disease“ aufweist.(44) Argumente für diese These geben histologische Untersuchungen von humanen Thrombendarteriektomie-Präparaten aus der Arteria Carotis, in denen in über 50% der Fälle

histologisch Amyloidablagerungen in den atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnten.(45) Zudem konnte in Autopsie-basierten Studien gezeigt werden, dass instabile Plaques aus Infarktgebieten mehr ubiquitinierte Proteine enthielten als Plaques aus infarktfreien Gebieten, vor allem im Bereich des nekrotischen Kerns und der fibrösen Kappe. Dies führt zur Annahme, dass die Dysregulation des UPS in der späten Phase der Atherosklerose zu einer Destabilisierung und Ruptur von Plaques beiträgt.(46)

Darüber hinaus ist das UPS in die Signalwege potenziell atherogener Zytokine regulatorisch involviert.(47) Die Signalwege von z.B. V-CAM, I-CAM und MCP-I sind über Ubiquitinierung ihrer Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B Familie direkt vom UPS abhängig.(47, 48) Ferner sind die zellulären anti-oxidativen Abwehrsysteme, wie z.B. die Superoxid-Dismutase 1(SOD1) zum Schutz gegen ROS über das UPS reguliert.(49) Zudem konnte in Makrophagen unter Proteasominhibition mit Bortezomib eine Hochregulation von Transportproteinen nachgewiesen werden, welche eine wichtige Rolle beim Cholesterin-Efflux aus der Zelle, der Formation von HDL und somit dem protektiven reversen Cholesterintransport spielen.(50)

In *in vivo* Versuchen wurde untersucht, welchen Effekt eine medikamentöse Inhibition bzw. genetische Ausschaltung des UPS auf die Atherosklerose hat.(51) In einer Studie mit Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen, die eine Hochfettdiät erhielten, untersuchten *van Herck et al.* den Einfluss von Bortezomib auf die frühe und fortgeschrittene Phase der Atherosklerose. Unter Proteasominhibition änderte sich die Größe der atherosklerotischen Plaques nicht, jedoch war im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose der nekrotische Kern in den Plaques größer und instabiler.(52) Konkordant zu diesen Beobachtungen konnten *Wilck et al.* in der späten Phase der Atherosklerose bei LDLR-defizienten Mäusen ebenfalls eine vermehrte Plaqueinstabilität unter Proteasominhibition mit Bortezomib zeigen.(53)

Für die Frühphase der Atherosklerose konnten *Wilck et al.* einen positiven Effekt der Proteasomeninhibition mit Bortezomib zeigen.(54)

Ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz in den Ergebnissen der o.g. Studien könnten unterschiedliche Funktionen des UPS in den verschiedenen Phasen (früh versus fortgeschritten) der Atherosklerose darstellen. In der frühen Phase führt eine Inhibition des UPS zu einem anti-inflammatorischen Effekt durch eine verminderte Freisetzung atherogener Zytokine wie z.B. MCP-1 und IL-6. In den fortgeschrittenen Plaques hingegen verstärkt eine medikamentöse Proteasominhibition eine bestehende Dysregulation des UPS und führt durch eingeschränkte

Elimination von geschädigten Proteinen zu einer Destabilisierung der Plaques. Es wurde eine duale Rolle des UPS in der Atherosklerose postuliert.(27)

### 1.3 Herleitung der Fragestellung

Wie oben erwähnt, konnte in Studien gezeigt werden, dass die spezifische medikamentöse Inhibition oder die Defizienz der LMP7-Untereinheit einen günstigen Einfluss auf entzündliche Erkrankungen nehmen kann. Der derzeitige Stand der Literatur deutet darauf hin, dass die LMP7-Untereinheit an der Induktion und am Erhalt inflammatorischer Prozesse beteiligt ist.(42) Da die Atherosklerose eine chronisch inflammatorische Erkrankung ist, kann angenommen werden, dass sich eine LMP7-Defizienz protektiv auswirken könnte.

Es wird diskutiert, dass eine LMP7-Defizienz bei Zytokin-induziertem Stress, der im Milieu des atherosklerotischen Plaque angenommen werden kann, zu einer vermehrten Akkumulation defekter Proteine sowie zu einer erhöhten Apoptose-Neigung führt.(38) Jedoch wurde dies bisher nur an Fibroblasten untersucht, in denen das Immunoproteasom erst per *De-Novo*-Synthese nach entsprechenden Stimuli gebildet werden muss. Makrophagen oder andere Immunzellen mit konstitutiv hohem Gehalt an IP wurden bisher nicht untersucht. Unter der Annahme, dass die Dysregulation des UPS an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist, hätte eine LMP7-Defizienz in Makrophagen einen atherogenen Einfluss.

Um den Einfluss der LMP7-Untereinheit auf die Atherosklerose untersuchen zu können, wurde mittels einer LDLR-defizienten ( $LDLR^{-/-}$ ) Maus (einem etabliertem Atherosklerose-Mausmodell, in dem die Mäuse nach Fütterung einer fetthaltigen Diät atherosklerotische Plaques entwickeln) und einer LMP7-defizienten ( $LMP7^{-/-}$ ) Maus ein LMP7-defizientes Atherosklerose-Mausmodell ( $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$ ) generiert.

In einem dieser Dissertation begleitenden Projekt wurden  $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$  Mäuse (und LMP7-suffiziente  $LDLR^{-/-}$  Mäuse als Kontrollen) mit einer Hochfett-Diät über 6 bzw. 24 Wochen gefüttert, um frühe und fortgeschrittene Stadien der Atherosklerose hervorzurufen. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurde die Plaquegröße und -komposition zwischen den  $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$  Mäusen und  $LDLR^{-/-}$  Mäusen verglichen.

Die vorliegende Arbeit ist Teil dieses Projektes und untersucht den Einfluss der LMP7-Defizienz auf Atherosklerose-relevante Faktoren auf zellulärer Ebene. Ziel dieser Dissertation ist daher die Charakterisierung der Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf Makrophagen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen dabei folgende Fragen beantwortet werden:

Welchen Einfluss hat die Defizienz der LMP7-Untereinheit auf:

- die Reifung und Polarisation der Makrophagen?
- den Umgang der Makrophagen mit oxidativem Stress und anderen Atherosklerose-relevanten Stimuli?
- die Zusammensetzung des 26S Proteasoms und die proteolytische Aktivität des UPS in den Makrophagen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Reagenzien

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Sicherheitswerkbank <i>Tecnoflow</i>	Integra Biosciences
Inkubationsschrank <i>Function line</i>	Heraeus Instruments
Zentrifuge <i>Megafuge 3.0R</i>	Thermo Scientific
Lichtmikroskop <i>DMIL</i>	Leica
Wasserbad <i>SW-20c</i>	Julabo
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5415R
Vortexer	Vortexmixer neoLab
Durchflusszytometer <i>CyAn ADP</i>	DAKO Cytomation
Heizblock	Biometra
PCR Cycler	Applied Biosystems 7300
RTq-PCR Cycler	Eppendorf Thermocycler Gradient
Blotter <i>Multiphor II</i>	Pharmacia
Netzgerät	Biometra
Chemilumineszenz-System <i>Fusion Solo</i>	Vilbert
Fluoreszenzreader <i>Spectramax GeminiEM</i>	Molecular Devices

### 2.1.2 Allgemeine Materialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
96-Well Platte (schwarz)	Greiner
Bakterienschalen (10 cm)	Greiner
Chromatografiepapier	GE Healthcare
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Fertiggele <i>NuPAGE</i> 3-8%	Gibco Life Technologies
Flowcytometerröhrchen	Falcon
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
PVDF Membran	Millipore
Spritze <i>Microlance 3</i> (23 G; steril)	BD Biosciences
Sterile Einmalpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Sterile Vacuumfilter (500 ml)	Nalge Nunc International
Zellfilter (40 µm)	BD Biosciences
Zellkulturflaschen (T75)	Falcon
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Well)	Falcon
Zentrifugalfilterröhrchen <i>Microcon 100 kD</i>	Multipore
Zentrifugenröhrchen (50 ml; 15 ml)	BD Biosciences
Zellschaber	Sarstedt

### 2.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Fluorogenes Proteasomsubstrat Suc-LLVY-MCA	Bachem
Isofluran <i>Forene</i>	Abbott AG
Steriles PBS (ohne $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ )	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG
TEMED	Sigma
Amido Black Staining Solution	Sigma

### 2.1.4 Zellkulturmedium

Tabelle 4: Zusammensetzung Zellkulturmedium

Medium	Zusätze	Hersteller
RPMI Medium <i>1640</i> (+L-Glutamin)	FCS (10%; 7,5%; 1%) P/S (1%)	Gibco Life Technologies

## 2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusätze</b>
<b>Western Blot</b>	
5x SDS Probenpuffer	1,5M Tris HCL pH 6,8 20% SDS β-Mercaptoethanol 1% Bromphenolblau 30% Glycerol
Anodenpuffer I	36,3 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Anodenpuffer II	3,03 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Kathodenpuffer	5,2 g Aminohexansäure 0,1 g SDS 200 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Waschpuffer	Rotiblock PBS
Amidoblack-Entfärbungspuffer	125 ml Isopropanol 50 ml Essigsäure Ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

<b>Puffer</b>	<b>Zusätze</b>
Stripping Puffer	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	2% SDS
	62,5 mM Tris pH 6,7
TBE Puffer	900 mM Tris
	900 mM Borat
	25 mM EDTA
Entwicklungspuffer Natives Gel	25 $\mu$ l DTT
	100 $\mu$ l SLLVY mM
	50 $\mu$ l ATP 100 mM
2x26S Puffer	450 mM Tris-HCl pH 7,8 (37°C) 8,2 (RT)
	90 mM KCl
	15 mM MgAc x 4 H <sub>2</sub> O
	15 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O

### 2.1.6 Kits

Tabelle 6: Kits

<b>Kit</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Proteinvermessungskit		Pierce AG
RNAeasy Kit		Quiagen
Reverse Transkriptase Kit	DNase (2 U/ $\mu$ l) Hexamere (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) 5x-PCR Puffer DTT (0,1 M) RNAse Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) dNTP (10 mM) MMLV (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen

### 2.1.7 Zytokine

Tabelle 7: Zytokine

<b>Zytokin</b>	<b>Hersteller</b>
Interferon $\gamma$	Biomol
IL-4	PromoKine

## 2.1.8 Antikörper

### 2.1.8.1 Durchflusszytometrie

Tabelle 8: Antikörper Durchflusszytometrie

<b>Zielantigen</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Hersteller</b>
CD 45	APC	BioLegend
CD 115	PE	BioLegend
CD 11b	V450	BD Horizon
Gr-1	PB	BioLegend
F4/80	PE	Abcam

**2.1.8.2 Western Blot**

Tabelle 9: Primär- und Sekundärantikörper

<b>Primärantikörper</b>		
<b>Zielantigen</b>	<b>Verdünnung in Rotiblock</b>	<b>Hersteller</b>
Ubiquitin	1:1000	Dako
$\beta$ 5	1:1000	Abcam
$\beta$ 1	1:2000	Abcam
$\beta$ 2	1:2000	Abcam
LMP7	1:20000	AG Voigt Institut für Biochemie
LMP2	1:2000	Abcam
MECL-1	1:1000	AG Dahlmann Institut für Biochemie
$\alpha$ 4	1:10000	AG Voigt Institut für Biochemie
GAPDH	1:1000	Santa Cruz
Actin	1:5000	AG Voigt Institut für Biochemie
<b>Sekundärantikörper</b>		
Anti-rabbit HRP	1:5000	Santa Cruz
Anti-chicken HRP	1:5000	Santa Cruz

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Herstellung L929 Medium

L929 Zellen sind adhärent wachsende murine Fibroblasten, die den Wachstumsfaktor M-CSF produzieren, der für die Differenzierung von Monozyten zu reifen Makrophagen benötigt wird. (55) Um M-CSF zu erhalten, wurden L929 Zellen nach folgendem Schema kultiviert und die Medium-Überstände gesammelt:

Tag 0:  $1,2 \times 10^5$  Zellen wurden in einer T-75 Zellkulturflasche mit 50 ml Medium (RPMI 1640 mit 7,5% FCS, 1% P/S) ausplattiert. Um zwei Liter L929 Medium zu gewinnen, wurden je 40 Flaschen angesetzt.

Tag 7: Der Medium-Überstand wurde abgenommen und mit Hilfe eines sterilen Vakuumfilters filtriert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin und Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  über fünf Minuten. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde mit 3 ml Medium gestoppt und die Zellen abgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und erneut wie an Tag 0 ausplattiert.

Tag 14: Der Medium-Überstand wurde erneut abgenommen, mit einem sterilen Vakuumfilter filtriert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Zellkultivierung der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) wurde Medium von Tag 7 und Tag 14 im Verhältnis 1:1 verwendet: Im folgenden L929 Medium genannt.

### 2.2.2 Isolation der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM)

Zur Isolation der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) wurden jeweils 2 Mäuse pro Genotyp nach einer Anästhesie mit Isofluran per Genickbruch geopfert. Die Mäuse wurden mit Ethanol eingesprüht und vertikal auf Höhe des Bauchnabels aufgeschnitten. Die Hüftgelenke wurden freipräpariert und der Femurkopf aus der Hüftpfanne disloziert. Nach Entfernen von Fell und Muskeln, wurden Knie-, sowie Sprunggelenk disloziert, sodass Femur und Tibia einzeln und freipräpariert vorlagen. Die Knochen wurden für 30 Sekunden in Ethanol desinfiziert, einmal mit sterilem PBS gewaschen und auf Eis in sterilem PBS bis zur Zellgewinnung gelagert. Alle weiteren Schritte der Zellgewinnung wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer keimarmen Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Unter der Sicherheitswerkbank wurden die Knochen noch einmal 30 Sekunden in Ethanol desinfiziert und zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Zur Gewinnung des Knochenmarkes wurden die Knochen jeweils an den

Epiphysen mit sterilem Besteck aufgeschnitten und die Diaphyse mit einer Spritze, gefüllt mit 5 ml RPMI Medium, über eine 23G Kanüle ausgespült. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon Röhren gesammelt. Pro Genotyp konnten etwa 40 ml Zellsuspension gewonnen werden. Diese wurde drei Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml RPMI Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb filtriert, welches anschließend mit 5 ml RPMI Medium gespült wurde. Danach wurde die gefilterte Zellsuspension zentrifugiert (drei Minuten; 1200 U/min), abgesaugt und erneut in 5 ml RPMI Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift erfolgte zweimal. Nun wurden 40 µl für die Zellzählung unter dem Lichtmikroskop abgenommen. Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und je nach ermittelter Zellzahl mit Medium (10% FCS; 10% L929 Medium; 1% P/S) so resuspendiert, dass sich eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Petrischale ergab.

