

Aus dem Comprehensive Pneumology Center Munich (CPC)  
Institut für experimentelle Pneumologie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
Kommissarische Leitung: Dr. Antje Brand

*Einfluss von Zigarettenrauch auf Komposition und Aktivität des Proteasoms  
in humanen PBMCs*

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Julia Peierl, geb. Schimmer

aus  
Neuburg a.d. Donau

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin:	Prof. Dr. Silke Meiners
Mitberichterstatler:	PD Dr. Kathrin Kahnert Prof. Dr. Vigo Heissmeyer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Oliver Vosyka
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	23.07.2020

## Inhalt

1	Einleitung .....	6
1.1	Zigarettenrauch .....	6
1.1.1	Epidemiologie .....	6
1.1.2	Molekulare Effekte von Zigarettenrauch .....	6
1.1.3	Zigarettenrauch in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung.....	7
1.2	Das Proteasom .....	11
1.2.1	Funktion und Aufbau des Proteasoms.....	11
1.2.2	Das Immunoproteasom .....	12
1.2.3	Regulation des Proteasoms.....	14
1.3	Das Proteasom unter Einfluss von Zigarettenrauch und bei COPD ...	17
1.3.1	Regulation des Proteasoms durch oxidativen Stress .....	17
1.3.2	Regulation der proteasomalen Expression und Aktivität .....	19
1.4	Zielsetzung.....	21
2	Materialien.....	22
2.1	Materialien für die Blutabnahme.....	22
2.2	Materialien für den Cotinin-ELISA .....	22
2.3	Materialien für die Durchflusszytometrie .....	22
2.4	Materialien für die PBMC-Präparation und Zellzählung.....	23
2.5	Materialien für die RNA-Analyse .....	23
2.6	Materialien für die Proteinbiochemie .....	26
2.6.1	Antikörper .....	26
2.6.2	Kits.....	26
2.6.3	Puffer und Lösungen .....	27
2.7	Materialien für FASP-Verdau und HPLC-Massenspektrometrie.....	28
2.7.1	Allgemeine Materialien .....	28
2.7.2	Puffer und Lösungen .....	28
2.8	Materialien für die Aktivitätsbestimmungen .....	29
2.9	Weitere Puffer und Lösungen.....	29
2.10	Reagenzien .....	29
2.11	Allgemeiner Laborbedarf .....	32
2.12	Software .....	34

3	Methoden .....	35
3.1	Probandenakquise und -kollektiv .....	35
3.2	Venöse Blutentnahme .....	35
3.3	Cotinin-ELISA.....	36
3.4	Durchflusszytometrische Analyse .....	37
3.5	PBMC-Präparation .....	42
3.6	Zellzählung.....	42
3.7	RNA-Analyse.....	43
3.7.1	RNA-Extraktion.....	43
3.7.2	Reverse Transkription.....	44
3.7.3	DNase Verdau .....	44
3.7.4	RT-qPCR.....	45
3.8	Lyse des PBMC-Pellets zur Proteinextraktion .....	48
3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	49
3.10	Massenspektrometrie .....	49
3.10.1	FASP-Verdau (Filter-aided sample preparation-Verdau).....	49
3.10.2	HPLC-Massenspektrometrie.....	50
3.11	Westernblot-Analyse .....	51
3.11.1	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	51
3.11.2	Native Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	53
3.11.3	Immunoblotting SDS-Gele .....	53
3.11.4	Immunoblot Nativgel .....	53
3.11.5	Proteindetektion.....	53
3.12	Ermittlung der proteasomalen Aktivität.....	54
3.12.1	Fluoreszenz-Assay .....	54
3.12.2	Activity-based protein profiling.....	55
3.13	Auswertung .....	56
3.13.1	Densitometrische Auswertung der Daten .....	56
3.13.2	Statistische Auswertung der Daten.....	57
4	Ergebnisse .....	58
4.1	Cotinin-ELISA.....	58
4.2	Durchflusszytometrische Analyse .....	58
4.3	RNA-Expressionsanalyse.....	60

4.4	Protein-Expressionsanalyse mittels HPLC-Massenspektrometrie.....	62
4.5	Aktivitätsanalysen.....	66
4.5.1	Aktivität der katalytischen Untereinheiten.....	66
4.5.2	Aktivitätsanalysen im Nativgel.....	69
4.5.3	Relative Proteasomaktivität.....	73
5	Diskussion.....	76
5.1	Bestätigung der Raucher als solche mittels Cotinin-Elisa.....	76
5.2	Durchflusszytometrisch erhöhte absolute Zellzahlen bei Rauchern ...	76
5.3	Änderungen in Expression und Abundanz der proteasomalen Untereinheiten.....	78
5.4	Aktivitätsänderungen der proteasomalen Untereinheiten und Komplexe.....	80
5.5	Potenzielle Folgen der veränderten proteasomalen Expression und Aktivität.....	84
6	Zusammenfassung.....	86
7	Literaturverzeichnis.....	88
8	Abkürzungsverzeichnis.....	99
9	Abbildungsverzeichnis.....	103
10	Tabellenverzeichnis.....	104
11	Danksagung.....	105
12	Eidesstattliche Erklärung.....	106

# **1 Einleitung**

## **1.1 Zigarettenrauch**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Weltweit rauchten im Jahr 2015 mehr als 1,1 Billionen Menschen Tabak, wobei der Anteil der männlichen Raucher den der weiblichen deutlich übersteigt (World Health Organization, 2015).

In Deutschland hatten im Jahr 2013 die Raucher einen Anteil von 29,7 % an der Gesamtbevölkerung zwischen 18 und 79 Jahren (Lampert et al., 2013), wobei starkes Rauchen (mehr als 20 Zigaretten täglich) eher unter Männern älterer Altersklassen verbreitet war. Zudem haben der soziale Status, das Bildungsniveau, der Beruf und das Einkommen Einfluss auf das Rauchverhalten. Seit einigen Jahren ist die Zahl der Raucher in Deutschland jedoch in allen Altersgruppen rückläufig (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2015). Die Weltgesundheitsorganisation WHO erwartet bis 2025 einen Rückgang des Raucheranteils in der deutschen Bevölkerung auf ca. 23 % (World Health Organization, 2015).

Tabakkonsum ist jährlich verantwortlich für den Tod von sechs Millionen Menschen weltweit, 600.000 Todesfälle durch Passivrauchen eingeschlossen (World Health Organization, 2015). Zu den häufigsten mit Tabakrauch assoziierten Todesursachen zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sowie unterschiedliche Krebsarten, allen voran Lungenkrebs (Talhout et al., 2011).

### **1.1.2 Molekulare Effekte von Zigarettenrauch**

Zigarettenrauch ist ein komplexes Stoffgemisch und enthält mehrere tausend schädliche Inhaltsstoffe (MacNee, 2001), die teils gasförmig, teils gebunden an Tabakrauchpartikel vorliegen (Church and Pryor, 1985). Viele dieser Inhaltsstoffe sind hoch reaktiv und können sowohl pro-inflammatorisch (Gonçalves et al., 2011) als auch immunsuppressiv (Stämpfli and Anderson, 2009) wirken. Sie können miteinander wechselwirken und sich gegenseitig verstärken, sodass die schädliche Wirkung nicht allein auf dem Vorliegen der einzelnen Substanzen,

sondern vielmehr auf ihrem Gemisch beruht (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2015).

Rauchen führt zu einer erheblichen Belastung des Organismus mit Oxidantien. Pro Zug an einer Zigarette werden ca.  $10^{17}$  Moleküle mit oxidativer Wirkung eingeatmet (Pryor and Stone, 1993). Dazu zählen beispielsweise Alkyle, organische Peroxy-Radikale und Aldehyde (Eiserich et al., 1995). Die Folgen auf molekularer Ebene sind weitreichend. Rauch-exponierte Zellen setzen ROS (reactive oxygen species) frei und zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine oder Lipide werden in der Folge oxidativ modifiziert oder peroxidiert (Yanbaeva et al., 2007), wodurch auch Zellmembranen geschädigt werden können (van der Vaart, 2004). Die Spiegel an Antioxidantien wie Vitamin A und C,  $\beta$ -Carotin, Cystein oder Glutathion sinken (Yanbaeva et al., 2007). Außerdem beeinflusst Zigarettenrauch die Lebensdauer von Zellen, indem er dosisabhängig bei niedrigeren Konzentrationen eher Apoptose, bei höheren Nekrose induziert (Messner et al., 2012).

Erwiesen ist zudem ein pro-inflammatorischer Effekt von Zigarettenrauch. Er wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und Makrophagen und aktiviert diese. Verglichen mit Nichtrauchern haben Raucher als Ausdruck einer chronischen Entzündungsreaktion im peripheren Blut mehr weiße Blutkörperchen, ein erhöhtes Level an Entzündungsmarkern wie C-reaktivem Protein (CRP) und pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen (Rom et al., 2013). Dazu zählen vorwiegend der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie verschiedene Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) (Arnson et al., 2010).

### **1.1.3 Zigarettenrauch in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung**

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist per definitionem eine verhinderbare Erkrankung, die durch eine nicht vollständig reversible Atemflussbehinderung charakterisiert ist, meist progredient verläuft und mit einer pathologischen Entzündungsreaktion der Lunge auf schädliche Gase oder Partikel assoziiert ist. Je nach Schweregrad wird sie in vier Gruppen eingeteilt, die von der Global Initiative for Chronic Obstrucive Lung Disease (GOLD) definiert wurden. Bis 2011 erfolgte die Einteilung strikt anhand der

Lungenfunktion in die Kategorien GOLD 1 - 4, seither gewannen jedoch auch Aspekte wie Exazerbationshäufigkeit oder klinisches Befinden des Patienten an prognostischer Bedeutung, sodass eine neue Einteilung in GOLD A - D eingeführt wurde, die diese berücksichtigt (GOLD Report 2017). Weltweit rangiert die COPD auf Platz 4 der häufigsten Todesursachen, wobei durch die Zunahme der Raucher-Prävalenz in Entwicklungsländern und das Erreichen von höherem Lebensalter in Industriestaaten ein Anstieg in Prävalenz, Mortalität und Morbidität erwartet wird (Lopez, 2006; Vogelmeier et al., 2007). COPD führt zudem zu einer erheblichen wirtschaftlichen Belastung. In der europäischen Union nehmen Atemwegserkrankungen 6 % des Gesundheitsbudgets ein, wovon wiederum 56 % der COPD zuzurechnen sind (GOLD Report 2017).