### **2.2.3 Zellkultur von Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM)**

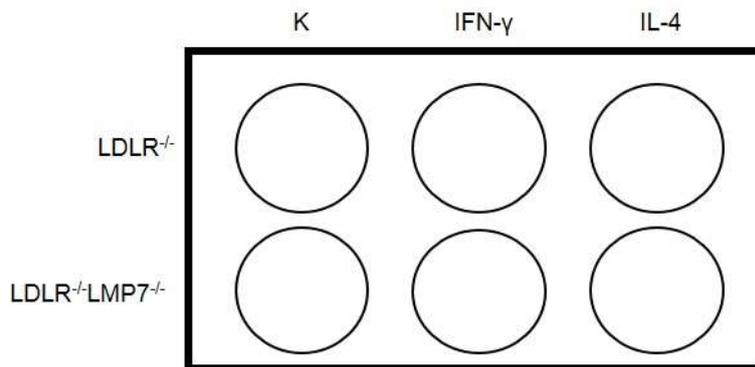
Tag 0: Die Zellen wurden mit einer Gesamtzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen in 11 ml Medium in Petrischalen (10 cm Durchmesser) ausplattiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Da sich auf den Petrischalen aus dem Pool der Knochenmarkszellen im Wesentlichen nur die Makrophagen anheften, dient die Adhärenz als ein Selektionsfaktor.

Tag 4: Das Medium wurde abgesaugt und mit 11 ml frischen Medium (10% FCS; 10% L929 Medium; 1% P/S) erneuert.

Tag 6: Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu lösen wurden diese mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt. Die so entstandene Zellsuspension wurde abpipettiert und in Falcon Röhren gesammelt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (drei Minuten, 1200 U/min), der Überstand abgesaugt und anschließend in 5 ml Vollmedium resuspendiert. Dann wurden 40 µl entnommen, um in einer Neubauer Zählkammer die Zellen zu quantifizieren. Danach wurden die Zellen auf die gewünschte Zellzahl gebracht und in Bakterienchalen (10 cm) ausgesät. Alle an Tag 7 adhären Zellen in den Bakterienchalen wurden als BMDM betrachtet.

### 2.2.4 Makrophagenpolarisation

Die BMDM wurden an Tag 6 abgelöst und mit einer Zellzahl von je  $6 \times 10^5$  Zellen pro well auf eine 6-well-Platte in 2 ml Vollmedium plus L929 ausplattiert. An Tag 7 wurden die BMDM mit den jeweiligen Zytokinen behandelt (Abb.3). Um eine Polarisation der naiven BMDM zu M1-Makrophagen auszulösen wurden diese mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt. Für einen Polarisation zu M2-Makrophagen wurden 5 U/ml IL-4 verwendet. Nach 6 Stunden Zytokin-Behandlung wurde das Medium abgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, sowie die Zellen mit PBS gewaschen und die Proteine und die RNA isoliert.



**Abb. 3: Versuchsaufbau zur Polarisation der BMDM.** K, Kontrolle; IFN- $\gamma$ , Interferon gamma; IL-4, Interleukin 4

### 2.2.5 Untersuchungen zur Zellviabilität

Die ausdifferenzierten BMDM wurden an Tag 6 abgelöst und mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  auf Petrischalen (35mm Durchmesser) in 2 ml Vollmedium (10%FCS) + L929 ausplattiert. An Tag 7 erfolgte ein Wechsel des Mediums auf serumarmes Medium (1% FCS). Dann wurde Stickstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in verschiedenen Konzentrationen für eine Stunde hinzugegeben. Nach einer Stunde wurde das Medium abgesaugt. Es folgte ein zweimaliger Waschschritt mit sterilem PBS. Nach erneuter Hinzugabe von 1 ml Vollmedium wurden die Zellen abgelöst, suspendiert und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Als vitale Zellen galten Zellen, die makroskopisch eine intakte Membran aufwiesen. Es erfolgten pro Konzentration vier Zählungen mit anschließender Bildung eines Mittelwertes.

## 2.3 Proteinspezifische Biochemische Methoden

### 2.3.1 Denaturierende Proteinextraktion

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. PBS wurde abgesaugt und je nach Zellzahl 20-50  $\mu\text{l}$  kalter Proteinlysepuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem

Zellschaber abgeschabt, die Zellsuspension in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 20 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 U/min für 15 Minuten und 4°C.

### **2.3.2 Native Proteinextraktion**

Die Zellen wurden zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. PBS wurde abgesaugt und anschließend je nach Zellzahl 30-120 µl kaltes H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hinzugegeben. Die Zellen wurden unter Kühlung mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert, welches sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren wurde. Die Zell-Lyse erfolgte durch mehrmaliges schnelles Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff.

### **2.3.3 Proteinvermessung**

Die Proteinvermessung erfolgte mit einem „BCA Protein Assay Kit“. Dazu wurden jeweils 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> zu 5 µl Proteinprobe gegeben und gevortext. Anschließend wurden je 10 µl zu vermessende Probe pro well in Doppelwerten auf eine 96-well Platte pipettiert. Dann wurden 200 µl eines BCA-Gemisches (Verhältnis Lösung A zu Lösung B: 50:1) pro well hinzugegeben und die Platte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Optische Dichte wurde mit einem Reader photometrisch bei 570 nm gemessen. Als Kontrolle diente der mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnte Lysepuffer oder bei den nativen Proteinen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

### **2.3.4 Western Blot**

Das Prinzip des Western Blots beruht auf einer Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach mit Hilfe eines Polyacrylamidgels in einem elektrischen Feld (SDS-PAGE). Die aufgetrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen (Blotting), auf der sie mit spezifischen Erst- und Zweitantikörpern mittels Chemielumineszenz sichtbar gemacht werden können.

#### **2.3.4.1 SDS-PAGE**

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) dient zur Auftrennung der Proteine im Gel, entsprechend ihrer Molekülgröße, mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die Gele der SDS-PAGE enthalten Acrylamid. Acrylamid polymerisiert durch die Zugabe des Radikals Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED), dem Katalysator der Reaktion, aus und bildet ein poröses Gel, durch das die Proteine entlang eines elektrischen Feldes wandern. Mit zunehmender Molekülgröße wandern die Proteine langsamer durch das Gel. Die Porengröße des Gels sinkt mit Zunahme des Acrylamidgehalts. Für die Versuche dieser Dissertation wurden 10% Trenn- und 3,9% Sammelgele verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 10: Western Blot Gele

Sammelgel	Trenngel
1,25 ml Sammelgelpuffer pH 6,8	1,875 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8
0,65 ml Acrylamid	2,5 ml Acrylamid
3,05 ml H <sub>2</sub> O	3,1 ml H <sub>2</sub> O
25 µl APS	25 µl APS
5 µl TEMED	5 µl TEMED

Das Probevolumen (15 µl) für die SDS-PAGE setzte sich aus 10 µg Proben-Protein, 3 µl 5x SDS-Probenpuffer und 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> zusammen. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C in einem Heizblock erhitzt. Durch die Denaturierung wurden Tertiär- sowie Sekundärstrukturen des Proteins zerstört, das im SDS-Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol zerstörte zusätzlich Disulfidbrückenbindungen. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. In die äußersten Taschen wurde ein Marker zur Einschätzung des Molekulargewichtes der Proteine gegeben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 Volt und einer Laufzeit von 90 Minuten.

#### 2.3.4.2 Blotting

Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF Membran) erfolgte nach der diskontinuierlichen semitrockenen Methode mit unterschiedlichen Puffern. Einen Überblick über den Aufbau der Blotkammer gibt die folgende Abbildung.

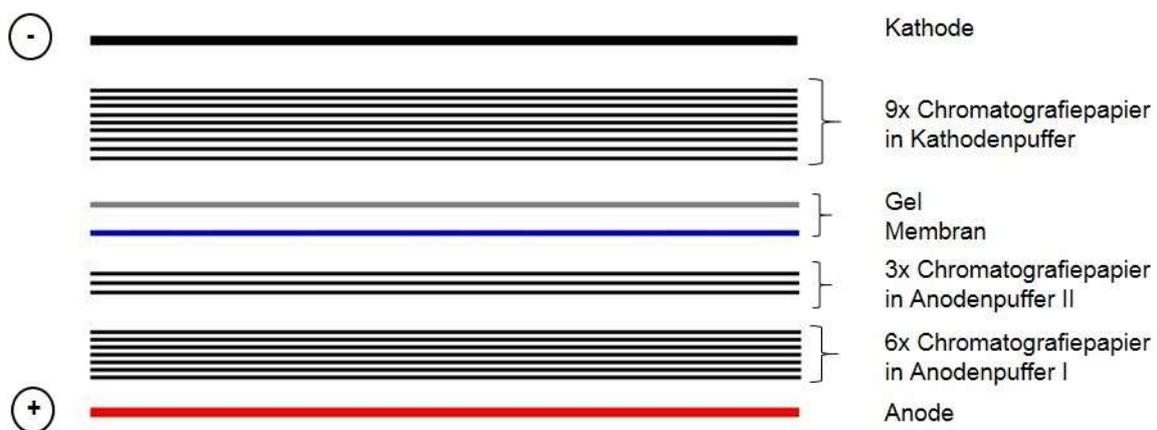


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Blotkammer.

Die PVDF Membran wurde vorher durch Behandlung mit Methanol aktiviert und das Gel in Anodenpuffer I äquilibriert. Geblottet wurde für 90 Minuten bei 120 Volt. Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran nachzuweisen, wurde die Membran nach dem Blotten mit reversibel bindenden Ponceau-S gefärbt. Der Farbstoff wurde anschließend durch Waschen mit Rotiblock entfernt.

### **2.3.4.3 Detektion der Proteine**

Die Inkubation mit dem in Rotiblock verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht auf einem Schüttler. Nach einem Waschschrift von mindestens viermal 8 Minuten in Rotiblock, wurde der je nach Primärantikörper passende Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran erneut viermal 8 Minuten mit Rotiblock gewaschen. Zur Visualisierung der gesuchten Proteine wird eine Chemilumineszenz-Reaktion benutzt. Dabei wird Luminol von der am Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase oxidiert und in eine lumineszierende Form umgewandelt. Die Intensität dieser Lumineszenz wurde in einer digitalen Dunkelfotokammer gemessen und ausgewertet.

### **2.3.4.4 Stripping**

Um die Membranen erneut mit einem spezifischen Antikörper behandeln zu können, z.B. für eine Ladekontrolle, müssen die vorher verwendeten Antikörper zunächst entfernt werden. Dazu wurden die Membranen 30 Minuten bei 50°C in einem Stripping Puffer inkubiert und danach viermal 8 Minuten in Rotiblock gewaschen.

### **2.3.5 Native PAGE**

Um aus den nativen Proteinen das Proteasom zu extrahieren wurden die gewonnenen Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Da diese Auftrennung länger dauert als die herkömmliche SDS-PAGE und durch den Stromfluss Wärme entsteht, welche die Proteine denaturiert, erfolgte die Auftrennung des nativen Proteins im Eisbad in einem Kühlraum. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt und einer Laufzeit von vier Stunden. Das Gel wurde aus den Kammern genommen und in einem Entwicklungspuffer für 30 Minuten inkubiert. Der Entwicklungspuffer enthält Adenosin-Triphosphat (ATP), sowie SLLVY, ein Substrat des Proteasoms, welches nach seinem proteasomalen Abbau einen fluoreszierenden Farbstoff abgibt. Nach 30 Minuten wurde das Gel auf eine UV-Lampe gelegt. Die nun sichtbar fluoreszierenden Banden, welche das 26S Proteasom enthalten, wurden ausgeschnitten und zur Weiterverarbeitung in Eppendorfgefäßen gelagert.

### 2.3.5.1 Proteinextraktion aus Polyacrylamid Gel und weitere Verarbeitung

Die ausgeschnittenen Gelbanden, welche das 26S Proteasom enthalten, wurden in einem Eppendorfgeläß mit Hilfe eines Skalpellens zerkleinert. Dann wurde je 60 µl Laemmli-Probenpuffer + Glycin hinzugegeben und dieser Ansatz bei 4°C über Nacht gelagert. Der Ansatz wurde in ein Zentrifugalfiltrerröhrchen gegeben und für 30 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Protein-Lysat wurde abgenommen und eingefroren. Anschließend wurde das Röhrchen ein weiteres Mal zentrifugiert und das restliche Lysat abgenommen. Das extrahierte 26S Proteasom wurde für Western Blots verwendet. Bei dieser Methode ist nach der Extraktion aus den ausgeschnittenen Gelabschnitten keine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration mehr möglich. Um zu gewährleisten, dass im finalen Western Blot annähernd gleiche Mengen Protein in den Proteinproben von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen aufgetragen wurden, wurde aus dem gewonnenen Protein beider Genotypen die Detektion einer  $\alpha$ -4 Proteasom-Untereinheit mittels Western Blot durchgeführt. Die  $\alpha$ -4 Western Blots wurden densitometrisch mittels der im *Fusion Solo* integrierten Software zur Densitometrie ausgewertet und dadurch das Mengenverhältnis der Proteasomen zwischen den Extrakten beider Genotypen bestimmt. Anhand der ermittelten Mengenverhältnisse wurden die Proteinmengen auf den finalen Western Blots aufgetragen. Die  $\alpha$ -4-Untereinheit diente als Ladekontrolle.

### 2.3.6 Messung der Proteasomaktivität

Zur Bestimmung des Substratumsatzes der Proteasomen wurden künstliche, fluorogene Peptid-Substrate verwendet. Durch den Abbau der Peptide durch das Proteasom wird ein fluoreszierendes Spaltprodukt frei. Die Menge des Spaltproduktes und somit auch die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Proteasomaktivität. Für die Messung wurden je Probe 30 µg natives Protein ad 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gebracht und auf eine 96-well-Platte pipettiert. Die Messung jeder Probe erfolgte in Dreifachwerten, d.h. es wurden 20 µl des Proteingemisches pro well pipettiert. Pro well wurden 100 µl Mastermix (siehe Tabelle 10) hinzugegeben und die Platte lichtgeschützt bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders gemessen. Als Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verwendet.

Tabelle 11: Versuchsansatz zur Messung der Schnittaktivität

**Mastermixansatz pro well**

---

60  $\mu$ l 2x26S Puffer

23,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

0,22  $\mu$ l 0,5 M DTT

6  $\mu$ l 100 mM ATP

10  $\mu$ l 2 mM SLVVY-AMC zur Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität

10 $\mu$ l 2 mM BzVGR-AMC zur Messung der Trypsin-ähnlichen Aktivität

10 $\mu$ l 2 mM ZLLE-AMC zur Messung der Caspase-ähnlichen Aktivität

0,2  $\mu$ l Phosphokreatin-Kinase

0,5  $\mu$ l Phosphokreatin

---

**2.3.7 Densitometrische Auswertung der Western Blots**

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software Version 1.50b. Zunächst wurde mit Hilfe des Programms ein Plot der Ladekontrollen erstellt. Nach Abzug der Artefakte und der Hintergrundintensität wurde die Intensität der einzelnen Ladekontrollen als Fläche unter der Kurve berechnet. Die absoluten Werte der einzelnen Banden wurden nachfolgend mit einem Kontrollwert innerhalb der Gruppe ins Verhältnis gesetzt. So erhält man die relative Dichte jeder Bande bezogen auf den Kontrollwert in Prozent. Die Vermessung und die Berechnung der Verhältnisse der Proteinbanden erfolgten nach demselben Prinzip. Um die relative Dichte jeder Proteinbande normalisiert auf ihre jeweilige Ladekontrolle zu ermitteln, wurde das Verhältnis aus den errechneten Werten gebildet.

## 2.4 Methoden zur Quantifizierung von messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA)

### 2.4.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Auf die mit PBS gewaschenen BMDM wurden 350 µl des Qiagen Lyse-Puffers gegeben, welcher vorher mit jeweils 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt worden war. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst und die Zellsuspension in die Aufbereitungssäule gegeben. Nach der Zugabe von Ethanol wurde die RNA mehrmals mit den Waschpuffern des Qiagen Kits gewaschen und zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop 2000 gemessen.

### 2.4.2 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) -Erststrangsynthese

Zur cDNA-Erststrangsynthese wurde eine MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen benutzt. Die Reverse Transkriptase wird benutzt um einen zur RNA komplementären DNA-Strang zu erstellen, um diesen in der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR) zu vervielfältigen. Es wurden jeweils 500 ng der zuvor isolierten RNA verwendet und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zu einem Volumen von 9 µl aufgefüllt. Die Herstellung erfolgte in drei Schritten (siehe Tabelle 11):

Tabelle 12: Übersicht zur cDNA-Erststrangsynthese

Schritt	Reagenz	Cycler-Einstellung
DNA Abbau	0,5 µl DNase	15 min 37°C; 5 min 95°C
Anlagerung unspezifischer Primer	2 µl Hexamere	10 min 70°C; 5 min RT
Umschreiben von RNA zu cDNA	4 µl 5x PCR-Puffer 2 µl DTT 0,5 µl RNase Inhibitor 1 µl dNTP 1 µl MMLV	60 min 37°C

Nach der Herstellung der cDNA-Erststränge wurden diese bis zur Verwendung in der Realtime PCR bei -20°C gelagert.

### 2.4.3 Quantitative Real Time PCR (TaqMan®)

Die quantitative Real Time PCR mit TaqMan Sonden ermöglicht die Quantifizierung der mRNA über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit fluoreszierenden Sonden, welche in jedem vollständigen PCR-Zyklus abgespalten werden und somit über eine Fluoreszenzmessung Rückschlüsse auf den mRNA-Gehalt in den gewonnenen Proben geben. Das Prinzip der PCR beruht auf einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Stränge mittels DNA-Polymerase. Hierbei gibt es 3 Phasen: 1.) Die Denaturierung der cDNA bei 95°C über 5 Minuten zur Auftrennung der Doppelstränge. 2.) Die Hybridisierung der Primer, an denen die DNA-Polymerase ansetzen kann. 3.) Die Polymerisation durch die DNA-Polymerase. Bei der Real-Time-PCR kommen spezielle Primer zum Einsatz, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff tragen. Dieser wird durch einen sog. Quencher, welcher am 3'-Ende des Primers sitzt, unterdrückt. Nach der Anlagerung der Primer setzt nun die DNA-Polymerase am 5'-Ende des Primers an und schneidet durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität den fluoreszierenden Farbstoff ab. Durch die räumliche Trennung vom Quencher wird die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt und wird am Ende eines jeden Zyklus gemessen. Übersteigt nach einem Zyklus die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz, spricht man vom Ct-Wert (Cycle Threshold). Die Ct-Werte werden gemessen und in Relation zu einem Housekeeping Gen gesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Non Template Control (NTC) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> anstelle von cDNA. Als Housekeeping Gen wurde RLP19 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

### 2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt es Zellen anhand ihrer Größe und ihrer Granularität zu differenzieren und quantifizieren. Die Zellen passieren in einem laminaren Fluss, einzeln nacheinander, eine Messkammer und werden von einem Laser bestrahlt. Es wird das vorwärts (FSC) sowie seitwärts gestreute Licht (SSC) gemessen. Anhand des vorwärts gestreuten Lichts wird die Größe der passierenden Zellen, anhand des seitwärts gestreuten Lichts die Granularität gemessen. Darüber hinaus ist es möglich mit fluoreszierenden Antikörpern Oberflächenstrukturen anzufärben, um die Zellen zu charakterisieren. Die auf den Oberflächenstrukturen gebundenen Antikörper absorbieren das Licht des Lasers und werden dadurch angeregt Licht in einer definierten, längeren Wellenlänge als die des Lasers zu emittieren. Die Intensität des emittierten Lichtes wird gemessen und so eine Aussage über die vorhandenen Oberflächenstrukturen getroffen.

Für die Charakterisierung der Oberflächenstrukturen der BMDM wurden Antikörper verwendet, die an folgende Farbstoffe gekoppelt waren:

**Tabelle 13: Übersicht Farbstoffe der Durchflusszytometrie**

<b>Farbstoff</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Absorption</b>	<b>Emission max.</b>
Allophycocyanin	APC	633 nm	680 nm
Pacific Blue	PB	401 nm	452 nm
Phycoerythrin	PE	488 nm	575 nm
BD Horizon V450		404 nm	452 nm

Zur Charakterisierung der BMDM wurden diese aus den Zellkulturschalen mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden in Medium (10% FCS) resuspendiert und je 75 µl dieser Suspension zu dem jeweiligen Antikörpermix pipettiert. Der Ansatz wurde 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert und dann jeweils 500 µl kaltes PBS hinzugegeben, um die Reaktion des Antikörpers abzustoppen. Als Kontrolle wurde eine ungefärbte Zellsuspension beider Genotypen verwendet.

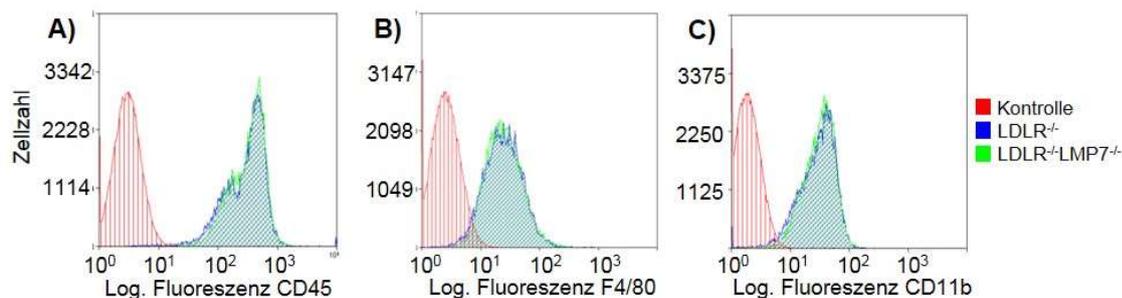
## 2.6 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mittels GraphPad Prism Software (Version 7). Abweichungen um den Mittelwert wurden prinzipiell als Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Überprüfung einer Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test angewandt. Mittels F-Test wurde überprüft, ob die Varianzen normalverteilter Variablen gleichmäßig oder ungleichmäßig verteilt waren. Der ungepaarte T-Test wurde für normalverteilte Variablen mit gleichverteilten Varianzen benutzt, der Welch-Test für ungleiche Varianzen. Für nicht normalverteilte Variablen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Eine two way analysis of variance (ANOVA) gefolgt von einem Sidak-Mehrfachvergleichstest wurde durchgeführt für Experimente mit multiplen unabhängigen Faktoren zwischen Genotypen. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

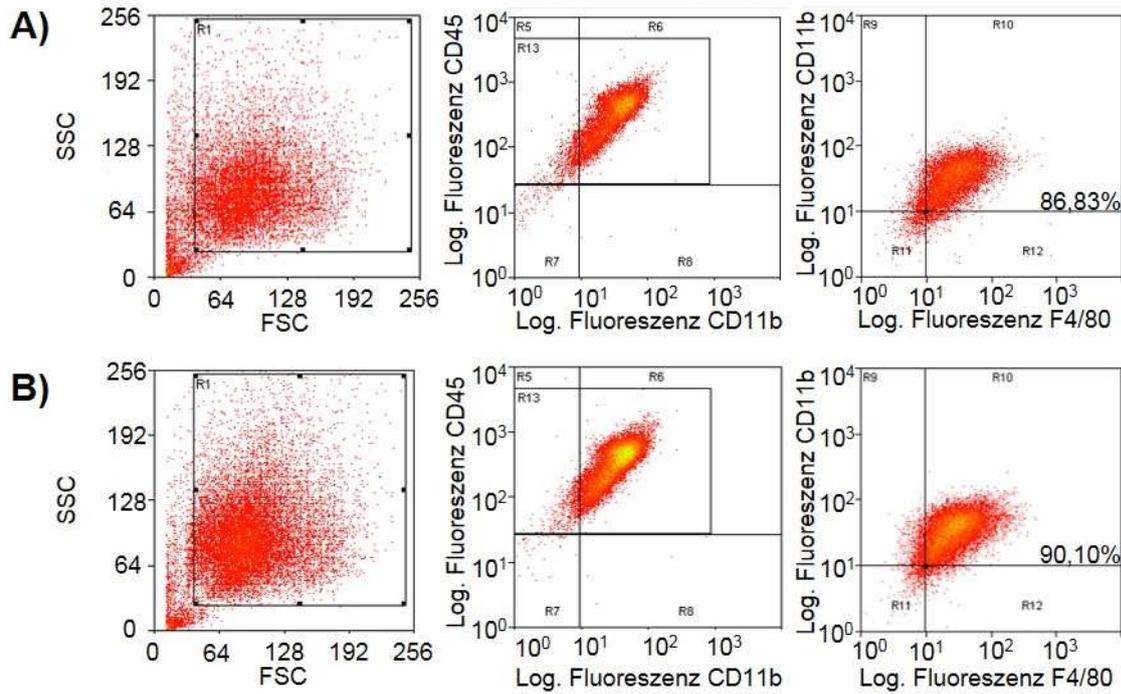
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von Makrophagen

Um zu überprüfen, ob die LMP7-Defizienz einen Einfluss auf die Reifung von Makrophagen hat, wurden BMDM mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Dabei wurden folgende Antikörper verwendet: CD45 als Oberflächenmarker für Leukozyten, CD11b als Oberflächenmarker für Leukozyten myeloischen Ursprungs (vor allem Makrophagen und Monozyten) und F4/80 als Oberflächenmarker für maturierte BMDM. Die isolierten BMDM wurden am Tag 7 mit den drei Antikörpern einzeln (Abb. 5), sowie in Kombination (Abb. 6) inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass am Tag 7 durchschnittlich 86,5% der Zellen aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen und 89,5% der Zellen aus LDLR<sup>-/-</sup> LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen positiv für alle 3 kombinierten Antikörper waren. In 2 unabhängigen Experimenten bestand kein Unterschied zwischen BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen.



**Abb. 5: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von murinen BMDM – Charakterisierung anhand von Einzelfärbungen von Oberflächenmarkern in der Durchflusszytometrie.** Ergebnisse der Durchflusszytometrie an einem repräsentativen Beispiel aus n=2 Experimenten. Einzelfärbungen mit fluoreszierenden Antikörpern für die Oberflächenmarker CD45, F4/80 und CD11b. Färbungen von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen (blau) und LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen (grün) im Vergleich zur ungefärbten, gemischten Kontrolle (rot). **A)** Einzelfärbung der BMDM mit CD45 als ubiquitären Leukozytenmarker. **B)** Einzelfärbung der BMDM mit F4/80 als Oberflächenmarker für maturierte BMDM. **C)** Einzelfärbung der BMDM mit CD11b als Oberflächenmarker für Makrophagen.



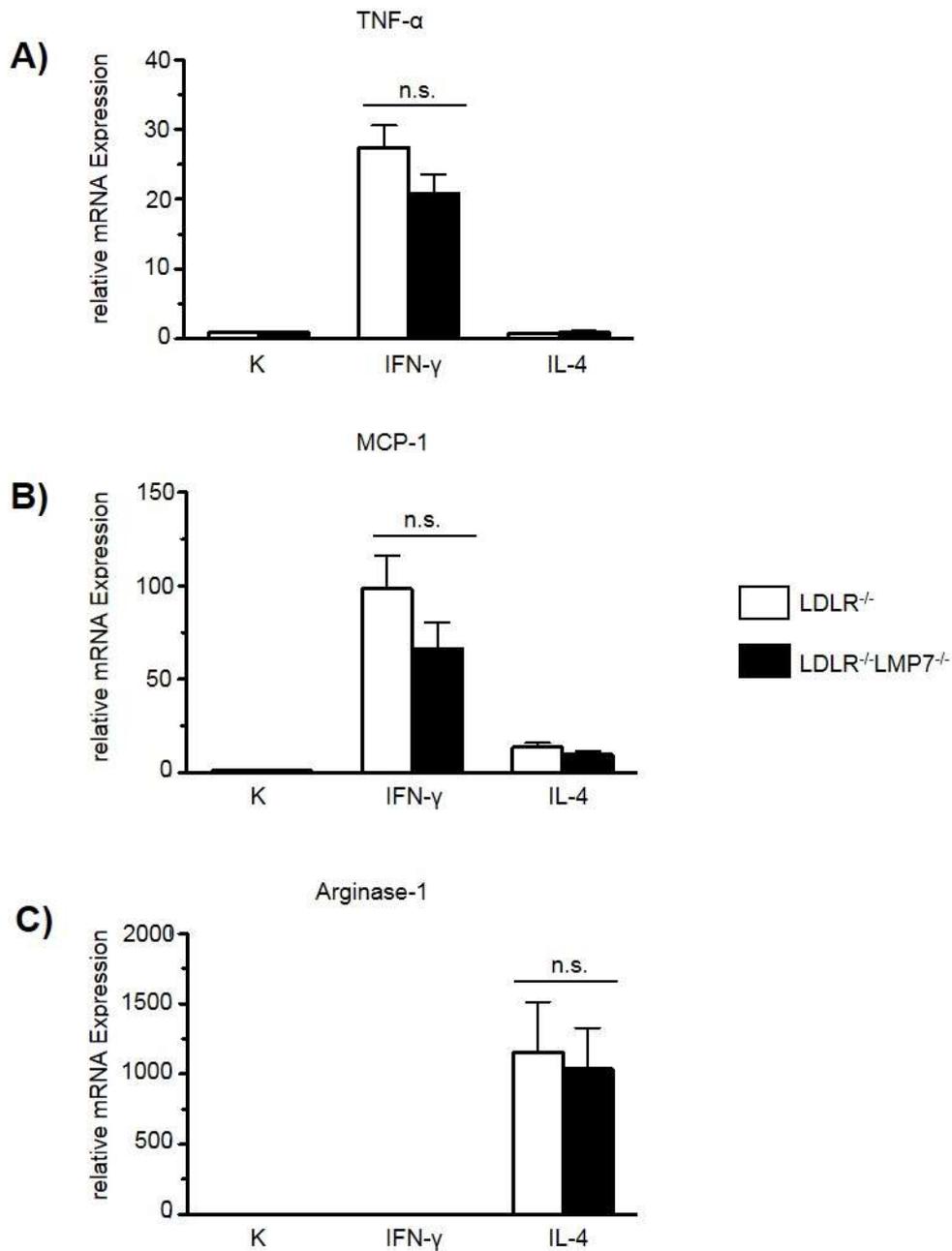
**Abb. 6: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Reifung von murinen BMDM – Charakterisierung anhand von Kombinationsfärbungen von Oberflächenmarkern in der Durchflusszytometrie.**

A) Obere Reihe BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, B) Untere Reihe: BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. Links: R1 zeigt die nach Zellablösung intakten Makrophagen. Mitte: R6 zeigt CD45 und CD11b positive Zellen aus R1. Rechts: R10 zeigt CD11b und F4/80 positive Makrophagen aus R6. R6 zeigt somit Makrophagen mit Expression aller drei Oberflächenmarker. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der Oberflächenmarker zwischen den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen und aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden.