Rauchen ist mit fast 90 % der Hauptrisikofaktor der COPD. Jedoch sind lang nicht alle COPD-Erkrankungen – gerade bei Frauen oder jüngeren Patienten – durch Zigarettenrauch zu erklären. Als weitere Risikofaktoren gelten mehrere genetische Syndrome (z.B.  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel), Luftverschmutzung durch Verkehr oder andere Faktoren, Passivrauch und berufsbedingte Schadstoffbelastung (Li et al., 2016; Paulin et al., 2015; Vogelmeier et al., 2017). Auch Umwelteinflüsse in Utero und in früher Kindheit sind maßgeblich für das Outcome der COPD im Erwachsenenalter (Postma et al., 2015).

Man geht davon aus, dass die Pathogenese der COPD stark durch die immunmodulatorische Wirkung des Zigarettenrauchs beeinflusst wird. Zigarettenrauch löst, entweder direkt durch einzelne Rauchkomponenten oder indirekt durch Epithelzellschädigung, durch die Freisetzung sogenannter damage-associated molecular patterns (DAMPs), eine angeborene Immunantwort aus. Bestimmte Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren erkennen DAMPs und führen zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion (Opitz et al., 2010). Die Freisetzung von Zytokinen (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin 1 und 8) triggert das Recruitment von Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen zum Ort der Entzündung (Barnes, 2014). Aktivierte Neutrophile und Makrophagen verursachen Schädigungen des Lungengewebes durch die Freisetzung von ROS und proteolytischen Enzymen (Brusselle et al., 2011). Zusätzlich zu diesen Immunfunktionen des angeborenen Immunsystems wird



auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Unreife dendritische Zellen präsentieren „Selbst-Antigene“, die aus beschädigtem Gewebe freigesetzt wurden, und externe Antigene nativen T-Zellen in den Lymphknoten (Decramer et al., 2012). Nach ihrer Aktivierung zu T-Helfer-Zellen werden diese zusammen mit spezifischen Antikörper-produzierenden B-Zellen zur Neutralisierung der Antigene in die Lunge geschickt. Bei Fortschreiten der Krankheit bilden sich um die kleinen Atemwege tertiäre Lymphaggregate, die oligoklonale B- und T-Zellen enthalten (van der Strate et al., 2006; Sullivan, 2006). Mehrere Studien wiesen bereits einen Zusammenhang zwischen diesem sogenannten iBALT (inducible bronchus-associated lymphoid tissue) und einem Fortschreiten der COPD nach (Hwang et al., 2016; Jia et al., 2018; Polverino et al., 2015). Dementsprechend findet man in der Lunge von COPD-Patienten nicht nur ein erhöhtes Level der Zellen des angeborenen Immunsystems (Neutrophile und Makrophagen), sondern auch des adaptiven Immunsystems (B- und T-Zellen) (Barnes, 2008). Die zytotoxische CD8+-T-Zelle ist eine der vorherrschenden T-Zellen im Lungengewebe von COPD-Patienten. Nach ihrer Aktivierung setzt die CD8+-T-Zelle proteolytische Enzyme wie beispielsweise Perforin frei, welche Apoptose oder Nekrose struktureller Zellen verursachen können (Brusselle et al., 2011).

Die durch Zigarettenrauch wiederholt ausgelösten inflammatorischen Veränderungen im Lungengewebe tragen auf mehrere Arten zu einer zunehmenden Verschlechterung der Lungenfunktion bei COPD-Patienten bei. Durch die Entzündungsreaktion kommt es zu abnormen tissue-repair- und remodeling-Prozessen, die zu einer Verengung der kleinen Atemwege und zum Verlust der Elastizität des Lungengewebes führen (Hogg and Timens, 2009; McDonough et al., 2011). Außerdem erfolgt eine vermehrte Mukusproduktion, die die Lumina zusätzlich verlegt. Diese Prozesse begünstigen ein „air trapping“, was bedeutet, dass die Luft aufgrund der fehlenden Elastizität und der verlegten Atemwege nicht mehr vollständig abgeatmet werden kann (Hogg and Timens, 2009). So kommt es zur Emphysembildung und zur Zerstörung von Lungengewebe, was auch eine Limitation des Gasaustauschs nach sich zieht (Elbehairy et al., 2015).

Neben den lungenassoziierten Komplikationen wie Emphysembildung und small airway remodeling ist die COPD auch mit weiteren Erkrankungen wie ischämischen Herzkrankheiten, Diabetes mellitus, Osteoporose und Lungenkrebs assoziiert, was sicherlich zu einem großen Teil an gemeinsamen Risikofaktoren wie dem Zigarettenrauchen liegt (Decramer et al., 2008; Fabbri et al., 2008).

#### 1.1.3.1 Exazerbationen

Unter Exazerbationen versteht man anhaltende Verschlechterungen des Zustands des Patienten, die akut auftreten, über normale tägliche Schwankungen hinausgehen und eine Therapieänderung nötig machen (Rodriguez-Roisin, 2000). Rauchen erhöht zusätzlich die Anfälligkeit des Organismus für respiratorische Infekte (Feldman and Anderson, 2013), wobei bisher unklar ist, ob dies auf der erhöhten Anfälligkeit gegenüber mikrobiologischen Erregern, auf einer Unfähigkeit, infektiöse Agentien effektiv zu eliminieren oder auf einer überschießenden Inflammationsreaktion beruht (Stämpfli and Anderson, 2009). Dies erhöht das Exazerbationsrisiko bei rauchenden COPD-Patienten. Ein Großteil der akuten Exazerbationen ist durch Infektionen bakterieller (überwiegend *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*) oder viraler (überwiegend Rhino-, Influenza-, respiratory-syncytial- (RSV-) und Parainfluenzaviren) Genese verursacht (Papi et al., 2006). Je häufiger Exazerbationen auftreten, desto schlechter ist die Prognose des Patienten (Halpin et al., 2017; Soler-Cataluna, 2005; Vestbo et al., 2013). Die neue GOLD-Einteilung in Kategorien von A-D gewährleistet eine bessere Beurteilung des Exazerbationsrisikos des Individuums, was wiederum eine genauere Einschätzung der Prognose ermöglicht (Lange et al., 2012). Auch die Symptombdauer bei Exazerbationen ist ein prognostisch ungünstiger Faktor. Je länger die Symptome andauern, desto größer ist das Risiko für ein neues Ereignis und desto schlechter ist der gesundheitliche Gesamtzustand (Donaldson et al., 2015).

## 1.2 Das Proteasom

### 1.2.1 Funktion und Aufbau des Proteasoms

Proteine in Zellen unterliegen einem ständigen Abbau zu Aminosäuren und werden von neu synthetisierten Proteinen ersetzt (Goldberg, 2003). Die Schlüsselrolle beim Proteinabbau spielt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Es ist für über 90 % des intrazellulären Proteinabbaus verantwortlich (Sorokin et al., 2009). Damit spielt das Ubiquitin-Proteasom-System eine essenzielle Rolle bei überlebenswichtigen Prozessen in der Zelle, wie der Regulation des Zellzyklus, der Reaktion der Zellen auf Stress, DNA-Reparatur, Immunantwort und Apoptose (Bader and Steller, 2009; Schwartz and Ciechanover, 2009).

Für den Abbau vorgesehene Proteine werden ATP-abhängig mit Ubiquitinketten markiert. Eine Enzymkaskade bestehend aus E1, E2 und E3 knüpft Ubiquitin mittels seines C-Terminus an Lysin-Reste in Zielproteinen (Finley, 2009). Diese Proteine werden vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut (Glickman and Ciechanover, 2002). Das Proteasom baut die Proteine zu Peptiden mit einer Länge von 3-22 Aminosäuren ab (Rock et al., 1994). Diese können einerseits weiter zu Aminosäuren abgebaut und dann zu neuen Proteinen recycelt werden, andererseits auf MHC-I (major histocompatibility class I) -Komplexe geladen und so auf der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert werden (Finley, 2009).

Den katalytischen Kern des Proteasoms bildet ein 20S core particle (CP), an den verschiedene Regulatoren binden können. Der core particle ist fassähnlich aufgebaut und besteht aus vier Ringen, zusammengesetzt aus jeweils sieben Untereinheiten. Die beiden äußeren Ringe werden durch die sieben  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha$ 1- $\alpha$ 7 gebildet, die inneren Ringe bestehen aus den je sieben  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1- $\beta$ 7 (Groll et al., 2000).

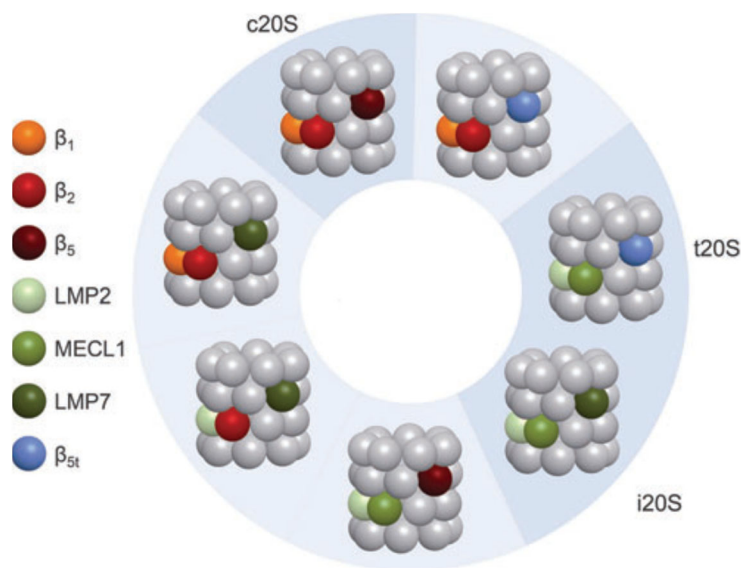
Drei der sieben  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5) besitzen aktive Zentren, die zur Proteolyse befähigt sind. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spaltungseigenschaften:  $\beta$ 1 spaltet nach sauren (caspase-like),  $\beta$ 2 nach basischen (trypsin-like) und  $\beta$ 5 nach hydrophoben (chymotrypsin-like) Aminosäuren (Finley, 2009).