### 3.2 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Makrophagenpolarisation

Um den Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Polarisation von BMDM in Richtung des M1- und M2-Makrophagen-Phänotyps zu untersuchen, wurden naive BMDM von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen am Tag 7 nach ihrer Ausplattierung für 6 Stunden mit IFN- $\gamma$  (für die M1-Polarisierung) oder IL-4 (für die M2-Polarisierung) behandelt.

Mittels Real-Time-PCR wurde die Genexpression von M1- (TNF- $\alpha$  und MCP-1) und M2- (Arginase-1) Makrophagenmarkern untersucht. Die n-fache Expression der mRNA wurde in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle des gleichen Genotyps berechnet. Nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  stieg die Expression von TNF- $\alpha$  und MCP-1 sowohl in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen als auch in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich an. IFN- $\gamma$  induzierte somit eine M1-Polarisation in beiden Genotypen. IL-4 induzierte in BMDM beider Genotypen eine gesteigerte Expression von Arginase-1, entsprechend eines M2-Phänotyps. Zwischen BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen und BMDM aus LMP7-suffizienten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression von TNF- $\alpha$ , MCP oder Arginase-1 gezeigt werden. Es konnte lediglich ein leichter Trend zu einer niedrigeren Expression der M1- und M2-Makrophagenmarker in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu LMP7-suffizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden.



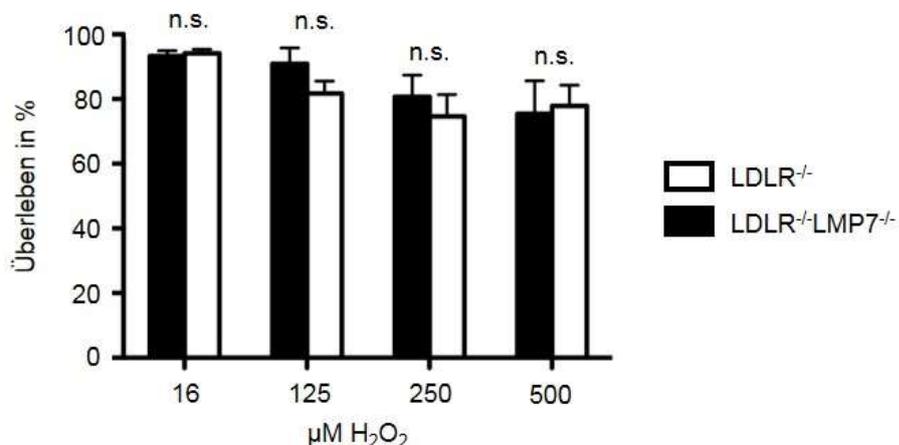
**Abb. 7: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Polarisation von murinen BMDM.** Relative Expression der mRNA für M1-Makrophagenmarker **A)** Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) **B)** Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und M2-Makrophagenmarker **C)** Arginase-1 nach 6 Stunden Behandlung der BMDM mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-4 (IL-4) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Genotyps. Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode. Housekeeping Gen: RLP19.

### 3.3 Einfluss der LMP7-Defizienz auf den Umgang von Makrophagen mit oxidativem Stress

#### 3.3.1 Zellüberleben von LMP7-defizienten BMDM unter oxidativem Stress

Um zu untersuchen, ob die LMP7-Defizienz Auswirkungen auf das Zellüberleben von Makrophagen unter oxidativem Stress hat, wurden BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen und LDLR<sup>-/-</sup> LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt und anschließend in einer Zellozählkammer gezählt. Als Referenzwert diente die unbehandelte Kontrolle des jeweiligen Genotyps. (Abb. 8)

BMDM beider Genotypen wiesen eine hohe Toleranz gegenüber oxidativem Stress auf (Abb. 9). Selbst bei einer hohen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (500 µM) konnten bis zu 80% des Referenzwertes an vitalen Zellen nachgewiesen werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben der Makrophagen zwischen BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen und den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden.

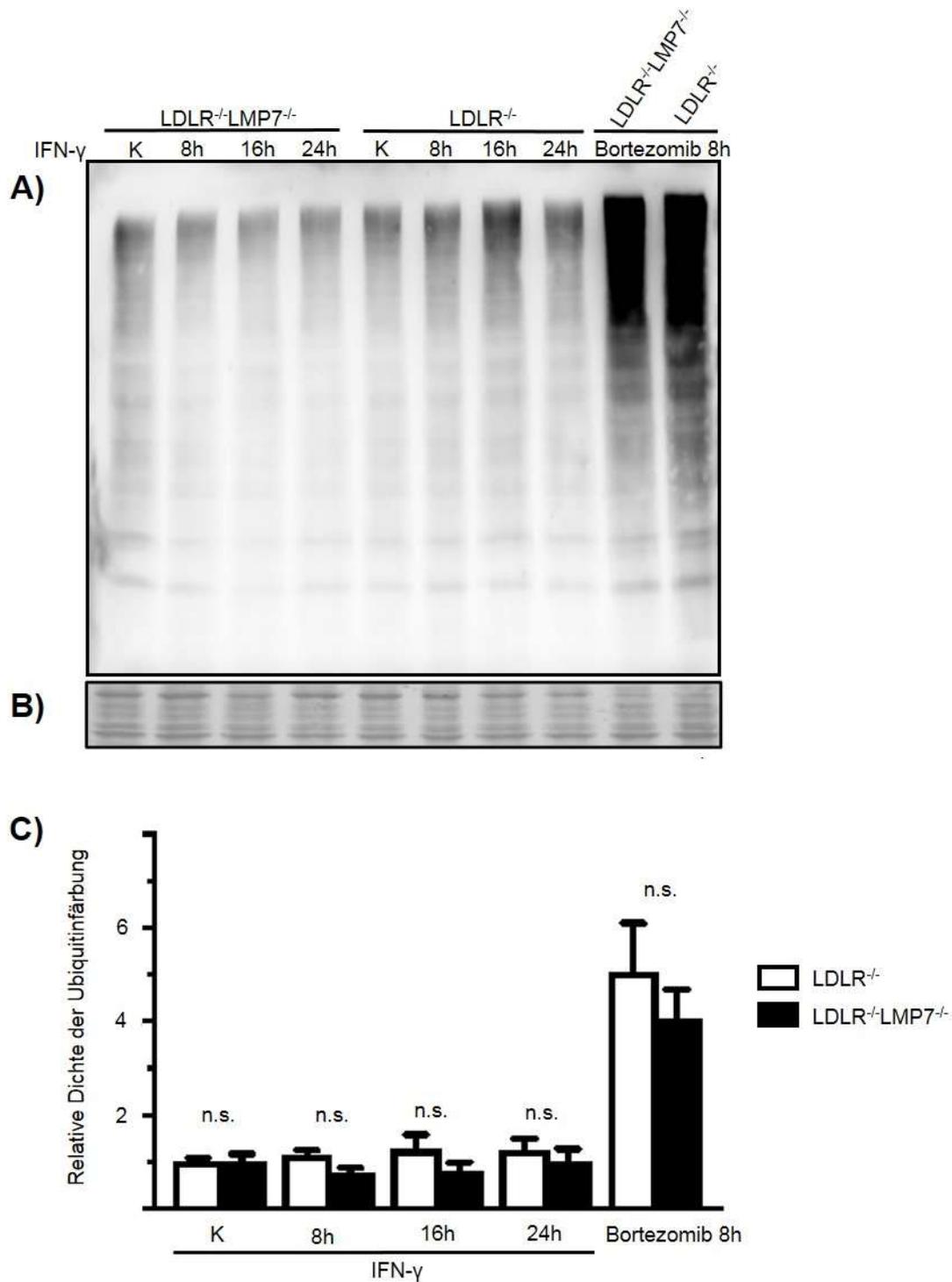


**Abb. 8: Einfluss der LMP7-Defizienz auf das Überleben muriner BMDM unter Behandlung mit steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen.** Gezeigt wird das Überleben der BMDM nach einstündiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung in Prozent bezogen auf den Wert der unbehandelten Kontrolle für BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen und aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± Standardfehler; n=4 Experimenten

### 3.3.2 Evaluation einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen in LMP7-defizienten BMDM

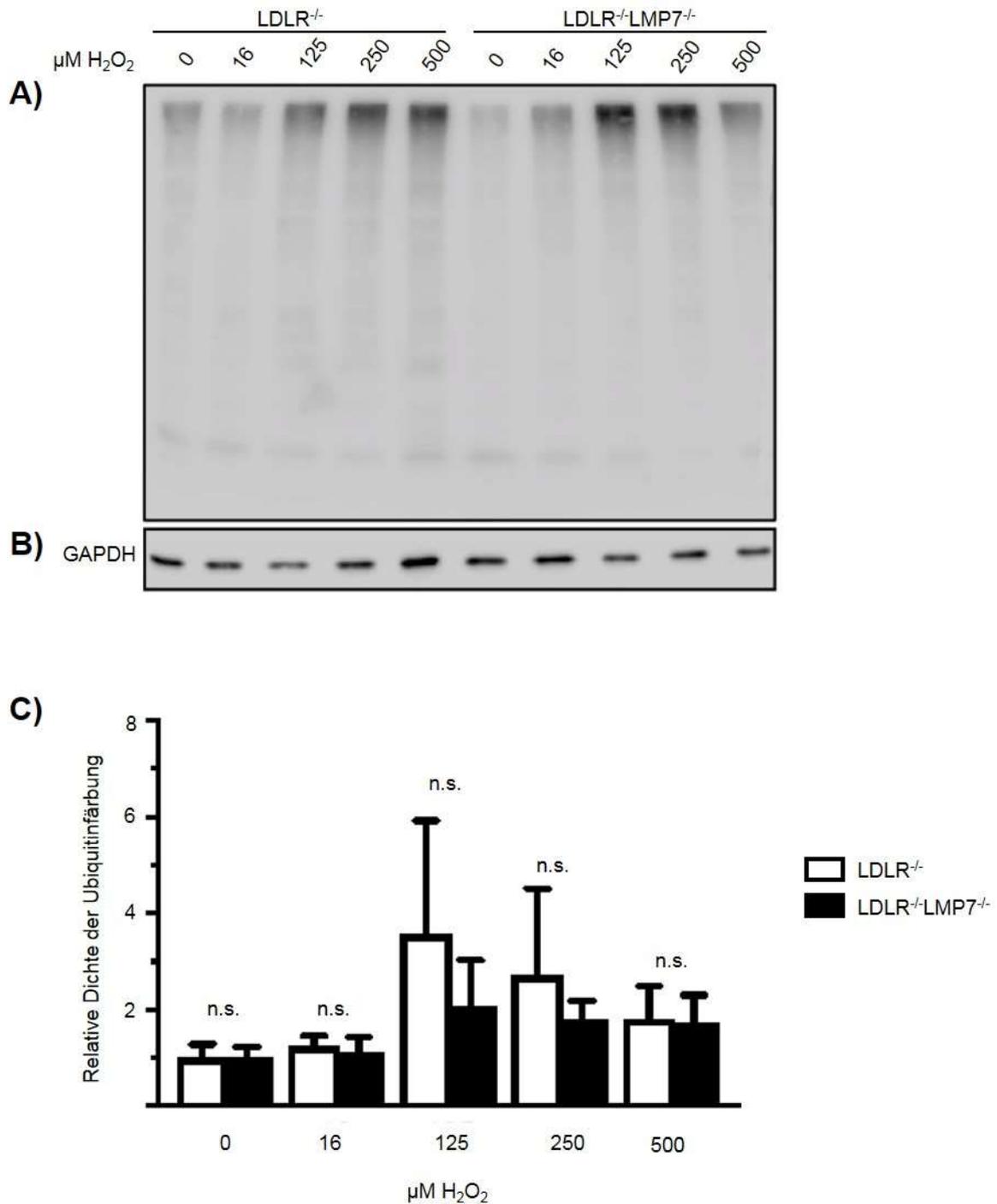
Um zu untersuchen, ob die Stimulation mit IFN- $\gamma$  in Makrophagen zu einer vermehrten Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen führt, wurden BMDM über mehrere Stunden (8h, 16h und 24h) mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) behandelt. Anschließend wurde das Lysat der BMDM auf eine vermehrte Anhäufung poly-ubiquitiniertes Proteine mittels Western Blot untersucht. Als Positivkontrolle für die Akkumulation poly-ubiquitiniertes Proteine wurde eine mit dem Proteasominhibitor Bortezomib (5 ng/ml) behandelte Probe von beiden Genotypen verwendet. (Abb. 9)

In den Western Blots konnte keine signifikante Anhäufung poly-ubiquitiniertes Proteine unter IFN- $\gamma$  Stimulation detektiert werden. Ferner konnte kein Unterschied zwischen den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen und aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. Eine Akkumulation von poly-ubiquitiniertes Proteinen zeigten hingegen beide Genotypen bei einer Proteasominhibition unter Bortezomib.



**Abb. 9: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Akkumulation poly-ubiquitinerter Proteine in murinen BMDM unter IFN- $\gamma$  Stimulation.** **A)** Gezeigt wird das Auflaufen poly-ubiquitinerter Proteine im Gesamtprotein von BMDM unter IFN- $\gamma$  Stimulation im Vergleich zwischen BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. BMDM beider Genotypen, die mit Bortezomib (5 ng/ml) behandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Repräsentativer Western Blot aus n=4. **B)** Amido-Black Färbung als Ladekontrolle für den obigen Western Blot. **C)** Densitometrische Auswertung der anti-ubiquitin Western Blots. Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n=4. n.s., nicht signifikant.

Als Auslöser von starkem oxidativen Stress wurde, analog zu den Experimenten in 3.3.1,  $H_2O_2$  verwendet. Es wurde untersucht, ob es unter einstündiger Behandlung mit  $H_2O_2$  in verschiedenen Dosen zu einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen kommt. Hier konnte mit steigender Dosis lediglich eine geringe Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen nachgewiesen werden, die sich zwischen den Genotypen nicht wesentlich unterschied (Abb. 10).



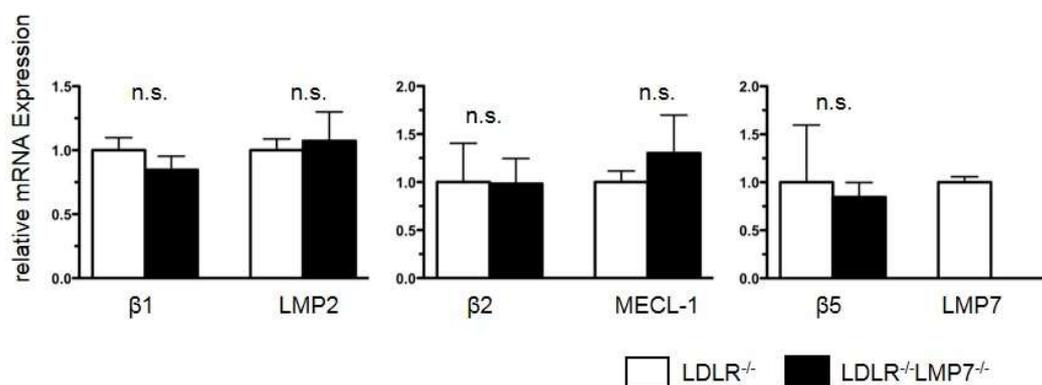
**Abb. 10: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Anhäufung poly-ubiquitinerter Proteine in murinen BMDM unter einstündiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** **A)** Detektion poly-ubiquitinerter Proteine unter steigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen im Gesamtprotein von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen mittels Western Blot. Mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration kam es zu einer geringgradigen Akkumulation poly-ubiquitinerter Proteine in beiden Genotypen. **B)** Ladekontrolle des Western Blots mit GAPDH. Repräsentativer Western Blot aus n=3 Experimenten **C)** Densitometrische Auswertung der anti-Ubiquitin Western Blots. Diagramm zeigt Mittelwerte ± Standardfehler. n = 3 Experimente. n.s., nicht signifikant.