### 1.2.2 Das Immunoproteasom

In lymphatischen und hämatopoetischen Geweben sowie induziert durch verschiedene inflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) können die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 durch ihre Immuno-Gegenstücke  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL-1) und  $\beta$ 5i (LMP7) ersetzt werden und so das Immunoproteasom bilden (Aki et al., 1994; Niewerth et al., 2014). Durch die Inkorporation der Immuno-Untereinheiten wird die chymotrypsin-like Aktivität erhöht und die caspase-like Aktivität erniedrigt, was dazu führt, dass Immunoproteasomen vermehrt Peptide mit hydrophoben C-Termini generieren. Diese binden mit höherer Affinität an MHC-I-Rezeptoren (Groettrup et al., 2010). Dies hat zur Folge, dass die Herstellung von Peptiden, die auf dem MHC-I-Rezeptor präsentiert werden können, gesteigert werden kann.

Es gibt Hinweise, dass das Immunoproteasom darüber hinaus einige weitere wichtige Funktionen übernimmt. Es scheint eine entscheidende Rolle im schnelleren und effizienteren Proteinabbau zur Aufrechterhaltung der Proteostase in Stresssituationen, z.B. bei oxidativem Stress (Pickering et al., 2010), zu spielen und somit auch Zellproliferation und -differenzierung, Signalling und Transkription zu beeinflussen (Ebstein et al., 2012; Seifert et al., 2010).

Es existieren jedoch auch Mischformen zwischen Standard- und Immunoproteasom, bei denen nur einzelne der konstitutiven Untereinheiten durch die dementsprechende Immuno-Untereinheit ersetzt sind. So ergibt sich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten (Abbildung 1) (Dahlmann, 2016; Guillaume et al., 2012). Zudem gibt es eine Thymus-spezifische Untereinheit ( $\beta$ 5t), die zusammen mit  $\beta$ 1i und  $\beta$ 2i das Thymoproteasom (t20S) bildet (Murata et al., 2009). Eine Übersicht über die Nomenklatur der 20S-Untereinheiten findet sich in Tabelle 1.



**Abbildung 1: Verschiedene Kompositionsmöglichkeiten der katalytischen Untereinheiten im 20S core particle des Proteasoms:** Die drei konstitutiven Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$  können durch ihre Immuno-Gegenstücke  $\beta_{1i}$  (LMP2),  $\beta_{2i}$  (MECL-1) und  $\beta_{5i}$  (LMP7) ersetzt werden und so das Immunoproteasom i20S bilden. Auch Mischformen zwischen Standard- und Immunoproteasom sind möglich. Zudem existiert eine thymus-spezifische Form (t20S), die  $\beta_{5t}$  enthält (Meiners et al., 2014).

20S $\alpha$ -Untereinheiten	Alte Nomenklatur	Gen-Nomenklatur
$\alpha_1$		PSMA6
$\alpha_2$		PSMA2
$\alpha_3$		PSMA4
$\alpha_4$		PSMA7
$\alpha_5$		PSMA5
$\alpha_6$		PSMA1
$\alpha_7$		PSMA3
20S $\beta$ -Untereinheiten	Alte Nomenklatur	Gen-Nomenklatur
$\beta_1$		PSMB6
$\beta_{1i}$	LMP2	PSMB9
$\beta_2$		PSMB7
$\beta_{2i}$	MECL-1	PSMB10

$\beta$ 3		PSMB3
$\beta$ 4		PSMB2
$\beta$ 5		PSMB5
$\beta$ 5i	LMP7	PSMB8
$\beta$ 6		PSMB1
$\beta$ 7		PSMB4

**Tabelle 1: Übersicht über die hier verwendete Nomenklatur der 20S  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Baumeister et al., 1998; Finley et al., 1998)**

### 1.2.3 Regulation des Proteasoms

#### 1.2.3.1 Regulatoren

Der Zugang zum Hohlraum im 20S-Komplex ist durch die N-Termini der außen liegenden  $\alpha$ -Untereinheiten versperrt (Groll et al., 2000). Um einen effektiven Proteinabbau zu gewährleisten, sind daher Aktivatoren notwendig, die einen Proteintransport in das Innere des CP ermöglichen.

Der am besten erforschte Regulator ist der 19S regulatory particle (RP; PA700), der einzige Aktivator, der ATP-abhängig Proteine abbaut (de la Peña et al., 2018). Dieser kann an ein oder an beide Enden des CP binden und so das 26S- bzw. das 30S-Proteasom bilden (Stadtmueller and Hill, 2011). Er besteht aus 18 Untereinheiten, die sich aufteilen auf eine „base“, die der dem CP zugewandten Seite entspricht, und ein weiter distal gelegenes „lid“ (Finley, 2009). Die base ist aus neun Untereinheiten zusammengesetzt, von denen sechs ATPase-Eigenschaften besitzen (Rpt1-Rpt6). Diese sind essentiell für die Bildung des CP-RP-Komplexes. Die weiteren Untereinheiten dienen entweder als Gerüstproteine (Rpn1 und Rpn2) oder als intrinsischer Ubiquitin-Rezeptor (Rpn13). Das lid besteht aus 8 non-ATPase-Untereinheiten. Sechs davon (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn9, Rpn12) bilden über ihre spezifischen Protein-Domänen eine hufeisenförmige Grundstruktur, die beiden übrigen Untereinheiten (Rpn8 und Rpn11) bilden ein flexibles Dimer, wobei Rpn11 Deubiquitinase-Eigenschaft besitzt. Rpn 10, der zweite intrinsische Ubiquitin-Rezeptor des Proteasoms, bindet an einen Arm des lid (Lander et al., 2013).

Zwei weitere Aktivatoren sind PA28 $\alpha/\beta$  sowie PA28 $\gamma$ . Diese oligomeren Ringkomplexe sind durch Bindung an die Taschen zwischen  $\alpha$ -Untereinheiten fähig, den Zugang zum CP zu öffnen. Im Vergleich zum 19S RP fehlt ihnen jedoch die ATPase-Aktivität, sodass sie nicht zur Translokation des Proteins in den CP beitragen können. Eine Bedeutung wird diesen Regulatoren vor allem für den Abbau kleiner Substrate ohne Tertiärstruktur beigemessen, die in den CP diffundieren können, sobald dieser geöffnet ist (Finley et al., 2016).

Als vierter Aktivator ist PA200 bekannt, welcher fast komplett aus HEAT (Huntingtin-elongation factor 3-PR65/A subunit of PP2A-lipid kinase TOR)-Wiederholungen besteht. Er formt eine flexible Superhelix, die sich in zwei Schichten über den Eingang des CP legt und diesen so öffnet (Savulescu and Glickman, 2011).

Zudem wurde ein Prolin-reicher Inhibitor des Proteasoms, PI31, identifiziert (Chu-Ping et al., 1992). Dieser hat einerseits auf das 20S-Proteasom direkt hemmende Wirkung und, andererseits beeinflusst er die Aktivierung des Proteasoms durch den 19S RP und PA28 (McCutchen-Maloney, 2000). Die Aktivität eines bereits gebildeten 26S-Proteasoms wird jedoch nicht direkt beeinflusst (Li et al., 2014). Eine Übersicht über die proteasomalen Regulatoren und deren Nomenklatur findet sich in Tabelle 2.

<b>19S ATPase-Untereinheiten</b>	<b>Gen-Nomenklatur</b>
Rpt1	PSMC2
Rpt2	PSMC1
Rpt3	PSMC4
Rpt4	PSMC6
Rpt5	PSMC3
Rpt6	PSMC5
<b>19S non-ATPase-Untereinheiten</b>	<b>Gen-Nomenklatur</b>
Rpn1	PSMD2
Rpn2	PSMD1

Rpn3	PSMD3
Rpn4	PSMD9
Rpn5	PSMD12
Rpn6	PSMD11
Rpn7	PSMD6
Rpn8	PSMD7
Rpn9	PSMD13
Rpn10	PSMD4
Rpn11	PSMD14
Rpn12	PSMD8
Weitere Aktivatoren/Inhibitoren	Gen-Nomenklatur
PA28 $\alpha$	PSME1
PA28 $\beta$	PSME2
PA28 $\gamma$	PSME3
PA200	PSME4
PI31	PSMF1

**Tabelle 2: Übersicht über die hier verwendete Nomenklatur der proteasomalen Regulatoren (Baumeister et al., 1998; Chu-Ping et al., 1992; Finley et al., 1998; Savulescu and Glickman, 2011)**

#### 1.2.3.2 Regulation auf transkriptioneller und posttranslationeller Ebene

Zellen sind ständig wechselnden Herausforderungen ausgesetzt, auf die sie reagieren müssen. Hierzu gehört die Regulation der Menge aktiver Proteasomkomplexe in Reaktion auf unterschiedliche Stimuli. Dies geschieht sowohl auf transkriptioneller als auch auf co- und posttranslationeller Ebene (Meiners et al., 2014).

Beim Menschen wurden die Transkriptionsfaktoren TCF11 (Transkriptionsfaktor 11) und seine kürzere Isoform Nrf1 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1) sowie Nrf2 identifiziert, welche bei Bedarf für die transkriptionelle Hochregulation proteasomaler Untereinheiten verantwortlich sind. Es scheint so,



als wäre Nrf2 für die Antwort auf oxidativen Stress zuständig, wohingegen TCF11/Nrf1 bei anderen Stimuli wie proteotoxischem Stress greift (Koch et al., 2011). Eher für die Regulation der basalen Expression vieler proteasomaler Gene verantwortlich ist der Transkriptionsfaktor NF-Y (Nuklearer Transkriptionsfaktor-Y), der an die CCAAT Box deren Promoter bindet (Xu et al., 2012). Die proteasomale Regulation auf Transkriptionsebene ist alles in allem betrachtet ein Prozess, der Zeit braucht und damit weniger geeignet ist als eine akute Antwort auf kurzfristige zelluläre Herausforderungen (Meiners et al., 2014).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit des Proteasoms ist die posttranslationelle Modifikation. Proteasomale Untereinheiten werden auf vielerlei unterschiedliche Arten modifiziert, wodurch Aktivität und Zusammensetzung reguliert werden (Hirano et al., 2016). Am häufigsten kommen Modifikationen an den Untereinheiten vor, die an der Schnittstelle zwischen 19S und 20S liegen. Phosphorylation und Acetylation steigern die proteasomale Aktivität (VerPlank and Goldberg, 2017), Glycosylation und Monoubiquitination hemmen diese. Außerdem sind oxidative Modifikationen wie beispielsweise Carbonylation beschrieben, die die Aktivität des Proteasoms beeinflussen. Vor allem bei Alterungsprozessen eine Rolle spielen Ubiquitination, Glycation und Carbonylation (Meiners et al., 2014).

## **1.3 Das Proteasom unter Einfluss von Zigarettenrauch und bei COPD**

### **1.3.1 Regulation des Proteasoms durch oxidativen Stress**

Unter oxidativem Stress versteht man Schäden, die durch reactive oxygen species (ROS) oder deren Derivate verursacht werden. Dabei können fast alle Komponenten einer Zelle, wie Kohlenhydrate, DNA, Fette und eben Proteine betroffen sein (Shang and Taylor, 2011). Die Proteostase, also der „Protein-Haushalt“ einer Zelle, unterliegt einer komplexen Regulation, die ein Zusammenspiel von Proteinfaltung, deren Entfaltung und Abbau erfordert. Veränderungen in diesem System können zu einem Funktionsverlust der Proteine oder zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine führen (Balch et al., 2014). Oxidative Veränderungen an Proteinen durch Zigarettenrauch führen zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, die ihre Funktion nicht mehr erfüllen

können. Falschgefaltete Proteine exponieren hydrophobe Oberflächen, die an umgebende Proteine binden können und somit zu einer Aggregation von Proteinen in der Zelle beitragen. Um Aggregatbildung zu verhindern, müssen diese rasch abgebaut werden (Goldberg, 2003). Studien haben gezeigt, dass fehlgefaltete Proteine zu Stressreaktionen des endoplasmatischen Reticulums (ER) führen (Wei et al., 2013). Bei exzessivem oxidativem Stress kann die Proteostase nicht mehr aufrecht erhalten werden, die Kapazität des Ubiquitin-Proteasom-Systems wird überschritten. Dies kann sogar in Proteotoxizität gipfeln (Balch et al., 2014).

*In vitro* konnten in Zellen, die mit CSE (cigarette smoke extract) behandelt worden waren, erhöhte Level an oxidativ modifizierten und polyubiquinierten Proteinen nachgewiesen werden (van Rijt et al., 2012; Somborac-Bacura et al., 2013). Min et al. wiesen im Lungengewebe von Patienten mit COPD eine erhöhte Menge unlöslicher, ubiquinierter Proteine nach. Zudem zeigten humane Bronchialepithelzellen nach Behandlung mit CSE eine Abnahme im Proteinabbau, was die Vermutung eines negativen Einflusses von Rauchen auf das Proteasom nahelegt (Min et al., 2011).

Mehrere Studien haben gezeigt, wie wichtig der proteasomale Abbau modifizierter und fehlgefalteter Proteine in Reaktion auf Zigarettenrauchexposition ist: Oxidative Modifikationen an bestimmten Molekülen wie epidermal growth factor receptor (EGFR), Interferon- $\gamma$ , Histon-Deacetylasen, Glutaredoxin-1 und relB, einem Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie, beeinflussen deren Funktion und machen einen schnellen Abbau nötig (HuangFu et al., 2008; Khan et al., 2007; Kuipers et al., 2011; Osoata et al., 2009; Yang et al., 2009). Die hieraus resultierenden Konsequenzen für Signalkaskaden, Entzündungsbekämpfung, Wachstum und Reaktion auf oxidativen Stress sind erheblich und spielen eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der COPD (Meiners and Eickelberg, 2012).

Auch oxidative Veränderungen am Proteasom selbst oder seinen Regulatoren können Anlass für eine veränderte proteasomale Aktivität sein. So zeigte sich beispielsweise bei oxidativen Veränderungen an der Rpt3 ATPase-Untereinheit des 19S-Regulators eine Abnahme der ATPase-Aktivität und eine Funktionseinschränkung des gebildeten 26S-Proteasoms (Ishii et al., 2005). Auch bei einigen Krankheitsbildern wie Alzheimer oder kardialen Myopathien wurden oxidative Modifikationen am UPS selbst nachgewiesen (Cecarini et al., 2007; Predmore et al., 2010).

### **1.3.2 Regulation der proteasomalen Expression und Aktivität**

Mehrere Studien fanden in den Lungenzellen berauchter Mäuse Veränderungen in der Expression proteasomaler Gene. Nach Langzeit-Zigarettenrauchexposition war in Mäusen eine reduzierte Expression einer Vielzahl von Genen, die für Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems kodieren, beobachtet worden (Rangasamy et al., 2009). Eine Hochregulation mehrerer proteasomaler Untereinheiten des 20S CP konnte als akute Reaktion auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten oxidativen Stress beobachtet werden (Pickering et al., 2010). Kammerl et al. konnten eine leicht erhöhte Expression von 20S-Untereinheiten in Alveolarepithelzellen nach akuter Behandlung mit CSE nachweisen (Kammerl et al., 2019). Die Änderung der Genexpression proteasomaler Untereinheiten als Reaktion auf Zigarettenrauch in PMBCs wurde bisher nicht erforscht, jedoch wurde in PBMCs gesunder Probanden nach Inhalation von Dieselabgasen eine Hochregulation der Expression von mehreren Genen des UPS beobachtet (Pettit et al., 2012).

*In vitro* fanden bereits mehrere Studien einen direkten Einfluss von Zigarettenrauch auf die proteasomale Aktivität. Alle drei proteasomalen Aktivitäten waren in Zellen des Lungengewebes nach mehrstündiger Behandlung mit CSE signifikant reduziert (van Rijt et al., 2012; Somborac-Bacura et al., 2013). Die Expression von proteasomalen Untereinheiten war jedoch nicht verändert (van Rijt et al., 2012). Konträr hierzu fanden Pickering et al. in embryonalen Fibroblasten von Mäusen als Reaktion auf durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachten oxidativen Stress eine Zunahme der drei proteasomalen Aktivitäten (Pickering et al., 2010). Diese Diskrepanz legt nahe, dass unterschiedliche Formen von oxidativem

Stress in unterschiedlichen Zellformen verschiedene Effekte am Proteasom auslösen können.

Eine direkte Wirkung von Zigarettenrauch auf das Proteasom *in vivo* konnte erstmals von van Rijt et al. 2012 nachgewiesen werden. Mäuse, die mit Zigarettenrauch geraucht worden waren, zeigten in Zellen des Lungengewebes eine signifikant erniedrigte trypsin-like Aktivität, die anderen Aktivitäten waren nur tendenziell verändert (van Rijt et al., 2012). In Lungengewebe von COPD-Patienten zeigte sich eine deutlich verminderte Aktivität und Assemblierung des 26S-Proteasoms (Kammerl et al., 2016). Eine Regulation der Expression proteasomaler Untereinheiten wurde jedoch weder *in vivo* noch im Lungengewebe von COPD-Patienten beobachtet. Eine direkte Regulation auf posttranskriptioneller Ebene kann somit nicht ausgeschlossen werden. Mäuse mit verminderter Chymotrypsin-like Aktivität zeigten nach Zigarettenrauchexposition eine vermehrte Apoptoseneigung mit Zerstörung von Zellwänden und Emphysembildung (Yamada et al., 2015). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine verminderte Proteasomenaktivität kausal zur Entstehung einer Zigarettenrauch-vermittelten Emphysemausbildung beiträgt.

Kammerl et al. beschäftigten sich mit den Veränderungen des Immunoproteasoms bei Rauchexposition bzw. bei manifester COPD. Immunzellen, die mit CSE behandelt worden waren, zeigten *in vitro* reduzierte Immunoproteasom-Aktivität und beeinträchtigte Immunoproteasom-spezifische MHC-I Antigen-Präsentation. In BAL- (bronchoalveoläre Lavage-) Zellen gerauchter Mäuse war eine dosisabhängige Regulation des Immunoproteasoms und der MHC-I Präsentation zu finden. Bei Patienten mit COPD ergab sich sowohl in der BAL als auch in isolierten Alveolarmakrophagen eine reduzierte MHC-I mRNA-Expression (Kammerl et al., 2016). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Zigarettenrauch eine destabilisierende Wirkung auf 26S- und 20S-Proteasomen hat, ohne diese jedoch oxidativ zu modifizieren (Kammerl et al., 2019).

Zusammengenommen legen diese Daten nahe, dass Zigarettenrauch einen direkten Effekt auf die Aktivität des Proteasoms hat. Angesichts der zentralen Rolle des proteasomalen Proteinabbaus für die zelluläre Proteinhomöostase

kann auch eine geringfügige Veränderung der proteasomalen Aktivität massive Auswirkungen auf die zelluläre Stressantwort auf Zigarettenrauch haben, die potenziell eine veränderte Immunantwort auslöst, welche zu einer Progression Zigarettenrauch-bedingter Lungenerkrankungen beitragen kann.

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziel dieser Studie ist es, die Regulation des Proteasoms nach akuter Exposition von Zigarettenrauch in peripheren Blutmonozyten (PBMCs) umfassend zu untersuchen. Damit soll in einem ersten Schritt analysiert werden, ob die Veränderung der proteasomalen Aktivität in Blutzellen als potenzieller Biomarker für die frühzeitige Erkennung Rauch-induzierter chronischer Lungenerkrankungen eingesetzt werden kann.

Dazu wurde mittels FACS-Analyse die Zusammensetzung des Blutes von jungen gesunden Rauchern und Nichtrauchern untersucht, anschließend wurde per RT-qPCR die Genexpression verschiedener proteasomaler Untereinheiten und Regulatoren bei Rauchern und Nichtrauchern verglichen. Außerdem wurde deren Expression auf Proteinebene massenspektrometrisch ermittelt. Die proteasomale Aktivität wurde zum einen mit activity-based probes nachgewiesen, welche es ermöglichen, die Aktivität der einzelnen katalytischen Untereinheiten zu testen. Zum anderen wurden Aktivitätsanalysen mittels Nativgel durchgeführt, um die Aktivität und Zusammensetzung der unterschiedlichen zellulären Proteasomkomplexe zu bestimmen.