### 3.4 Die Zusammensetzung des 20S Kernkomplexes in LMP7-defizienten Makrophagen

Die folgenden Experimente hatten zum Ziel die Zusammensetzung des Proteasoms in BMDM von LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen zu untersuchen.

#### 3.4.1 mRNA Expression proteasomaler Untereinheiten in LMP7-defizienten Makrophagen

Um zu untersuchen welche Gene für proteasomale Untereinheiten in den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen exprimiert werden, wurde die mRNA aus nativen BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> und aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Die n-fache Expression der mRNA aus LMP7-defizienten BMDM wurde in Bezug zur LMP7-suffizienten Kontrolle ermittelt. Es wurden die konstitutiven ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5) und immunoproteasomalen (LMP2, MECL-1 und LMP7) katalytischen Untereinheiten bestimmt. (Abb. 11)

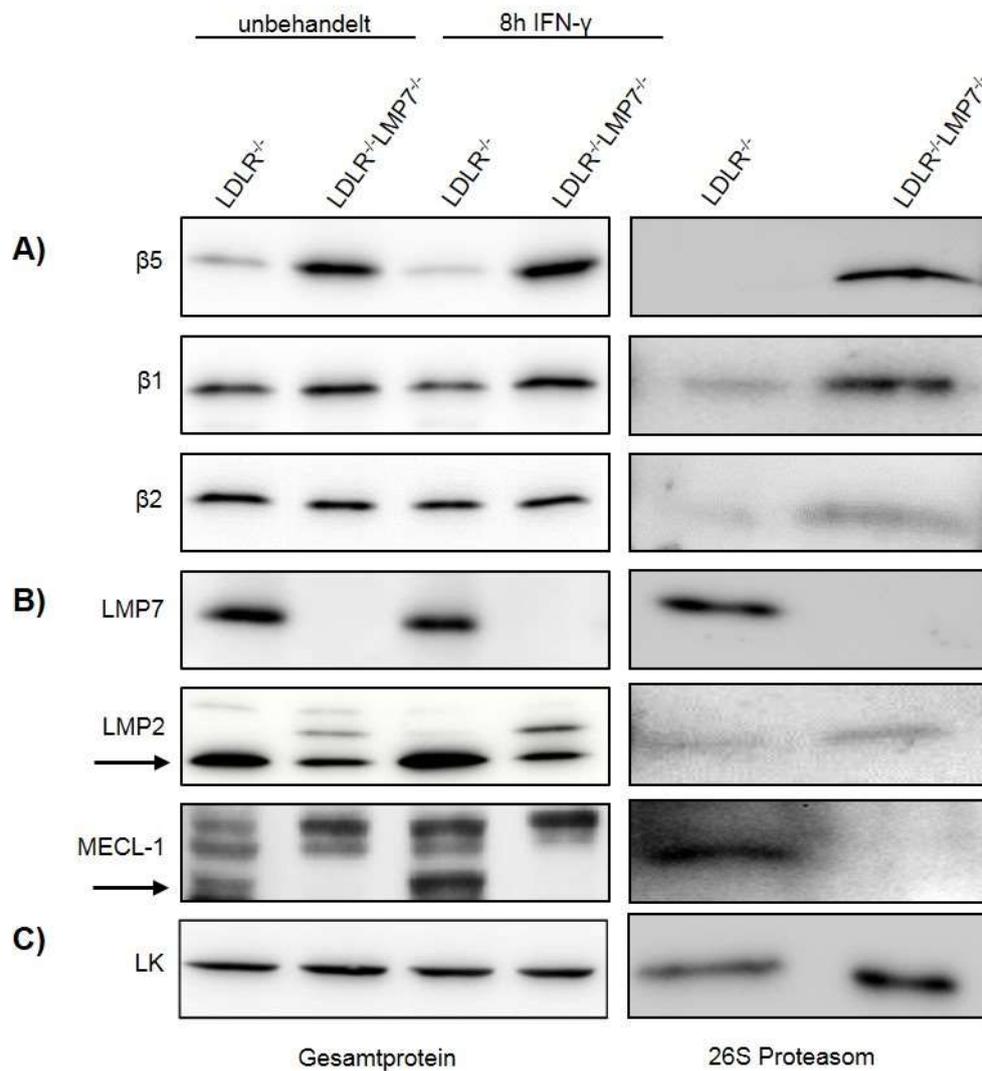


**Abb. 11: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die mRNA-Expression proteasomaler Untereinheiten in murinen BMDM.** Gezeigt wird die relative Expression der mRNA für die proteasomalen Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5, LMP2, MECL-1 und LMP7 in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zur deren Expression in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen. Alle Unterschiede zwischen den Genotypen waren statistisch nicht signifikant. Ergebnisse der Real-Time-PCR aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Auswertung erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode. Housekeeping Gen: RLP19. n.s. = nicht signifikant

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (außer für LMP7) zwischen der mRNA-Expression der konstitutiven Untereinheiten oder der Untereinheiten des IP zwischen den beiden Genotypen. Es konnte keine signifikante kompensatorische Überexpression des Gens für die konstitutive  $\beta$ 5-Untereinheit in LMP7-defizienten BMDM nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Konfiguration des 26S Proteasoms in LMP7-defizienten Makrophagen

Um nachzuweisen, welche proteasomalen Untereinheiten in LMP7-defizienten BMDM translatiert werden, wurden Western Blots aus dem Gesamtprotein der BMDM angefertigt. Zudem wurde geschaut, ob eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  Auswirkungen auf die Expression der proteasomalen Untereinheiten hat. Zum Nachweis einer Inkorporation der translatierten Untereinheiten in das 26S Proteasom wurde eine Nativ-PAGE durchgeführt. (Abb. 12)



**Abb. 12: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Zusammensetzung des Proteasoms in murinen BMDM.** Western Blot proteasomaler Untereinheiten im Gesamtprotein aus BMDM basal und nach IFN- $\gamma$  Stimulation (linke Spalte) und im isolierten 26S Proteasom (Native-PAGE, rechte Spalte) von BMDM aus  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$  Mäusen **A)** Expression konstitutiver proteasomaler Untereinheiten beider Genotypen. Links: Detektion im Gesamtprotein vor und nach IFN- $\gamma$  Stimulation. Rechts: Detektion im 26S Proteasom. **B)** Expression der immunoproteasomalen Untereinheiten LMP7, LMP2 (Pfeil) und MECL-1 (Pfeil). **C)** Ladekontrolle. Links:  $\beta$ -Actin. Rechts: proteasomale  $\alpha$ -4 Untereinheit.

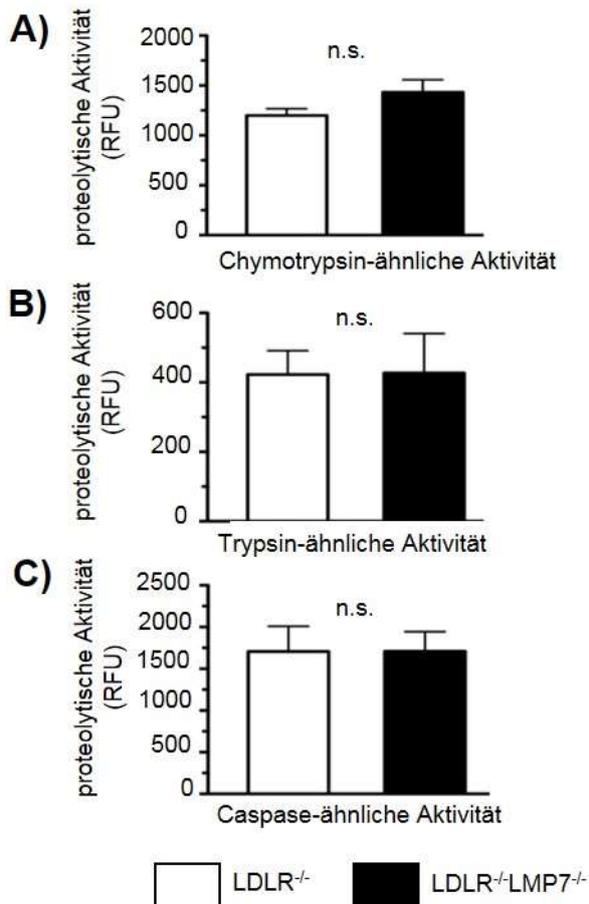
Im Gesamtproteinlysat LMP7-suffizienter BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen konnten basal, sowie nach IFN- $\gamma$  Stimulation alle konstitutiven und immunoproteasomalen Untereinheiten nachgewiesen werden. Im Gesamtprotein von LMP7-defizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden alle konstitutiven proteasomalen Untereinheiten basal und nach IFN- $\gamma$  Stimulation detektiert. Die Bande der konstitutiven  $\beta$ 5 Untereinheit erschien im Vergleich zu LMP7-suffizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen dichter. Während die LMP7-Untereinheit erwartungsgemäß im Gesamtprotein der BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nicht detektiert werden konnte, ließ sich die LMP2 Untereinheit sowohl basal als auch nach IFN- $\gamma$  Stimulation nachweisen. Im Vergleich zum Gesamtprotein der LMP7-suffizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen waren die Banden schwächer und es ließen sich pro-Formen des LMP2 nachweisen. Die MECL-1 Untereinheit ließ sich im Gesamtprotein aus LMP7-defizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nicht nachweisen.

In der Native-PAGE wurden die nativen Proteine der BMDM mittels Gelelektrophorese ohne vorhergehende Denaturierung in einem Gel aufgetrennt. Die Banden des 26S Proteasoms wurden mit Hilfe eines fluoreszierenden Substrats (SLVYVY-AMC) sichtbar gemacht und aus dem Gel isoliert. Die Detektion der proteasomalen Untereinheiten in den isolierten 26S Proteinen erfolgte anschließend mittels Western Blot.

Im per Nativ-PAGE isolierten 26S Proteasom der BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen konnten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, sowie die drei immunoproteasomalen Untereinheiten detektiert werden. Im 26S Proteasom von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden alle konstitutiven Untereinheiten nachgewiesen. Zudem konnte die immunoproteasomale Untereinheit LMP2 detektiert werden. Die MECL-1- und LMP7-Untereinheit waren wie im Gesamtprotein von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nicht detektierbar.

### **3.5 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität von Makrophagen**

Um zu untersuchen, ob die LMP7-Defizienz im Proteasom von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen die proteolytische Aktivität bzw. den Substratumsatz verändert, wurden Proteasomaktivitätsassays (PAA) durchgeführt. Bei dieser Methode wurden für die drei katalytischen, proteasomalen Untereinheiten (Chymotrypsin-ähnliche-, Trypsin-ähnliche-, und Caspase-ähnliche-Aktivität) jeweils spezifische Substrate verwendet. Durch die Verarbeitung durch das Proteasom kommt es zur Fluoreszenz der Substrate, welche photometrisch gemessen werden kann. Die vermessenen Gesamtproteasom-Extrakte stammten aus nativen Proteinlysaten von unbehandelten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Substratumsatz für die Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität zwischen den beiden Genotypen nachgewiesen werden. Über die Aktivität der katalytischen Zentren einzelner Proteasom-Subtypen kann mit diesem Experiment jedoch keine Aussage getroffen werden, da in diesem Ansatz die proteolytische Aktivität des Gesamt-Zelllysats untersucht wurde.



**Abb. 13: Einfluss der LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität des Proteasoms in murinen BMDM.** Gemessen wurde der Umsatz des jeweiligen Substrates (SLVVY-AMC, BzVGR-AMC, ZLLE-AMC) als relative fluoreszierende Einheiten (RFU) mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders. **A)** Chymotrypsin-ähnliche ( $\beta 5/LMP7$ ), **B)** die Trypsin-ähnliche ( $\beta 1/LMP2$ ) und **C)** die Caspase-ähnliche Aktivität ( $\beta 2/MECL-1$ ) des Gesamt-Zelllysats von BMDM aus  $LDLR^{-/-}$  und aus  $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$  Mäusen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n=4$  Experimenten. n.s.=  $p > 0,05$ .

## 4 Diskussion

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung der Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften von Makrophagen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine LMP7-Defizienz weder relevanten Einfluss auf die Reifung und Polarisierung von BMDM hat, noch die Proteinhomöostase unter oxidativen Stress beeinträchtigt. Eine vermehrte Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen oder ein vermindertes Zellüberleben unter oxidativem und inflammatorischen Stress konnte in den LMP7-defizienten BMDM nicht nachgewiesen werden. Zudem war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer LMP7-Defizienz in BMDM auf die Zusammensetzung des 26S Proteasoms und die proteolytische Aktivität zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des 26S Proteasoms durch die LMP7-Defizienz beeinflusst wird (u.a. Bildung von Intermediärproteasomen), jedoch die gesamtproteolytische Aktivität dadurch nicht verändert ist.

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit erörtert und im Kontext der bisher publizierten Literatur diskutiert.

### 4.1 LMP7-defizientes Mausmodell und LMP7-defiziente Makrophagen

#### 4.1.1 Besonderheiten des LMP7-defizienten Mausmodells

Die Bewertung und Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen im Kontext des gewählten Modells erfolgen. Für die Induktion einer Atherosklerose der Mäuse dieses Projektes wurde die LDLR<sup>-/-</sup> Maus gewählt. Um den Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Atherosklerose zu untersuchen, wurde die LDLR<sup>-/-</sup> Maus mit einer LMP7<sup>-/-</sup> Maus gekreuzt. Als Kontrollgruppe dienten LMP7-sufiziente LDLR-defiziente Wurfgeschwister. Das hat den Vorteil, dass die Kontrollgruppe bis auf die LMP7-Defizienz den gleichen genetischen Hintergrund besitzt. Ein solches Vorgehen wird empfohlen um genetische und epigenetische Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen auszuschließen.(56) Dies muss beim Vergleich der Ergebnisse mit Befunden von in der Diskussion zitierten Studien mit LMP7-defizienten Mausmodellen anderer Arbeitsgruppen berücksichtigt werden, da in vielen Studien keine Wurfgeschwister, sondern ein erworbener Mausstamm als Kontrollgruppe gewählt wurde. Gleichmaßen muss berücksichtigt werden, dass die Defizienz des LDLR einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann und den Vergleich mit anderen Studien zur LMP7-Defizienz erschwert. In der Literatur ist jedoch keine Wechselwirkung einer LDLR-Defizienz mit dem UPS beschrieben.