## 2 Materialien

### 2.1 Materialien für die Blutabnahme

Produkt	Hersteller
Haut-Desinfektionsspray, Cutasept F, 250 ml	Bode Chemie GmbH
Leukosilk 2.5 cm x 5 m	BSN medical GmbH
Multifly-Kanüle mit Multi-Adapter	Sarstedt
S-Monovette Kalium-EDTA, 9.0 ml	Sarstedt
Venenstauer, CBC-Classic	Kimetec
Zellstofftupfer, Askina Brauncel	B. Braun

### 2.2 Materialien für den Cotinin-ELISA

Produkt	Hersteller
2 ml Vollblut eines gesunden Probanden	
Cotinine ELISA CO096D	Calbiotech

### 2.3 Materialien für die Durchflusszytometrie

Produkt	Hersteller
100 µl Vollblut eines gesunden Probanden	
Antikörper und Isotypen	siehe Tabelle
BD LSRII Flow Cytometer	Becton Dickinson
Flow-Count Fluorospheres	Beckman Coulter
Q-Prep epics immunology workstation	Beckman Coulter

<b>Antikörper</b>	<b>Bestellnummer Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Bestellnummer Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
CD3-PB	#558117	IgG1	#558120	BD Pharmingen
CD14-APC	#IM2580	IgG2a	#A12693	Beckman Coulter
CD15-FITC	#562370	IgG1	#555748	BD Pharmingen
CD16(3G8)-PE	#A07766	IgG1	#A07796	Beckman Coulter
CD19-PECy5	#555414	IgG1	#555750	BD Pharmingen
CD56-PECy7	#557747	IgG1	#557872	BD Pharmingen

## 2.4 Materialien für die PBMC-Präparation und Zellzählung

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
5 ml Vollblut eines gesunden Probanden	
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
Hämacytometer-Deckglas für Zählkammern	Brand GmbH
Mikroskop Axio Lab.A1	Zeiss
Zählkammer Neubauer improved	Brand GmbH

## 2.5 Materialien für die RNA-Analyse

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
0,1M DTT	Invitrogen, life technologies
5x First Strand Buffer	Invitrogen, life technologies
DNase I	AppliChem
Light Cycler 480 SybrGreen 1 Master Mix	Roche Diagnostics
Light Cycler LC 480II	Roche Diagnostics

M-MLV Reverse Transcriptase	Sigma-Aldrich
PCR Nucleotide Mix, 10 mM	Promega
Primer	siehe Tabelle
Random Primer	Invitrogen, life technologies
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega
RNeasy Midi Kit (50)	Qiagen
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen

Gen	Richtung	Sequenz (5'-3')
HPRT	fw	TGAAGGAGATGGGAGGCCA
	rw	AATCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
RPL19	fw	TGTACCTGAAGGTGAAGGGG
	rw	GCGTGCTTCCTTGGTCTTAG
PSMA3	fw	AGATGGTGTTGTCTTTGGGG
	rw	AACGAGCATCTGCCAACAA
PSMB5	fw	TCAGTGATGGTCTGAGCCTG
	rw	CCATGGTGCCTAGCAGGTAT
PSMB6	fw	CAGAACAACCACTGGGTCCT
	rw	CCCGGTATCGGTAACACATC
PSMB7	fw	TCGCTGGGGTGGTCTATAAG
	rw	TCCCAGCACCAACAATAA
PSMB8	fw	GTTCCAGCATGGAGTGATTG
	rw	TTGTTCAACCGTAAGGCACT
PSMB9	fw	TCCCAGGTTGGAAACCAGT
	rw	TCAAACCTCCACTGCCATGAT



PSMB10	fw	AGCCCGTGAAGAGGTCTGG
	rw	CATAGCCTGCACAGTTTCCTCC
PSMC3	fw	GTGAAGGCCATGGAGGTAGA
	rw	GTTGGATCCCCAAGTTCTCA
PSMD11	fw	GCTCAACACCCCAGAAGATGT
	rw	AGCCTGAGCCACGCATTTTA
PA200	fw	CCAACAGGAAAAGAATGCCGA
	rw	CCAGGGCAGGTTTCTTTGCT
PA28 $\alpha$	fw	CAAGGTGGATGTGTTTCGTG
	rw	TGCTCAAGTTGGCTTCATTG
PA28 $\beta$	fw	GCAAACAGGTGGAGGTCTTC
	rw	GTCAGCCACATTGAGGGAGT
PA28 $\gamma$	fw	TAGCCATGATGGACTGGATGG
	rw	CCTTGGTTCCTTGGAAGGCT
IFN $\gamma$	fw	TGACCAGAGCATCCAAAAGA
	rw	CATGTATTGCTTTGCGTTGG
PI31	fw	AAAGCTCCTTGTGAAAGCCA
	rw	CCCACTGCTCATGGATAGGT
CYP1A1	fw	CTTGGACCTCTTTGGAGCTG
	rw	CGAAGGAAGAGTGTCGGAAG

## 2.6 Materialien für die Proteinbiochemie

### 2.6.1 Antikörper

#### 2.6.1.1 Primärantikörper

Antikörper	Host	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
Anti-Proteasome 20S LMP7 antibody, IgG	Hase	1:1500	polyklonal	Abcam plc
TBP1 (Rpt5)-antibody, 1 mg/ml, IgG	Hase	1:4000	polyklonal	Bethyl Laboratories, Inc.
Anti-proteasome 20S alpha 1+2+3+5+6+7 antibody, 1 mg/ml, IgG	Maus	1:1000	monoklonal	Abcam plc

#### 2.6.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse IgG, HRP-linked	Ziege	1:40000	GE Healthcare Europe GmbH
anti-rabbit IgG, HRP-linked	Ziege	1:40000	GE Healthcare Europe GmbH

### 2.6.2 Kits

Produkt	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Super Signal West, Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific

### 2.6.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x Transfer-Puffer (SDS- und Nativgel)	0,25 M Tris base, 1,9 M Glycin, in aqua bidest.
Native-PAGE-5x Ladepuffer	0,15 mM Bromphenol blue, 2,5 ml Glycerol, 2,5 ml 500 mM Tris Stocklösung pH 7,5
Native-PAGE-Solubilisations-Puffer	2 % (w/v) SDS, 66 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol in aqua bidest.
Native-PAGE-TBE Laufpuffer	89 mM Tris pH 8,3, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na <sub>2</sub> , 0,5 mM ATP, 0,5 mM DTT, 2 mM MgCl <sub>2</sub> in aqua bidest.
Native-PAGE-Westernblot Transfer-Puffer	100 ml 10x Tris-Glycin Transfer-Puffer, 100 ml Methanol, 0,1 % (w/v) final concentration SDS, ultrapure water ad 1000 ml
Nativgel-Reaktions-Puffer	50 mM Tris Lösung pH 7,5, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50 μM SLLVY activity substrate
SDS-PAGE-10x Laufpuffer	0,25 M Tris base, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, in aqua bidest.
SDS-PAGE-4x Sammelpuffer	5 M Tris base, aqua bidest. ad 10 ml, 4 % (w/v) SDS; pH 6,8; sterilgefiltert 0.45 μm
SDS-PAGE-4x Trennpuffer	1,5 M Tris base, aqua bidest. ad 200 ml, 0,24 % (w/v) SDS; pH 8,8; sterilgefiltert 0.45 μm

SDS-PAGE-6x Ladepuffer (Laemmli-Puffer)	3 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8, 1,5 ml Glycerol, 6 % (w/v) SDS, 0,3 mM DTT, 0,15 mM Bromphenolblau, aqua bidest. ad 10 ml; sterilgefiltert 0.45 µm
SDS-PAGE-Western blot Transfer-Puffer	100 ml 10x Tris-Glycin Transfer-Puffer, 100 ml Methanol, aqua bidest. ad 1000 ml

## 2.7 Materialien für FASP-Verdau und HPLC-Massenspektrometrie

### 2.7.1 Allgemeine Materialien

Produkt	Hersteller
LTQ-OrbitrapXL	Thermo Fisher Scientific Inc.
Microcon Centrifugal Filters	Merck Millipore
Protein LoBind Tubes	Eppendorf

### 2.7.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
2-Iodacetamid-Lösung, 300 mM	0,0554 g 2-Iodacetamid in 1 ml aqua bidest.
Ammoniumbicarbonat-Puffer (ABC-Puffer), 50 mM	0,0395 g Ammoniumbicarbonat in 10 ml aqua bidest.
DTT-Lösung, 100 mM	0,0154 g in 1 ml aqua bidest.
Lys-C	20 µg Lysyl Endopeptidase in 100 µl aqua bidest.
Trypsin	20 µg Aliquot in 40 µl Trypsin-Resuspension-buffer
UA-Puffer	8 M Urea in 0,1 M Tris/HCl; pH 8,5

## 2.8 Materialien für die Aktivitätsbestimmungen

Produkt	Hersteller
Activity-based probes	Freundlicherweise bereitgestellt von Hermen Overkleef, Leiden
Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin activity substrate (SLLVY)	Bachem AG

## 2.9 Weitere Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
10x PhosStop	1 Tablette gelöst in 1 ml aqua bidest.
25x Complete (protease inhibitor cocktail)	1 Tablette gelöst in 2 ml aqua bidest.
Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; in aqua bidest.; pH 7.4
Phosphate buffered saline+Tween (PBST)	10x PBS Gesamtvolumen: 2 l NaCl: M= 58,44 g/mol, 160,00 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , M=141,96 g/mol, 23g KCl, M=74,56 g/mol, 4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> M=136,09 g/mol, 4g pH: 7,4 + 0,05 % Tween
TSDG	10 mM Tris/HCl, 1,1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN <sub>3</sub> , 1 mM DTT, 2 mM ATP, 10% (v/v) Glycerol, pH 7,0

## 2.10 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Iodacetamid	Merck Millipore
2-Propanol	AppliChem

Acetonitril	AppliChem
Acrylamide, Rotiphorese Gel 30 (37.5:1), 30 % acrylamide stock solution with 0,8 % bisacrylamide	Carl Roth GmbH + Co. KG
Adenosine-5'-triphosphate (ATP)	Roche Diagnostics
Amido Black Staining Solution 2x	Sigma-Aldrich
Ammonium bicarbonate	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfate (APS)	AppliChem
Boric acid (Molekulare biology grade)	AppliChem
Bromphenol blue	AppliChem
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
EDTA disodium salt dihydrate	AppliChem
Ethanol absolute	AppliChem
Fetal Bovine Serum SeraPlus	Pan Biotech
Glycerol 87 %	AppliChem
Glycin Molecular biology grade	AppliChem
HEPES	AppliChem
Hydrochloric Acid, 37%	Sigma-Aldrich
Lysyl Endopeptidase, Mass Spectrometry Grade	Wako
Magnesiumchloride Hexahydrate	AppliChem GmbH - An ITW Company
Methanol, BioChemica and technical grade	AppliChem GmbH - An ITW Company
PageBlue Protein Staining solution	Fermentas
PhosStop	Roche Diagnostics