#### 4.1.2 Besonderheiten der LMP7-defizienten BMDM

Makrophagen sind für die Pathogenese der Atherosklerose von zentraler Bedeutung und stellen die vorrangigen Immunzellen in atherosklerotischen Plaques dar.(12, 57)

Murine Makrophagen können für Experimente auf verschiedene Arten gewonnen werden: Alveolar-Makrophagen werden primär *in vivo* aus der Lunge gewonnen und sind damit während ihrer Reifung einem nicht kontrollierbaren Zytokinmilieu ausgesetzt. Peritoneal-Makrophagen werden *in vivo* aus dem Peritoneum gewonnen, nachdem zuvor durch Einspritzen von LPS oder anderen Substanzen eine Peritonitis verursacht wurde. Diese Makrophagen stammen demnach aus einem massiv inflammatorischen Milieu. Die in dieser Arbeit verwendeten Makrophagen sind murine „Bone Marrow Derived Macrophages“. Hierbei werden Monozyten aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und mit Hilfe des Wachstumsfaktors M-CSF zu Makrophagen maturiert. M-CSF wird in atherosklerotischen Plaques von Endothelzellen sezerniert und die aus dem Blut eingewanderten Monozyten differenzieren sich unter diesem Stimulus im Gewebe zu Makrophagen.(12, 58) Die Methode der BMDM ist in wissenschaftlichen Experimenten etabliert und bietet den Vorteil, dass man mit M-CSF einen Stimulus verwendet, der auch in der Atherosklerose eine Rolle spielt.(58, 59) In dieser Arbeit konnte die Reifung der aus dem Knochenmark gewonnenen Vorläuferzellen zu BMDM durch einen hohen Anteil an gleichzeitiger Expression von CD11b und CD F4/80 bestätigt werden. F4/80 ist ein geeigneter Marker für reife Makrophagen, da er sich bis auf wenige Ausnahmen (metallophile Makrophagen in der Milz) auf allen Makrophagen-Subtypen nachweisen lässt. In Monozyten hingegen wird F4/80 nur gering exprimiert.(60) CD11b ist ein Integrin und kommt auf allen Leukozyten myeloischen Ursprungs vor. Dieses Oberflächenmolekül ist wichtig für eine Bindung an Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und somit ein wichtiger Teil der transendothelialen Migration.(61) Die in dieser Arbeit verwendeten BMDM bieten demnach aufgrund ihres Stimulus zur Maturierung und ihrer, durch Oberflächenmarker nachgewiesenen Eigenschaften, ein hinreichend geeignetes Modell im Hinblick auf die Fragestellung unter dem Aspekt der Atherosklerose. Im Vergleich der Ergebnisse anderer Studien muss jedoch der Bias unterschiedlicher Makrophagen-Modelle (BMDM vs. Alveolar-Makrophagen vs. Peritoneal-Makrophagen) und Stimuli (M-CSF vs. LPS) berücksichtigt werden.

## 4.2 Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf die Funktion von Makrophagen

### 4.2.1 Auswirkung der LMP7-Defizienz auf die BMDM Reifung

Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B Familie spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC).(62) Da das IP an der Regulation von NF- $\kappa$ B beteiligt ist(47), könnte sich die LMP7-Defizienz auf die Reifung von BMDM auswirken. Für von Monozyten abstammende Dendritische Zellen konnten *Naujokat et al.*, *Subklewe et al.*, sowie *Zinser et al.* zeigen, dass eine medikamentöse Proteasominhibition mit Bortezomib zu einer verminderten Expression wichtiger Oberflächenmoleküle sowie zu einer Einschränkung wichtiger Funktionen wie der Endozytose führt und somit die Reifung negativ beeinflusst.(63-65) *Naujokat et al.* konnten zudem zeigen, dass in DC die medikamentöse Proteasominhibition vor allem zu einer geringeren Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität führt.(63) In dieser Dissertation konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der Oberflächenmoleküle zwischen den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Reifung der LMP7-defizienten Monozyten zu BMDM nicht beeinträchtigt ist. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass an Tag 7 der *in vitro*-Reifung auch in der Zellzahl keine Unterschiede zwischen den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> und aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden konnten.

Gründe für die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Dissertation mit den o.g. Studien können mehrere Faktoren sein. Zum einen handelt es sich bei DC um einen anderen Zelltyp als in der vorliegenden Arbeit, zum anderen wurde bei den o.g. Studien die gesamte proteasomale (d.h. konstitutive und immunoproteasomale) Aktivität medikamentös mit einem Inhibitor gehemmt, während die BMDM dieser Dissertation eine genetische Defizienz der LMP7 Untereinheit aufweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen demnach, dass die Reifung der BMDM nicht von einer LMP7-Defizienz beeinflusst wird. Inwiefern die Reifung der BMDM von der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität abhängt, kann in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Um dies zu beantworten müsste die durch den Einbau der  $\beta$ 5-Untereinheit in das 26S Proteasom verbleibende Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen medikamentös durch einen  $\beta$ 5-spezifischen Inhibitor blockiert werden.

#### 4.2.2 Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Makrophagenpolarisation

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine LMP7-Defizienz in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen keinen Einfluss auf die Transkription von genetischen Markern der M1- und M2-Makrophagen im Vergleich zu LMP7-suffizienten BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen hat. Zum Teil übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich der M1-Polarisation zeigten sich in einer Studie von *S. Chen et al.* (66) In dieser Studie wurden LMP7-defiziente Alveolar-Makrophagen mit LPS und IFN- $\gamma$  zu M1-Makrophagen und mit IL-4 zu M2-Makrophagen polarisiert und die Expression von u.a. TNF- $\alpha$  und Arginase-1 gemessen. In Übereinstimmung zu den vorliegenden Ergebnissen konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  gemessen werden. Die Expression von Arginase-1 und weiteren M2-Markern war in Alveolar-Makrophagen mit LMP7-Defizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe bei *S. Chen et al.* jedoch signifikant erhöht. Zudem führte eine Behandlung von LMP7-suffizienten Makrophagen mit einem LMP7-spezifischen Inhibitor zu einer vermehrten M2-Polarisation. Die Autoren schlussfolgerten, dass die LMP7-Untereinheit einen hemmenden Einfluss auf die M2-Polarisation von Alveolar-Makrophagen hat und eine medikamentöse Inhibition der LMP7-Untereinheit durch eine vermehrte M2-Polarisation zu anti-inflammatorischen Effekten führen kann. (66) Der Diskrepanz zu dem vorliegenden Ergebnis könnten mehrere Faktoren zugrunde liegen. Obwohl als Stimulus zur M2-Polarisation in beiden Arbeiten IL-4 in gleicher Konzentration verwendet wurde, unterschieden sich die Inkubationszeiten dieser Dissertation mit denen von *S. Chen et al.* (6h versus 24h). Eine zeitlich spätere Hochregulation der Expression von Arginase-1 wäre möglich, um dies auszuschließen wären weitere Experimente mit Zeitkinetiken (6h, 12h und 24h) nötig. Darüber hinaus könnten die Unterschiede in dem untersuchten Maus- und Makrophagen-Modell (BMDM vs. Alveolar-Makrophagen) begründet sein. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mausmodell besitzt mit der LDLR-Defizienz einen anderen genetischen Hintergrund als das von *S. Chen et al.* verwendete Mausmodell. Zudem wurden als Kontrollgruppe bei *S. Chen et al.* keine Wurfgeschwister, sondern ein kommerziell erworbener C57BL/6J Mausstamm verwendet.

Weitere Hinweise auf die Frage, ob das Immunoproteasom bzw. die LMP7-Untereinheit einen Einfluss auf die Polarisation von Makrophagen hat, geben die Studien von *Reis et al.*, die den Einfluss des Immunoproteasoms auf durch LPS ausgelöste Signalkaskaden in murinen Makrophagen untersucht haben. (67, 68) LPS induziert in Makrophagen Signalkaskaden, die eine Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, VCAM-1 etc. induzieren, d.h. zu einer M1-Polarisation führen. *Reis et al.* untersuchten, inwiefern sich eine medikamentöse Inhibition durch *Lactacystin*, einem Proteasominhibitor mit primärer

Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, auf die Genexpression der LPS-abhängigen Signalwege auswirkt. Obwohl >90% der LPS-abhängigen Gene durch *Lactacystin* inhibiert wurden, war die Expression des inflammatorischen Mediators TNF- $\alpha$  kaum verändert.(68) Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wurde in dieser Studie eine kommerziell erworbene murine Makrophagen-Zelllinie verwendet und mit LPS als starkem inflammatorischen Stimulus gearbeitet, der zudem in der Pathogenese der Atherosklerose keine Bedeutung hat. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, sowie die Studien von *S. Chen et al.* und *Reis et al.* weisen unter Verwendung verschiedener Modelle darauf hin, dass die TNF- $\alpha$  Produktion von Makrophagen nach IFN- $\gamma$  oder LPS Stimulation nicht vom Immunoproteasom bzw. der LMP7-Untereinheit abhängig zu sein scheint.

### 4.3 Effekt der LMP7-Defizienz auf den Umgang der Makrophagen mit oxidativem Stress

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine LMP7-Defizienz in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen weder zu einer vermehrten Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen unter IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulation, noch zu einem verminderten Zellüberleben unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition führt. Diese Ergebnisse tragen zu einer kontrovers diskutierten Debatte über die Bedeutung des Immunoproteasoms für die Proteinhomeostase der Zelle unter Zytokin-induziertem oxidativen Stress bei. *Seiffert et al.* hatten berichtet, dass es in LMP7-defizienten murinen Fibroblasten unter IFN- $\gamma$  Stimulation zu einer vermehrten Anhäufung von poly-ubiquitinierten Proteinen kam. Zudem kam es unter LPS Stimulation in Leberzellen LMP7-defizienter Mäuse zu einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese defekten Proteine in LMP7-defizienten Fibroblasten zu *Aggresome-like induced structures* (ALIS) akkumulieren und diese Zellen vermehrt zur Apoptose neigen. Konsekutiv führe eine LMP7-Defizienz bei Mäusen dadurch zu einer Verschlechterung inflammatorischer Erkrankungen wie Autoimmunenkephalitis und Virusmyokarditis.(35, 38) *Nathan et al.* hingegen konnten diese Ergebnisse jedoch bei ähnlichem Versuchsaufbau in zwei unabhängigen Laboren nicht bestätigen.(39). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zu dieser Diskussion bei, indem die von *Seiffert et al.* beobachteten Auswirkungen einer LMP7-Defizienz nicht in Makrophagen nachgewiesen werden konnten. Wie in Kapitel 3.1.1. gezeigt, kommt es in LMP7-defizienten BMDM selbst unter hohen Dosen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu keiner Einschränkung des Überlebens gegenüber der LMP7-suffizienten Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Viabilität bei LMP7-Defizienz zeigen Studien von *Chen et al.*, die bei LMP7-defizienten Alveolar-Makrophagen mittels *Water soluble Tetrazolium salt cell viability assay* (WST) basal keine verminderte Viabilität im Vergleich zur LMP7-suffizienten

Kontrollgruppe nachweisen konnten.(69) Darüber hinaus kam es bei *Kirschner et al.* in LMP7-defizienten BMDM nach Pneumokokken-Exposition nicht zu signifikant erhöhter apoptotischer Aktivität im Vergleich zur LMP7-suffizienten Kontrollgruppe, währenddessen es bei medikamentöser Proteasominhibition in beiden Gruppen zur vermehrten Apoptose kam.(70) In Zusammenschau der *in vitro* Ergebnisse der o.g. Studien und den Ergebnissen dieser Dissertation (verschiedene Modelle, verschiedene Makrophagentypen, unterschiedlich untersuchte Apoptose- bzw. Viabilitätsmarker) ist ein vermindertes Überleben bei LMP7-defizienten Makrophagen unter inflammatorischen Stimuli nicht nachzuweisen. Im begleitenden *in vivo* Atherosklerosemodell dieser Dissertation konnten keine Unterschiede im Makrophagen-Gehalt und der Fläche des nekrotischen Kerns atherosklerotischer Plaques zwischen LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup>-Mäusen und LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen gefunden werden.(71) Dies unterstützt die Schlussfolgerung aus den *in vitro* Versuchen, dass eine LMP7-Defizienz keine viabilitätsmindernde Wirkung auf Makrophagen besitzt.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2 und 3.2.1 zeigen eine mögliche Erklärung für einen fehlenden Nachweis einer verminderten Viabilität der LMP7-defizienten BMDM. Im Gegensatz zu den bei *Seiffert et al.* untersuchten LMP7-defizienten Fibroblasten, kam es in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen weder unter Stimulation mit IFN- $\gamma$  noch unter Exposition von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer aggravierten Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen im Vergleich zur LMP7-suffizienten Kontrollgruppe. Eine Störung der Proteinhomöostase unter Zellstress mit nachfolgend verminderter Zellviabilität lag demnach nicht vor. Diese *in vitro* Ergebnisse sind mit den *in vivo* Ergebnissen der begleitenden Atherosklerose-Progressionsstudie vereinbar. Hier konnte kein erhöhter Ubiquitin-Gehalt in den atherosklerotischen Plaques von LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden.(71) Im Hinblick auf den inflammatorischen Aspekt der Atherosklerose und der Hypothese, dass das UPS in der Atherosklerose dysfunktional ist (27, 44), wäre im Falle einer Einschränkung der Proteinhomöostase in LMP7-defizienten Makrophagen ein erhöhter Ubiquitin-Gehalt in den atherosklerotischen Plaques von LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht auf eine gestörte Proteinhomöostase in LMP7-defizienten Makrophagen hin.

#### 4.4 Zusammensetzung des 20S Proteasoms bei LMP7-Defizienz in Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Inkorporation der  $\beta 5$ -Untereinheit anstelle der LMP7-Untereinheit im 26S Proteasom von BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass in den LMP7-defizienten BMDM konstitutives Proteasom sowie eine Intermediärproteasom-Form, bestehend aus konstitutiven Untereinheiten und der immunoproteasomalen Untereinheit LMP2, vorliegen. Da alle untersuchten Funktionen der LMP7-defizienten BMDM in dieser Arbeit gleichwertig zu den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen waren, ist anzunehmen, dass diese  $\beta 5$ -haltigen Proteasomen das Fehlen der LMP7-Untereinheit kompensieren können.

##### 4.4.1 Transkription der proteasomalen Untereinheiten

Interessanterweise konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der einzelnen proteasomalen Untereinheiten (Ausnahme LMP7) zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die basale Regulation der Proteasom-Zusammensetzung von BMDM nicht auf Transkriptionsebene stattfindet.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend zu *Joeris et al.*(72), die die Expression von mRNA der Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , LMP2 und MECL-1 in Lebergewebe von LMP7-defizienten und C57Bl6/N Mäusen basal sowie nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* verglichen haben. Basal konnten keine Unterschiede in der Expression von mRNA der Untereinheiten zwischen LMP7-defizienten und -suffizienten murinen Leberzellen festgestellt werden. Bei Lebergewebe handelt es sich mehrheitlich um nicht-immunologische Zellen, in denen nach einem inflammatorischen Stimulus das Immunoproteasom per *De-Novo-Synthese* gebildet wird. Passend dazu ließ sich nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine Hochregulation der mRNA der immunoproteasomalen Untereinheiten LMP2 und MECL-1 nachweisen. Jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den LMP7-defizienten und LMP7-suffizienten Leberzellen, obwohl analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Gesamtproteinlysat des Lebergewebes LMP7-defizienter Mäuse LMP2- und MECL-1-Untereinheiten vermindert nachzuweisen waren.(72) Daraus folgt, dass bei *Joeris et al.* in Zellen des Leberparenchyms, übereinstimmend mit den Ergebnissen in BMDM, die finale Regulation der Proteasom-Zusammensetzung nicht auf Transkriptionsebene stattfindet.