Potassium chloride	AppliChem GmbH - An ITW Company
Proteasome-Glo™ Succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine-aminoluciferin	Promega
Protein marker V (10-175) and VI (10-245), prestained	AppliChem
Roti-block, 10x concentrate	Carl Roth GmbH + Co. KG
SDS Pure	AppliChem
Sodium acide pure	AppliChem
Sodium Carbonate	AppliChem
Sodium chloride Molecular biology grade	AppliChem
Sucinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin activity substrate (SLLVY)	Bachem AG
TEMED	AppliChem
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich
Trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma-Aldrich
Tris buffer grade	AppliChem
Triton X-100	AppliChem
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich
Trypsin, sequencing grade modified	Promega
Tween 20	AppliChem
Urea	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	AppliChem

## 2.11 Allgemeiner Laborbedarf

Produkt	Hersteller
-20 °C Gefrierschrank, Liebherr comfort, G5216-20	Liebherr
-4 °C Tiefkühlschrank, Liebherr profiline, G5710-20	Liebherr
-80 °C Gefrierschrank U725-G	New Brunswick
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies
Amersham Hyperfilm ECL, high performance chemiluminescence film, 18 x 24 cm	GE Healthcare Limited
BD Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson
Behälter für tiefkalten Stickstoff, Apollo 200	Cryotherm
Blotting chamber, Mini-Protean Tetra Cell and Power Pac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
ChemiDoc XRS <sup>+</sup>	Bio-Rad Laboratories
Falcon tubes 15 ml, 50 ml	BD Biosciences
Film developer Crurix 60	AGFA
Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad Laboratories
Glas Pasteur Pipetten	Brand
Heraeus Incubator BBD6220	Thermo Fisher Scientific Inc.
Immun-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad Laboratories
Incubator shaker innova 42	New Brunswick
Mastercycler gradient thermal cycler	Eppendorf
Microtitre plate, 96-well, transparent, PS, F-Bottom	Greiner bio-one GmbH



Microtitre plate, 96-well, white	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Mini-Zentrifuge MCF-2360	LMS Consult
Pipette, elektronisch, easypet 3	Eppendorf
Pipetten, Research Plus, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Biozym
Plate reader Sunrise	Tecan Group Ltd.
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Greiner bio-one GmbH
Serological pipettes, sterile, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner bio-one GmbH
Spectrophotometer NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermomixer compact	Eppendorf
Typhoon TRIO+	Amersham biosciences
Vortex Mixer, MS3 basic	IKA
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Advantage A10	Merck Millipore
Wasserbad Aqualine AL12	Lauda
Western blot developer Curix 60	Agfa Healthcare N.V.
Western blot transfer chamber Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories
Whatman blotting paper	GE Healthcare Europe GmbH
Zellkultur work bench Herasafe KS180	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Mikro200R, Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

## 2.12 Software

Programm	Hersteller
Agilent Bioanalyzer	Gerätespezifische Software
Nanodrop	Gerätespezifische Software
Software Typhoon Scanner	Gerätespezifische Software
ImageJ 1.48v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism version 5.00 for Windows	GraphPad Software
BD FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson
Mascet, Version 2.2	Matrix Science
Magellan 7.2	Tecan Group Ltd.
LightCycler 480 SW 1.5	Roche Diagnostics
Progenesis QI software (version 3.0)	Nonlinear Dynamics, Waters, Newcastle upon Tyne, U.K., for label-free quantification
Image Lab Software 4.0.1	Bio-Rad Laboratories
Zotero 4.0.27	Roy Rosenzweig, Center for History and New Media

### 3 Methoden

#### 3.1 Probandenakquise und -kollektiv

Die Probanden wurden aus dem Freundes- und Bekanntenkreis sowie durch Aufrufe an der Universität und Aushänge am schwarzen Brett akquiriert. Insgesamt wurden 20 Raucher und 20 Nichtraucher eingeschlossen. Es wurden nur männliche Probanden im Alter von 20-30 Jahren aufgenommen, deren BMI im Normalbereich lag. Personen, die an chronischen Krankheiten litten oder innerhalb der letzten drei Wochen einen akuten Infekt hatten, wurden ausgeschlossen. Medikamenteneinnahme war ebenfalls ein Ausschlusskriterium. Als Raucher wurden Personen definiert, die mindestens 10 Zigaretten täglich seit mindestens einem Jahr konsumierten und die somit minimal 0,5 packyears aufwiesen. Die potenziellen Probanden füllten initial einen Fragebogen aus, um zu ermitteln, ob die Ein- oder Ausschlusskriterien erfüllt sind. Es ergab sich ein Probandenkollektiv wie in Tabelle 3 ersichtlich.

	Nichtraucher	Raucher
<b>N</b>	20	20
<b>Geschlecht m/w</b>	20/0	20/0
<b>Alter, Jahre (MW ± SEM)</b>	24,20 ± 2,80	24,30 ± 2,98
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup> (MW ± SEM)</b>	22,81 ± 2,38	23,57 ± 2,31
<b>packyears</b>	-	4,61 ± 3,01

Tabelle 3: Probandenkollektiv

#### 3.2 Venöse Blutentnahme

Die Entnahme einer venösen Blutprobe erfolgte aus der Armbeuge (Vena cephalica oder Vena basilica). Den Probanden wurde ein Stauschlauch an den Oberarm angelegt, um eine kurzfristige Venenstauung zu erreichen. Nach Reinigung der Punktionsstelle mit Desinfektionsmittel wurden aus der gestauten

Vene mit einer sterilen Multifly-Kanüle ca. 30 ml (3 Röhrchen) Vollblut entnommen. Die Einstichstelle wurde mit einem Pflaster versorgt.

### **3.3 Cotinin-ELISA**

Mittels Cotinin-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden die Raucher als solche verifiziert und ein Nikotinkonsum der Nichtraucher ausgeschlossen. Cotinin, ein Abbauprodukt des Nikotins, hat eine längere Halbwertszeit als dieses und kann somit mittels ELISA im Blutplasma detektiert werden. Zur Plasmagewinnung wurden 2 ml Vollblut pro Proband in ein Reaktionsgefäß überführt und mit der Mikro200R Zentrifuge für 15 min bei Raumtemperatur (Beschleunigung: 9, Bremse: 9; RCF: 800) zentrifugiert. Dabei setzen sich die korpuskulären Blutanteile unten im Gefäß ab. Das Plasma wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reagentien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Das Plasma der Raucher wurde 1:4 mit aqua bidest. verdünnt, das der Nichtraucher wurde unverdünnt verwendet. Die mitgelieferte 96-well-Platte war bereits mit polyklonalem Antikörper gegen Cotinin gecoatet. Es wurden pro well 10 µl des Plasmas/der Plasma-Verdünnung aufgebracht. Pro Proband wurden Doppelwerte pipettiert. Zur Erstellung der Standardkurve wurden je 10 µl der mitgelieferten Standards mit vorbekannten Cotininkonzentrationen ebenfalls in Doppelwerten auf die Platte pipettiert. Jedem well wurden 100 µl Enzymkonjugat zugefügt. Die Platte wurde für 30 Sekunden auf den Schüttler gestellt und im Anschluss bei Raumtemperatur im Dunkeln für 60 min inkubiert. Danach wurden die wells 6 Mal mit jeweils 300 µl aqua bidest. gewaschen. Die Platte wurde umgedreht und die Flüssigkeit vollständig aus den wells ausgeklopft. Anschließend wurden in jedes well 100 µl Substrat-Reagenz pipettiert und die Platte für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zufügen von 100 µl Stop Solution pro well wurde die Platte nochmals für einige Sekunden auf den Schüttler gestellt. Die Absorption wurde am plate reader bei 450 nm unter Verwendung der Magellan 7.2-Software gemessen. Die Cotinin-Konzentration wurde als Mittelwert der Doppelwerte anhand der Standardkurve ermittelt.

### 3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der Zellen aufgrund verschiedener spezifischer Eigenschaften voneinander unterschieden und quantifiziert werden können. Diese Unterscheidung erfolgt nach den Parametern Zellgröße, Granularität und spezifischer, je nach Zellart unterschiedlicher Oberflächenantigenpräsentation. Nach Größe und Granularität der Zellen können die drei großen Blutzellpopulationen der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten unterschieden werden. Anhand von Färbungen mit Antikörpern, die an die Oberflächenantigene der Zellen binden und ein optisches Signal geben, kann zwischen deren Subpopulationen differenziert werden. Dazu wurden folgende Antigene genutzt:

Zelltyp	Antigen
T-Zellen	CD3
B-Zellen	CD19
NK-Zellen	CD56
Neutrophile Granulozyten	CD15, CD16
Eosinophile Granulozyten	CD15
Monozyten	CD14, CD16

**Tabelle 4: Oberflächen-Antigene zur durchflusszytometrischen Analyse**

Zur absoluten Quantifizierung der Zellen wurden Flow-Count-Fluorospheres verwendet, eine Suspension mit einer vorbekannten Anzahl von „beads“ pro  $\mu\text{l}$ , die vom Durchflusszytometer gemessen werden. Anhand deren Anzahl können die absoluten Zellzahlen der verschiedenen Zellpopulationen berechnet werden.

100  $\mu\text{l}$  Vollblut pro Ansatz wurden in einem 5 ml Rundbodenröhrchen vorgelegt. Es wurden Antikörper hinzupipettiert, um folgende Verdünnungen zu erreichen:

1:50-Verdünnung: CD3-PB, CD14-APC, CD19-PECy5

1:20-Verdünnung: CD15-FITC, CD16(3G8)-PE, CD56-PECy7

Die Röhrcchen wurden gevortext und anschließend für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mit der Coulter Q-Prep Workstation nach Angaben des Herstellers. Nach Zugabe von 800 µl aqua bidest., 1600 µl PBS + 2 % FCS sowie 100 µl Flow-Count-Fluorospheres wurde die Probe erneut gevortext und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt.