#### 4.4.2 Translation und Assemblierung der katalytischen Untereinheiten

Aus den Ergebnissen zur Transkription lässt sich schließen, dass in LMP7-defizienten BMDM basal die mRNA aller katalytischen Untereinheiten (außer LMP7) zunächst transkribiert wird. Die tatsächliche Proteasomkonfiguration entscheidet sich demnach erst bei der Translation oder der Assemblierung der translatierten Untereinheiten zum Proteasom. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl im Gesamtprotein als auch im 26S Proteasom der BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen alle konstitutiven proteasomalen Untereinheiten und die immunoproteasomale Untereinheit LMP2 nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Proteasomen in LMP7-defizienten BMDM um konstitutives Proteasom und um Intermediärproteasom (mit der Stöchiometrie  $\beta 5$ -LMP2- $\beta 2$ ) handelt. Darüber hinaus war im Gesamtprotein LMP7-defizienter BMDM eine Akkumulation der Vorstufe der LMP2-Untereinheit nachzuweisen, was darauf hinweist, dass die LMP2-Untereinheit in die Intermediärproteasomen LMP7-defizienter BMDM nicht so effektiv eingebaut wird wie in die Immunoproteasomen LMP7-suffizienter BMDM. Trotz eingeschränkter Aussagen zur Quantität der exprimierten Untereinheiten in Western Blots, legt die deutlichere Detektion der  $\beta 5$ -Untereinheit im Gesamtprotein LMP7-defizienter BMDM die Annahme nahe, dass diese Untereinheit kompensatorisch vermehrt in das konstitutive Proteasom und Intermediärproteasom LMP7-defizienter Makrophagen eingebaut wird.

Übereinstimmende Daten zu diesen Ergebnissen finden sich bei *Kirschner et al.*(70) Die Autoren konnten im Gesamtprotein LMP7-defizienter BMDM die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten und die immunoproteasomalen Untereinheiten LMP2 sowie marginal MECL-1 nachweisen. Analog zu dieser Dissertation kam es bei *Kirschner et al.* zum verminderten Einbau der LMP2-Untereinheit bei gleichzeitig vermehrtem Einbau der konstitutiven  $\beta 5$ -Untereinheit in aufgereinigte 20S Proteasomen LMP7-defizienter BMDM. Die MECL-1-Untereinheit konnte im Gegensatz zur vorliegenden Dissertation marginal nachgewiesen werden.(70)

Weitere übereinstimmende Ergebnisse zur Proteasomkonfiguration bei LMP7-defizienten Makrophagen zeigen *Bitzer et al.*(73) Die Autoren konnten im Gesamtprotein LMP7-defizienter Peritoneal-Makrophagen, in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, die LMP2-Untereinheit mit einer begleitenden Akkumulation der LMP2-Vorstufe nachweisen. Gleichzeitig kam es kompensatorisch zu einer erhöhten Expression der  $\beta 5$ -Untereinheit.(73) Diese Daten stützen die aktuellen Ergebnisse und weisen darauf hin, dass die in BMDM gezeigten Ergebnisse auch auf andere murine Makrophagen-Modelle übertragbar sind.

Lange galt das Dogma, die LMP7-Untereinheit werde bei der Assemblierung für einen Einbau der LMP2- und MECL-1-Untereinheiten benötigt.(74) Es wurde angenommen, dass bei der Assemblierung des Immunoproteasoms die Vorform pro-LMP7 benötigt wird um LMP2 und MECL-1 enthaltende  $\beta$ -Ringe zusammenzufügen. Die Vorform Pro- $\beta$ 5 hingegen beschränkt den Einbau auf  $\beta$ -Ringe, welche ausschließlich die konstitutiven Untereinheiten  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 enthalten, selbst wenn die LMP7-Untereinheit fehlt.(74, 75) Die Ergebnisse der o.g. Studien und der Nachweis eines Intermediärproteasoms in den BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass es ebenfalls zu einem Einbau der LMP2- und MECL-1-Untereinheiten kommen kann, wenn die LMP7-Untereinheit fehlt und ausschließlich die  $\beta$ 5-Untereinheit vorhanden ist. Daraus lässt sich schließen, dass die LMP7- und  $\beta$ 5-Untereinheiten beide zur Inkorporation der LMP2- und MECL-1-Untereinheiten in der Lage sind. Die vermehrte Detektion von LMP2-Vorstufen bei LMP7-Defizienz weist jedoch auf eine höhere Affinität der LMP7-Untereinheit zur Assemblierung von  $\beta$ -Ringen, die LMP2- und MECL-1-Untereinheiten enthalten, hin.

#### **4.5 Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf die proteolytische Aktivität der Proteasomen in Makrophagen**

Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Auswirkungen einer LMP7-Defizienz auf die untersuchten Funktionen der BMDM findet sich in den Ergebnissen der Untersuchung der proteolytischen Aktivität. Im Aktivitätsassay zeigt sich für alle drei katalytischen Aktivitäten (Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche und Caspase-ähnliche Aktivität) kein signifikanter Unterschied zwischen den Lysaten von LMP7-defizienten und -suffizienten BMDM (Abb. 13). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch bedacht werden, dass diese Messung die gesamte proteolytische Aktivität der BMDM widerspiegelt. So wird nicht die Aktivität eines einzelnen Proteasom-Subtyps bestimmt, sondern die gemessene Aktivität basiert auf allen Proteasom-Komplexen der Zellen (20S, 26S, 20S-PA28, Intermediärproteasom). Diese Ergebnisse sind damit nicht mit Messungen von isolierten, aufgereinigten Proteasomen vergleichbar.

Diese Einschränkung muss bei der Betrachtung und dem Vergleich der Ergebnisse mit anderen Messungen proteolytischer Aktivitäten von Proteasom-Subtypen und deren Kinetik in der Literatur berücksichtigt werden. In einer Arbeit von *Gaczynska et al.*(76) wurde die LMP7- bzw. LMP2-Untereinheit durch Transfektion von cDNA in humanen HeLa Zellen (welche kaum Immunoproteasom besitzen) überexprimiert. Die Überexpression der LMP7-Untereinheit führte zu einem 36%igen Anstieg der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) in der

Verarbeitung von Suc-VLLY-AMC (Substrat der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität). Anhand dieser Ergebnisse schlossen die Autoren auf eine erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der LMP7-Untereinheit. Im Gegensatz dazu zeigten *Raule et al.*(77), dass das konstitutive Proteasom (isoliertes 26S Proteasom aus Muskelgewebe) gegenüber dem Immunoproteasom (isoliertes 26S Proteasom aus Milzgewebe) in Ratten eine höhere  $V_{max}$  und eine niedrigere Michaelis-Konstante ( $K_m$ -Wert) in der Verarbeitung des Substrats der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität besitzt. Das würde auf eine höhere Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der konstitutiven Untereinheit  $\beta 5$  schließen lassen. Dies konnte in weiteren Arbeiten, in denen eine höhere Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in Thymus, Milzzellen sowie in BMDM aus LMP7-defizienten Mäusen gegenüber LMP7-suffizienten Zellen gezeigt wurde, bestätigt werden. (70, 78) Die Messungen der letzteren beiden Arbeiten beziehen sich jedoch auf isoliertes, aufgereinigtes 20S Proteasom. Somit lassen sich die bisherigen Arbeiten nur bedingt mit den Befunden dieser Arbeit vergleichen.

Die LMP7-Defizienz führt in BMDM zu keinem signifikanten Unterschied im Substratumsatz der Gesamt-Proteasom-Komplexe. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die LMP7-Defizienz durch den vermehrten Einbau der  $\beta 5$ -Untereinheit funktionell kompensiert wird.

## 4.6 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Defizienz der LMP7-Untereinheit keine nachteiligen Auswirkungen auf relevante, mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziierten, Funktionen von Makrophagen hat. Die LMP7-Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Reifung oder die Polarisation von Makrophagen. Dies wäre hinsichtlich der inflammatorischen Genese der Atherosklerose von Bedeutung gewesen, da die Polarisation von Gewebsmakrophagen den Verlauf der Atherosklerose beeinflussen kann.(79) Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine LMP7-Defizienz bei Vorliegen von oxidativem Stress weder zu einer Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen, noch zu einem verminderten Zellüberleben in Makrophagen führt. Übereinstimmend dazu kam es in der begleitenden Atherosklerose-Progressionsstudie in  $LDLR^{-/-}LMP7^{-/-}$  Mäusen zu keiner Veränderung der Plauegröße und -komposition (Makrophagen-Gehalt, Ubiquitin-Gehalt der Plauezellen, Größe des nekrotischen Kerns).(71) In der Zusammenschau ergeben die *in vitro* und *in vivo* Befunde keinen Hinweis auf eine gestörte Proteinhomöostase von Makrophagen mit LMP7-Defizienz. Diese Ergebnisse tragen zur aktuellen Debatte über den Stellenwert der LMP7-Untereinheit beim Erhalt der Proteinhomöostase unter Zytokin-induziertem, oxidativen Stress

sowie bei der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen bei.(38-40) In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die LMP7-Defizienz von Makrophagen mit der Bildung veränderter Proteasom-Subtypen einhergeht. Trotz des Einbaus der  $\beta$ 5-Untereinheit anstelle der LMP7-Untereinheit in Proteasomen LMP7-defizienter Makrophagen konnte keine veränderte proteolytische Aktivität der Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte eine Erklärung für den Erhalt der Proteinhomöostase und den Erhalt der potenziell Atherosklerose-relevanten Funktionen in LMP7-defizienten Makrophagen darstellen.

Ausgehend von diesen Daten ergeben sich neue Perspektiven zur weiteren Erforschung der Rolle des Immunproteasoms bzw. der LMP7-Untereinheit auf die Funktion in Makrophagen und deren Auswirkungen auf die Pathogenese der Atherosklerose. Die vorliegende Arbeit zeigt beim Vorliegen einer LMP7-Defizienz in Makrophagen trotz veränderter Proteasom-Subtypen einen Erhalt der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Dies stellt eine Besonderheit des Modells der genetischen LMP7-Defizienz dar. Übereinstimmende Ergebnisse liefern Studien von *Basler et al.*, die die inflammatorische Rolle der LMP7-Untereinheit in Autoimmunerkrankungen untersucht haben.(43) Die Autoren konnten zeigen, dass Inhibition und Defizienz der LMP7-Untereinheit unterschiedliche Auswirkungen auf die Ausbildung einer murinen Autoimmunenzephalitis (EAE) haben. In LMP7-suffizienten Mäusen beeinflusste eine medikamentöse LMP7-Inhibition den Krankheitsverlauf einer EAE positiv. Für Mäuse mit genetischer LMP7-Defizienz konnte gezeigt werden, dass die, durch den Einbau der  $\beta$ 5-Untereinheit erhaltene, Chymotrypsin-ähnliche Aktivität die inflammatorischen Prozesse unterhält. Erst mit einer medikamentösen  $\beta$ 5-Inhibition konnte der Krankheitsverlauf bei LMP7-Defizienz positiv beeinflusst werden.

Bei der EAE handelt es sich, ähnlich der Atherosklerose, um ein inflammatorisches Geschehen, in deren Pathogenese Immunzellen eine tragende Rolle einnehmen. Verknüpft man die Ergebnisse von *Basler et al.*, sowie die vorliegende Arbeit mit den Erkenntnissen bisheriger Studien zur Auswirkung einer Proteasominhibition in der Atherosklerose (52-54), ergeben sich angesichts der Entwicklung neuer spezifischer Proteasomeninhibitoren neue Perspektiven für weitere Studien, die nachfolgend erläutert werden sollen.

#### **4.7 Zukünftige Studien mit LMP7-selektiven Proteasominhibitoren**

Für das UPS wurde eine duale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose postuliert.(27) Dementsprechend kamen Studien zur Auswirkung einer Proteasominhibition in der

Atherosklerose zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während für die frühen Stadien der Atherosklerose ein protektiver Effekt durch eine Proteasominhibition mit Bortezomib gezeigt werden konnte(54), wurden in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques unter Bortezomib-Therapie Marker einer vermehrten Plaque-Instabilität beobachtet.(52, 53) Im Gegensatz zu Bortezomib, welches gleichermaßen die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der LMP7- und  $\beta$ 5-Untereinheit hemmt, besitzen neuere Proteasominhibitoren wie ONX 0914 eine 20-40fach höhere Selektivität für die LMP7-Untereinheit als für die  $\beta$ 5-Untereinheit. In Immunzellen, in denen vorrangig Immunoproteasom exprimiert wird, kam es unter ONX 0914 zu einer nahezu kompletten Inhibition der LMP7 Untereinheit, ohne Beeinträchtigung der Aktivität der LMP2- und MECL-1-Untereinheiten. Darüber hinaus konnte, im Gegensatz zu einer unselektiven Proteasominhibition, keine Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen nachgewiesen werden.(80)

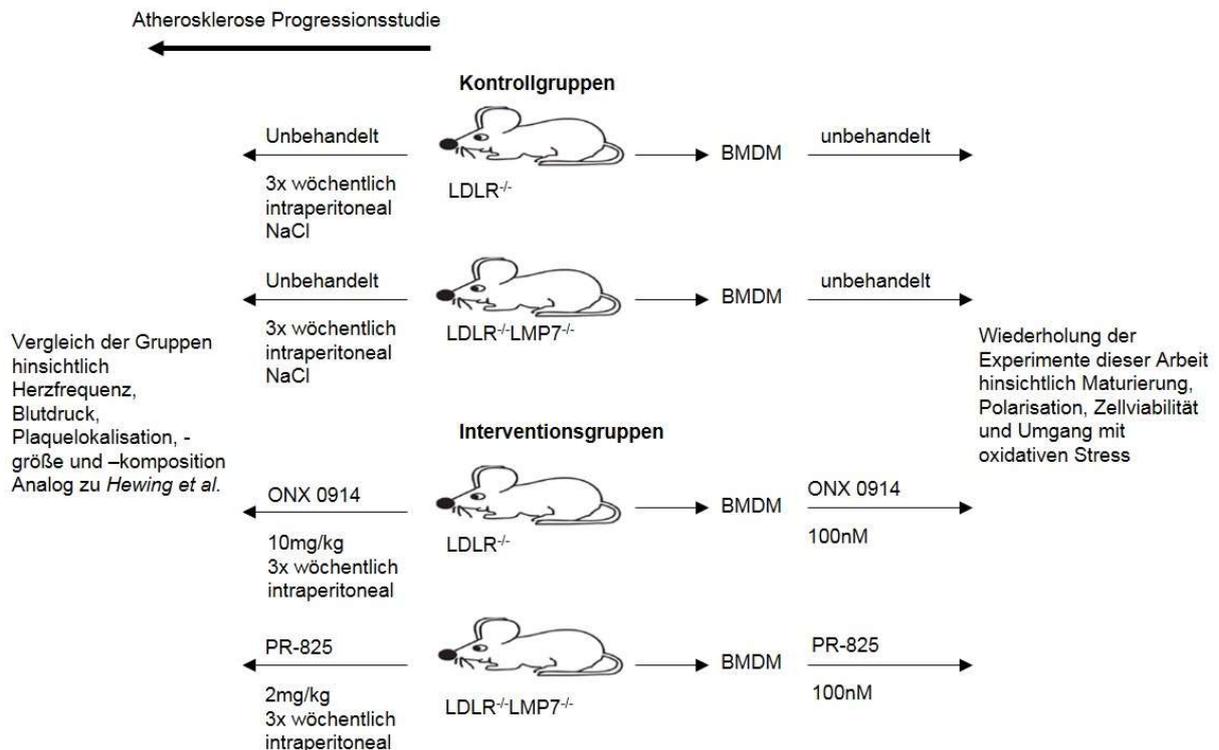
Für eine Anwendung von ONX 0914 in einem Atherosklerose-Modell ergäben sich im Hinblick auf Makrophagen demnach Vorteile: Durch die LMP7-Selektivität wird nur die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in Immunzellen gehemmt. Andere Zelltypen, in denen vorrangig konstitutives Proteasom exprimiert wird, sind nicht betroffen. Dies führt zu erheblich weniger zytotoxischen Nebenwirkungen als bei einer unspezifischen Proteasominhibition wie z.B. mit Bortezomib. Zudem führt eine Proteasominhibition mit Bortezomib wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, in BMDM zu einer Einschränkung der Proteinhomöostase. (Vgl. Abb. 10) Durch den Erhalt der Proteinhomöostase in Makrophagen und den Wegfall der zytotoxischen Nebenwirkungen auf andere Zelltypen, könnte sich seine LMP7-selektive Inhibition mit ONX 0914 positiv auf eine Plaque-Stabilisierung auswirken. Gleichzeitig könnten mögliche inflammatorische Eigenschaften der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in Makrophagen durch die LMP7-Selektivität von ONX 0914 besser untersucht werden, als im Modell einer genetischen LMP7-Defizienz. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Kompensation der genetischen LMP7-Defizienz durch veränderte Proteasom-Zusammensetzung (Adaptation durch kompensatorischen Einbau der  $\beta$ 5 Untereinheit) und damit einhergehender erhaltener Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität, kann durch die akuten Effekte einer LMP7-selektiven Inhibition nicht stattfinden.