Im Anschluss wurden die Zellen am BD LSRII Flow Cytometer, einem Durchflusszytometer mit 4 Lasern, analysiert. Dazu wurde die BD FACSDiva Software Version 8.0 verwendet. Pro Probe wurden jeweils 20000 Leukozytenevents gemessen. Mithilfe des Vorwärtsstreulichts (forward scatter, FSC) können die Zellen anhand ihrer Größe unterschieden werden, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) als Maß für die Granularität der Zellen gilt. In einer 2-Parameteranalyse forward versus side scatter (dargestellt als dotplot) konnten somit die drei großen Zellpopulationen des Blutes (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) unterschieden und mit Analysefenstern (sogenannten „gates“) definiert werden. Auch für die Flow-Count Fluorospheres wurde ein eigenes gate in der Scatterdarstellung festgelegt. Die weitere Unterscheidung der Zellen erfolgte mittels Antikörperfärbung, wie in Abbildung 2 dargestellt. Dabei wurden aus dem Monozytengate die CD14<sup>++</sup>- und die CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>-Zellen ermittelt, aus dem Lymphozytengate wurden T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen und aus dem Granulozytengate Neutrophile und Eosinophile unterschieden.

Aus den abgelesenen Werten wurde mithilfe der Flow-Count-Fluorospheres, die bei mir 994 beads/µl enthielten, nach folgender Formel die absolute Zellzahl der verschiedenen Zellpopulationen berechnet (ergibt jeweils die Zellzahl pro µl Vollblut):

*Absolute Zellzahl einer Population = (Aus Diagramm ermittelte Zahl der Ereignisse \* 994) / gemessene beads*

Zudem wurde der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Zellpopulationen an den Gesamtleukozyten mittels folgender Formel errechnet:

*Prozentualer Anteil an Gesamtleukozyten = Aus Diagramm ermittelte Zahl der Ereignisse / (aus Diagramm ermittelte Zahl der Leukozytenereignisse / 100)*

Für die B-Zellen, T-Zellen und die NK-Zellen wurde außerdem der Anteil dieser Zellpopulationen an den Gesamtlmphozyten wie folgt berechnet:

*Prozentualer Anteil an Gesamtlmphozyten = Aus Diagramm ermittelte Zahl der Ereignisse / (aus Diagramm ermittelte Zahl der Lymphozytenereignisse / 100)*

Die Gesamtleukozytenzahl sowie die Lymphozytenzahl für diese Berechnungen wurden annäherungsweise nach Scatter bestimmt.

Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Antikörper spezifisch an die entsprechenden Oberflächenmoleküle der Zellen binden, wurde zuerst eine Isotypkontrolle durchgeführt. Dazu wurden Proben mit einem nicht bindenden Antikörper gleichen Isotyps versetzt. So ist z. B. der verwendete Antikörper gegen CD3 vom Isotyp IgG1 mit der Fluoreszenzmarkierung PB (Pacific Blue). Als korrespondierende Isotypkontrolle wurde daher mouse IgG1-PB in gleicher Antikörperkonzentration wie bei der anti-CD Antikörperfärbung eingesetzt.

In zwölf 5 ml Rundbodenröhrchen wurden jeweils 100 µl Vollblut eines Probanden vorgelegt. In jedes Röhrchen wurde entweder ein Antikörper oder eine dementsprechende Menge Isotyp pipettiert, um folgende Verdünnungen zu erhalten:

1:50-Verdünnung: CD3-PB, Isotyp CD3 (IgG1), CD14-APC, Isotyp CD14 (IgG2a), CD19-PECy5, Isotyp CD19 (IgG1)

1:20 Verdünnung: CD15-FITC, Isotyp CD15 (IgG1), CD16(3G8)-PE, Isotyp CD16 (IgG1), CD56-PECy7, Isotyp CD56 (IgG1)

Die weitere Präparation der Proben bis zur Messung erfolgte auf gleiche Art wie bei der Multi CD-Färbung.

Danach wurden die Zellen am BD LSRII Flow Cytometer mithilfe der BD FACSDiva Software Version 8.0 analysiert. Um den Anteil positiver Zellen zu bestimmen, wurden beide Kurven für Antikörperfärbung und Isotypkontrolle übereinandergelegt.

Die Isotypkontrolle wurde bei n=4 Probanden exemplarisch und stichprobenartig durchgeführt.



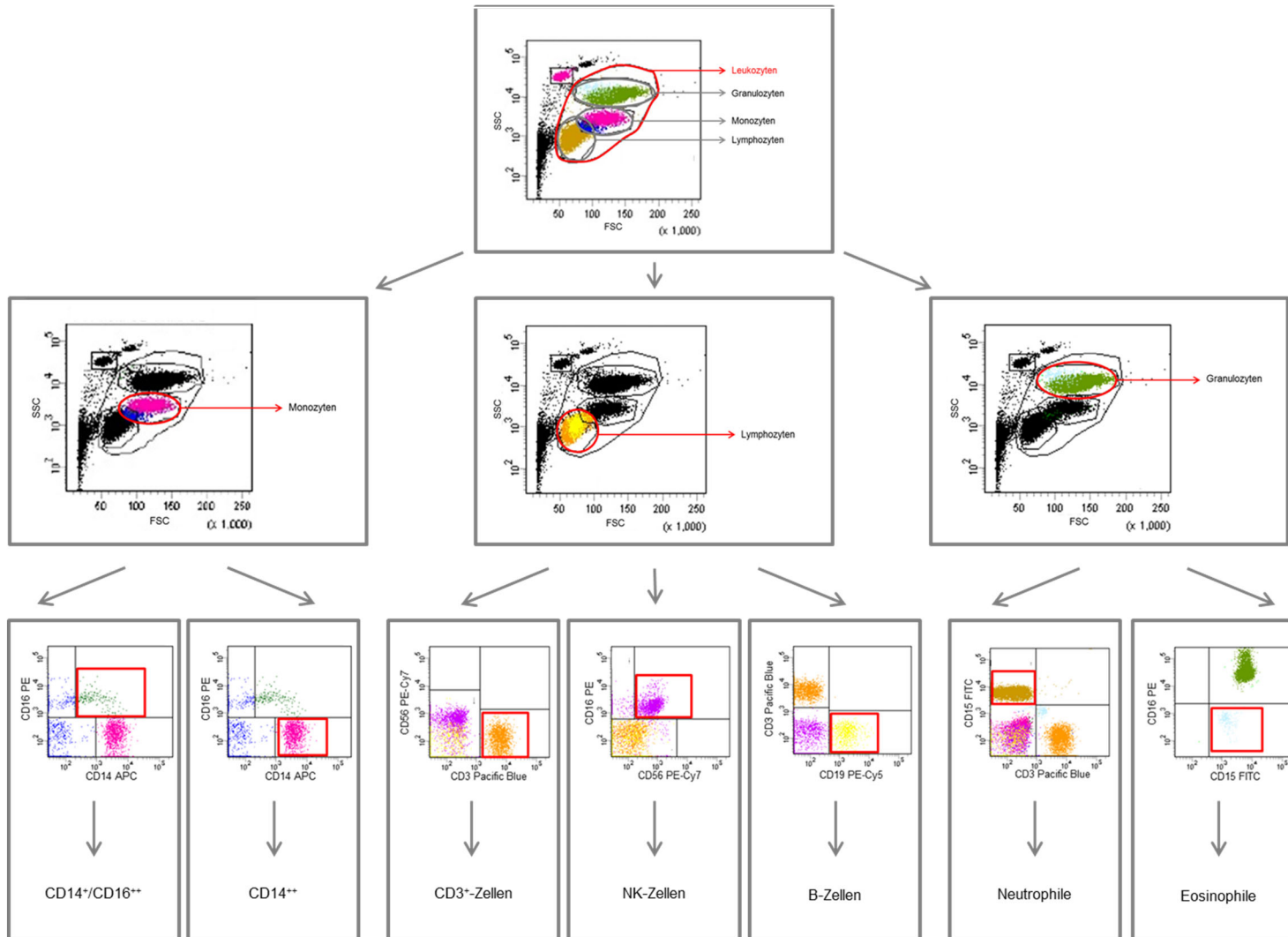


Abbildung 2: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie.

### **3.5 PBMC-Präparation**

Die Isolierung der PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen) aus dem Blut der 20 Raucher und der 20 Kontrollen erfolgte mittels Biocoll-Gradientenzentrifugation. Die Blutprobe wurde bis zur Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. 20 ml PBS und 5 ml Probandenblut wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dreimalig invertiert. In ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Biocoll pipettiert. Es folgte die vorsichtige Aufschichtung der Blut/PBS-Mischung auf den Gradienten mittels Glas Pasteur Pipette. Dabei war auf eine saubere Phasentrennung zu achten. Im Anschluss wurde das Falcon-Röhrchen mit der Aufschichtung in der Rotina 420R-Zentrifuge für 30 min bei Raumtemperatur (Beschleunigung: 1, Bremse: 0; RCF: 800) zentrifugiert. Die Auftrennung der unterschiedlichen Zellfraktionen erfolgte hierbei entsprechend ihrer Dichte. Die Erythrozyten sowie der Hauptanteil der Granulozyten bilden ein Sediment unten im Röhrchen, während sich die PBMCs in der trüben Interphase zwischen Plasma und Biocoll anreichern. Die PBMC-Schicht wurde mit einer 1 ml Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde in der Rotina 420R-Zentrifuge für 10 min bei Raumtemperatur (Beschleunigung: 9, Bremse: 9; RCF: 800) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und nochmals für 10 min bei Raumtemperatur (Beschleunigung: 9, Bremse: 9; RCF: 800) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen ein weiteres Mal auf gleiche Art gewaschen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in der Mikro200R-Zentrifuge wiederum für 10 min bei Raumtemperatur (Beschleunigung: 9, Bremse: 9; RCF: 800) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das entstandene Zellpellet bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Pro Proband wurden auf diese Art insgesamt 3 PBMC-Zellpellets hergestellt.

### **3.6 Zellzählung**

Die Zellzählung erfolgte während des ersten Waschschrilles, sobald das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert vorlag. In zwei benachbarte wells einer 96-well-Platte wurden jeweils 75 µl Trypanblau pipettiert. Anschließend wurden 25 µl der PBS-Zellpellet-Resuspension in das erste well überführt und gut gemischt,

so dass eine 1:4-Verdünnung entstand. Nun wurden 25 µl dieser Verdünnung in das zweite well überführt und gemischt, um eine 1:16 Verdünnung herzustellen. Je 10 µl pro Verdünnung wurden in je eine mit einem Deckgläschen bedeckte Kammer der Neubauer Zählkammer eingebracht. Die vitalen, sich nicht blau anfärbenden Zellen in den vier großen Eckquadranten wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus der Summe der Zellen in den vier Quadranten wurde der Mittelwert gebildet. Durch Einrechnen des Verdünnungsfaktors und des vorgegebenen Kammerfaktors kann mithilfe folgender Formeln die Zellzahl/ml Konzentration errechnet werden.