Daraus ergeben sich Entwürfe für weitere Experimente, um den Einfluss der LMP7-Untereinheit auf Atherosklerose-assoziierte Funktionen von Makrophagen zu untersuchen.

Um genauer zu untersuchen welche Funktionen der Makrophagen direkt von der LMP7-Untereinheit abhängen, müsste ein Studiendesign vier Gruppen beinhalten. Als

Kontrollgruppen werden BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen, sowie LMP7-suffiziente BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet. Die erste Interventionsgruppe besteht aus BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, welche mit ONX 0914 behandelt werden. Die zweite Interventionsgruppe besteht aus BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup>LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen, welche mit einem β5-selektiven Proteasominhibitor behandelt werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit BMDM müssten an den vier Gruppen wiederholt werden. Bei den Experimenten der Makrophagen-Polarisation sollte zusätzlich eine Zeitkinetik wie in Kapitel 4.2.2 erläutert erfolgen. Zusätzlich sollte an diesen vier Studienarmen eine *in vivo* Atherosklerose Progressionsstudie analog zu *Hewing et al.* durchgeführt werden.(71) Für die Dosierung von ONX 0914 bzw. dem β5-selektiven Proteasominhibitor PR-825 für die *in vitro* Experimente der BMDM könnten initial analog zu *Muchamel et al.* (100nM) gewählt werden. (80) Für die *in vivo* Studie sollten die Mäuse der Interventionsgruppen dreimal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion der Inhibitoren in Dosierungen von 10mg/kg Körpergewicht für ONX 0914 und 2mg/kg Körpergewicht für PR-825 erhalten.(43)

Einen Überblick über ein mögliches Studiendesign gibt Abbildung 14.



**Abb. 14: Mögliches Studiendesign zur weiteren Erforschung der Rolle der LMP7 Untereinheit auf die Pathogenese der Atherosklerose *in vivo* und *in vitro*.**

## Literaturverzeichnis

1. Dahlof B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol.* 2010;105(1 Suppl):3A-9A.
2. Lloyd-Jones DM. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation.* 2010;121(15):1768-77.
3. WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011.
4. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
5. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999;340(2):115-26.
6. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet.* 2004;364(9438):937-52.
7. Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* 2006;449(1):96-103.
8. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977.
9. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
10. Kwon GP, Schroeder JL, Amar MJ, Remaley AT, Balaban RS. Contribution of macromolecular structure to the retention of low-density lipoprotein at arterial branch points. *Circulation.* 2008;117(22):2919-27.
11. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine.* 2005;26(1-2):33-65.
12. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.
13. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine.* 2011;17(11):1410-22.
14. Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clin Sci (Lond).* 2013;125(5):221-35.
15. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145(3):341-55.
16. Mills CD. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:212.
17. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
18. Williams HJ, Fisher EA, Greaves DR. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis: opportunities for therapeutic intervention? *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):498-508.
19. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology.* 2008;8(12):958-69.
20. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Sobenin IA, Orekhov AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *International Journal of Cardiology.* 2015;184:436-45.
21. Stoger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;225(2):461-8.

22. Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*. 1998;67(1):425-79.
23. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*. 1996;65(1):801-47.
24. Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, Lewinson O, Haj-Yahya M, Hejjaoui M, Lashuel Hilal A, Sommer T, Brik A, Ciechanover A. The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation. *Molecular cell*. 2012;48(1):87-97.
25. Glickman MH, Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*. 2002;82(2):373-428.
26. Ciechanover A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(1):86-96.
27. Wilck N, Ludwig A. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(17):2344-63.
28. Dahlmann B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;591:132-40.
29. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009;85(1):12-36.
30. Kniepert A, Groettrup M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39(1):17-24.
31. Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *Journal of Immunology Research*. 2015;2015:541984.
32. Huber Eva M, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk Christopher J, Groettrup M, Groll M. Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell*. 2012;148(4):727-38.
33. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. [gamma]-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*. 1993;365(6443):264-7.
34. Groettrup M, Ruppert T, Kuehn L, Seeger M, Standera S, Koszinowski U, Kloetzel PM. The Interferon- $\gamma$ -inducible 11 S Regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 Subunits Govern the Peptide Production by the 20 S Proteasome in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(40):23808-15.
35. Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner FL, Volker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Kruger E, Kloetzel PM, Voigt A. Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002233.
36. Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, Welsh RM, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rock KL. Mice completely lacking immunoproteasomes display major alterations in antigen presentation. *Nature immunology*. 2012;13(2):129-35.
37. Szeto J, Kaniuk NA, Canadien V, Nisman R, Mizushima N, Yoshimori T, Bazett-Jones DP, Brumell JH. ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*. 2006;2(3):189-99.
38. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel P-M, Krüger E. Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell*. 2010;142(4):613-24.

39. Nathan James A, Spinnenhirn V, Schmidtke G, Basler M, Groettrup M, Goldberg Alfred L. Immuno- and Constitutive Proteasomes Do Not Differ in Their Abilities to Degrade Ubiquitinated Proteins. *Cell*. 2013;152(5):1184-94.
40. Ebstein F, Voigt A, Lange N, Warnatsch A, Schröter F, Prozorovski T, Kuckelkorn U, Aktas O, Seifert U, Kloetzel P-M, Krüger E. Immunoproteasomes Are Important for Proteostasis in Immune Responses. *Cell*. 2013;152(5):935-7.
41. Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. Immunoproteasome Subunit LMP7 Deficiency and Inhibition Suppresses Th1 and Th17 but Enhances Regulatory T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2012;189(8):4182-93.
42. Basler M, Mundt S, Bitzer A, Schmidt C, Groettrup M. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2015;33(4 Suppl 92):S74-9.
43. Basler M, Mundt S, Muchamuel T, Moll C, Jiang J, Groettrup M, Kirk CJ. Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(2):226-38.
44. Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, Lerman A. Potential Role of the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Aspects of a Protein Quality Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(21):2003-10.
45. Röcken C, Tautenhahn J, Bühling F, Sachwitz D, Vöckler S, Goette A, Bürger T. Prevalence and Pathology of Amyloid in Atherosclerotic Arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(3):676-7.
46. Herrmann J, Edwards WD, Holmes Jr DR, Shogren KL, Lerman LO, Ciechanover A, Lerman A. Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(11):1919-27.
47. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-63.
48. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity*. 1995;2(5):493-506.
49. Chapple SJ, Siow RCM, Mann GE. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012;44(8):1315-20.
50. Ogura M, Ayaori M, Terao Y, Hisada T, Iizuka M, Takiguchi S, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Nakaya K, Sasaki M, Komatsu T, Ozasa H, Ohsuzu F, Ikewaki K. Proteasomal Inhibition Promotes ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 Expression and Cholesterol Efflux From Macrophages In Vitro and In Vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(9):1980-7.
51. Wang F, Lerman A, Herrmann J. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerotic cardiovascular disease. *American Journal of Cardiovascular Disease*. 2015;5(1):83-100.
52. Herck JL, Meyer GRY, Martinet W, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic Research in Cardiology*. 2009;105(1):39-50.
53. Wilck N, Fechner M, Dan C, Stangl V, Stangl K, Ludwig A. The Effect of Low-Dose Proteasome Inhibition on Pre-Existing Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
54. Wilck N, Fechner M, Dreger H, Hewing B, Arias A, Meiners S, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Ludwig A. Attenuation of Early Atherogenesis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice by Proteasome Inhibition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(6):1418-26.

55. Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008;2008(12):pdb.prot5080.
56. Holmdahl R, Malissen B. The need for littermate controls. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):45-7.
57. Moore KJ, Tabas I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55.
58. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(18):8264-8.
59. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008;Chapter 14:Unit 14 1.
60. van den Berg TK, Kraal G. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends in immunology*. 2005;26(10):506-9.
61. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, Bennett M. Monocyte/Macrophage Suppression in CD11b Diphtheria Toxin Receptor Transgenic Mice Differentially Affects Atherogenesis and Established Plaques. *Circulation research*. 2007;100(6):884-93.
62. Ammon C, Mondal K, Andreesen R, Krause SW. Differential Expression of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B during Human Mononuclear Phagocyte Differentiation to Macrophages and Dendritic Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;268(1):99-105.
63. Naujokat C, Berges C, Höh A, Wieczorek H, Fuchs D, Ovens J, Miltz M, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V. Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 2007;120(1):120-32.
64. Zinser E, Rößner S, Littmann L, Lüftenegger D, Schubert U, Steinkasserer A. Inhibition of the proteasome influences murine and human dendritic cell development in vitro and in vivo. *Immunobiology*. 2009;214(9):843-51.
65. Subklewe M, Sebelin-Wulf K, Beier C, Lietz A, Mathas S, Dörken B, Pezzutto A. Dendritic Cell Maturation Stage Determines Susceptibility to the Proteasome Inhibitor Bortezomib. *Human Immunology*. 2007;68(3):147-55.
66. Chen S, Kammerl IE, Vosyka O, Baumann T, Yu Y, Wu Y, Irmeler M, Overkleeft HS, Beckers J, Eickelberg O, Meiners S, Stoeger T. Immunoproteasome dysfunction augments alternative polarization of alveolar macrophages. *Cell Death Differ*. 2016.
67. Reis J, Guan XQ, Kisselev AF, Papsian CJ, Qureshi AA, Morrison DC, Van Way CW, Vogel SN, Qureshi N. LPS-Induced Formation of Immunoproteasomes: TNF- $\alpha$  and Nitric Oxide Production are Regulated by Altered Composition of Proteasome-Active Sites. *Cell biochemistry and biophysics*. 2011;60(1-2):77-88.
68. Qureshi N, Morrison DC, Reis J. Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823(11):2087-93.
69. Chen S. Molecular mechanism of alveolar macrophage polarization and cell communication with alveolar epithelial cell. 2015.
70. Kirschner F, Reppe K, Andresen N, Witzernath M, Ebstein F, Kloetzel P-M. Proteasome  $\beta$ 5i Subunit Deficiency Affects Opsonin Synthesis and Aggravates Pneumococcal Pneumonia. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153847.
71. Hewing B, Ludwig A, Dan C, Pötzsch M, Hannemann C, Petry A, Lauer D, Görlach A, Kaschina E, Müller DN, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Wilck N. Immunoproteasome subunit  $\beta$ 5i/LMP7-deficiency in atherosclerosis. *Scientific Reports*. 2017;7:13342.

72. Joeris T, Schmidt N, Ermert D, Krienke P, Visekruna A, Kuckelkorn U, Kaufmann SHE, Steinhoff U. The Proteasome System in Infection: Impact of  $\beta 5$  and LMP7 on Composition, Maturation and Quantity of Active Proteasome Complexes. PLoS ONE. 2012;7(6):e39827.
73. Bitzer A, Basler M, Krappmann D, Groettrup M. Immunoproteasome subunit deficiency has no influence on the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation. Molecular Immunology. 2017;83:147-53.
74. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA. Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-inducible Subunits. The Journal of experimental medicine. 1998;187(1):97-104.
75. Kingsbury DJ, Griffin TA, Colbert RA. Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. J Biol Chem. 2000;275(31):24156-62.
76. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(20):9213-7.
77. Raule M, Cerruti F, Cascio P. Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2014;1843(9):1942-7.
78. Stohwasser R, Kuckelkorn U, Kraft R, Kostka S, Kloetzel PM. 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. FEBS Letters. 1996;383(1-2):109-13.
79. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston A-T, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis. PLoS ONE. 2010;5(1):e8852.
80. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ, Groettrup M. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. Nature medicine. 2009;15(7):781-7.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Max Pöttsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Auswirkungen einer Defizienz der proteasomalen Untereinheit  $\beta 5$ /LMP7 auf die Funktion von Monozyten und Makrophagen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

**Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Max Pöttsch hatte Anteil an folgender Publikation:

Publikation: Hewing B, Ludwig A, Dan C, **Pöttsch M**, Hannemann C, Petry A, Lauer D, Görlach A, Kaschina E, Müller DN, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Wilck N. *Immunoproteasome subunit  $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis*. Scientific Reports, 2017. 7: p. 13342.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der Experimente, Datengewinnung und Datenanalyse zu den Grafiken:  
2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 3B, 3C, S5, S6, S7
- Revision des Manuskriptes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Bearbeitung desselbigen am molekularbiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin möchte ich Frau Prof. Dr. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. Karl Stangl herzlich danken.

PD Dr. med. Bernd Hewing und PD Dr. rer. nat. Antje Ludwig danke ich für die gute umfassende Betreuung, die immerwährende positive Energie für das Projekt, die Motivation und vor allem für das nette Miteinander.

Dem gesamten Team „der alten Ziegelstraße“ und des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere Angela Zepp, Minoo Moobed, Angelika Westphal, Anke Stach, Susanne Metzchow und Andrea Weller danke ich für die ständige Hilfe und Hilfsbereitschaft, sowie fachliche Einarbeitung.

Es sei mir gestattet den größten Dank an dieser Stelle meinen Eltern und meiner Familie auszusprechen, ohne deren Unterstützung und ständiges Antreiben weder das Studium, noch diese Dissertation möglich gewesen wären.

Danke.