Formel für die Zellzählung in der 1:4-Verdünnung:

$$\text{Zellzahl/ml Konzentration} = (\text{Summe der 4 Quadranten}/4) * 10^4 * 4$$

Formel für die Zellzählung in der 1:16-Verdünnung:

$$\text{Zellzahl/ml Konzentration} = (\text{Summe der 4 Quadranten}/4) * 10^4 * 16$$

## **3.7 RNA-Analyse**

### **3.7.1 RNA-Extraktion**

Die RNA wurde je nach Größe des Zellpellets mit dem RNeasy Mini Kit (Pelletgröße < 10<sup>7</sup> Zellen) oder mit dem RNeasy Midi Kit (Pelletgröße > 10<sup>7</sup> Zellen) nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Diese Kits bedienen sich einerseits der Eigenschaft einer Silikagel-Membran, um RNA zu binden, andererseits der Mikrosäulenzentrifugation. Das Zellpellet wurde in RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol resuspendiert. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Probe auf die Säule aufgebracht. Es folgten mehrere Zentrifugations- und Waschschriffe mit RW1-Puffer und RPE-Puffer. Der in der Anleitung beider Kits als optional angegebene on-column DNase-Verdau wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem RNase-Free DNase Set zwischen zwei Waschschriffen mit RPE-Puffer durchgeführt. Zuletzt wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert.

Die extrahierte RNA wurde im Anschluss sofort auf Eis gestellt. Um die Reinheit und den RNA-Gehalt jeder Probe zu ermitteln, wurden sie im NanoDrop 1000

Spektrophotometer photometrisch vermessen. Als Maß für die Reinheit der RNA gilt der Quotient A260/A280. Ein Zielwert >2 wurde bei allen Proben erreicht. Als weitere Reinheitskontrolle wurde der Quotient 260/230 bestimmt, der bei allen Proben >1,5 war. Zusätzlich wurden die RNAs einzelner Probanden stichprobenartig am Bioanalyser auf Degradierung kontrolliert.

### **3.7.2 Reverse Transkription**

Bei der reversen Transkription wird die aus den PBMC-Pellets extrahierte RNA mittels einer RNA-abhängigen Polymerase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Diese dient als Ausgangsmaterial für die qPCR (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion). Die cDNA ist komplementär zur Ausgangs-RNA und enthält nur codierende Sequenzen. Sie kann somit genutzt werden, um die Expression bestimmter Gene zu detektieren. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Als Ansatz 1 wurden 1 µg Total-RNA und 2 µl Random Primer-Verdünnung (1:6,4) mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 11,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 min bei 70 °C im Mastercycler inkubiert, um den Primern ein optimales Anlagern an die RNA zu ermöglichen.

Um gleiche Reaktionsbedingungen für alle Ansätze zu gewährleisten, wurde ein Mastermix für alle Proben hergestellt. Er enthielt je Probe 4 µl First Strand Buffer, 2 µl 0,1M dTT, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 0,5 µl RNasin Plus RNase Inhibitor und 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase.

Pro Probe wurden 8,5 µl Mastermix zu Ansatz 1 gegeben und gevortext. Im Mastercycler folgte ein fünfminütiges Annealing bei 25 °C und anschließend die Elongation für 60 min bei 37 °C. Der Ansatz wurde danach sofort auf Eis gestellt.

### **3.7.3 DNase Verdau**

Um eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Vorbereitend wurde die DNase I mit aqua bidest. 1:10 verdünnt. Pro 20 µl cDNA-Ansatz wurden 0,5 µl DNase I-Verdünnung hinzugegeben, kurz zentrifugiert und im Mastercycler für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms durch

Inkubation für 10 min bei 75 °C. Zuletzt wurde der cDNA-Ansatz 1:5 mit aqua bidest. verdünnt.

#### **3.7.4 RT-qPCR**

Die qPCR (quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode, mit der spezifische, durch entsprechende Primer definierte DNA-Fragmente vervielfacht und zusätzlich quantifiziert werden können. Die PCR erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst wird die doppelsträngige DNA denaturiert, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend lagern sich die Primer für eine gewünschte Sequenz an die komplementäre Sequenz der Ausgangs-DNA an (Annealing). Es folgt die Extension, bei der eine DNA-Polymerase die Primer durch Einbau von dNTPs entlang der einzelsträngigen Matrize verlängert. Am Ende ist somit der gewählte DNA-Abschnitt verdoppelt worden und liegt nun wieder doppelsträngig vor. Durch Wiederholen dieser Schritte kann also ein DNA-Segment exponentiell vervielfacht werden.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte werden DNA-Farbstoffe eingesetzt, die mit der DNA interagieren und Fluoreszenz freisetzen. Hier wurde SYBR Green benutzt, ein Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und in gebundenem Zustand fluoresziert. Je mehr doppelsträngige DNA im Ansatz vorliegt, desto größer ist folglich die Fluoreszenzzunahme. Als Spezifitätskontrolle wird die Schmelzkurvenanalyse herangezogen. Dabei wird die DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen und die entstandenen DNA-Segmente denaturieren bei einer für sie spezifischen Temperatur zu zwei Einzelsträngen. Der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt, woraus eine Fluoreszenzabnahme resultiert. Da der Schmelzpunkt spezifischer DNA-Fragmente höher ist, als der von Primerdimeren oder unspezifischen Nebenprodukten, kann das Vorliegen solcher mithilfe der Schmelzkurven beurteilt werden.

Die verwendeten Primer sind in unserem Labor hinsichtlich Konzentration und Effizienz bereits etabliert.

Zur Durchführung der qPCR wurden zwei Ansätze hergestellt:

Ansatz 1: Primermixe, die in bestimmter Konzentration forward- und reverse-Primer enthielten, wurden nach folgendem Schema hergestellt und mit aqua bidest. aufgefüllt.

Gen	conc. forward-Primer ( $\mu\text{M}$ )	conc. reverse-Primer ( $\mu\text{M}$ )
HPRT	0,50	0,50
RPL19	0,50	0,50
PSMA3	0,50	0,50
PSMB5	0,50	0,50
PSMB6	0,50	0,50
PSMB7	0,50	0,75
PSMB8	0,75	0,75
PSMB9	0,75	0,75
PSMB10	0,25	0,50
PSMC3	0,50	0,50
PSMD11	0,50	0,50
PA200	0,50	0,75
PA28 $\alpha$	0,50	0,50
PA28 $\beta$	0,50	0,50
PA28 $\gamma$	0,50	0,50
IFN $\gamma$	0,75	0,75
PI31	0,50	0,50
CYP1A1	0,50	0,50

**Tabelle 5: Primer-Mix für quantitative PCR-Reaktion**

**Ansatz 2:**

- 2,5  $\mu\text{l}$  cDNA je Reaktion
- 5  $\mu\text{l}$  Light Cycler 480 SybrGreen 1 Master Mix

Pro well einer 96-well-Platte wurden 2,5 µl aus Ansatz 1 und 7,5 µl aus Ansatz 2 eingebracht, was ein Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl pro well ergab. Für jede Probe wurden pro Gen Doppelbestimmungen durchgeführt.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die Platte in den Lightcycler gestellt und durchlief folgende Schritte:

1. Prä-Inkubation: Diese dient einerseits der Aktivierung der im Roche-Mix enthaltenen DNA-Polymerase, andererseits der Denaturierung der DNA. Sie erfolgte 2 min bei 50 °C und anschließend weitere 5 min bei 95 °C.

2. Amplifikation: Hierbei kommt es zur exponentiellen Vervielfachung der DNA. Die Temperatur steigt für 5 Sekunden auf 95 °C an, dabei werden die DNA-Segmente denaturiert. Anschließend sinkt die Temperatur für 5 Sekunden auf 59 °C, um das optimale Anlagern der Primer zu ermöglichen. Danach steigt die Temperatur für 10 Sekunden auf 72 °C an. Dies ist die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase, die die Primer verlängert. In einer weiteren Sekunde bei 72 °C erfolgt die Quantifikationsmessung, die einmal pro Amplifikationszyklus durchgeführt wird. Dieser Zyklus wird 45 Mal wiederholt, um die exponentielle Vermehrung der DNA-Segmente zu erreichen.

3. Schmelzkurve: Nach Abschluss der 45 Amplifikationszyklen wird die Temperatur für 5 Sekunden auf 95 °C erhöht, danach für 1 min auf 60 °C abgekühlt und erneut kontinuierlich auf eine Temperatur von 97 °C erhöht. Durch Aufschmelzen der DNA-Fragmente kommt es dabei zu einem Fluoreszenzverlust, der gegen die Temperatur aufgetragen wird, sodass die Schmelzkurve abgelesen werden kann.

Die Auswertung der qPCR basierte zum einen auf dem  $C_t$ -Wert (Threshold-cycle-Wert). Dieser ermöglicht eine Aussage darüber, nach wie vielen Amplifikationszyklen das Fluoreszenzsignal über das Level des Thresholds hinaus ansteigt. Dabei ist der Threshold ein festgelegtes Fluoreszenzlevel, das einen statistisch signifikanten Anstieg des Signals über die sogenannte „baseline“ hinaus widerspiegelt. Die relative Quantifizierung der einzelnen Genprodukte basiert auf einem  $\Delta C_t$ -Wert, d.h. der Differenz zwischen dem  $C_t$ -

Wert eines zu detektierenden Gens und des  $C_t$ -Werts eines sogenannten „housekeeper“-Gens, dessen Expression in allen Proben gleich hoch sein sollte und das deswegen als Referenzwert angenommen werden kann. Hier wurden als housekeeper-Gene RPL19 und HPRT genutzt und als Referenzwert wie empfohlen das geometrische Mittel ihrer  $C_t$ -Werte verwendet (Vandesompele et al., 2002). Doppelbestimmungen, die sich in ihren  $C_t$ -Werten um mehr als  $|0,5|$  unterschieden, wurden aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der  $2^{-\Delta C_t}$ -Wert verwendet.

Zudem wurde nach der qPCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wodurch die Entstehung von Primer-Dimeren oder Nebenprodukten ausgeschlossen werden konnte.

### 3.8 Lyse des PBMC-Pellets zur Proteinextraktion

Die Lyse der PBMC-Pellets erfolgte in TSDG-Puffer-Mix. Dazu wurden dem TSDG-Puffer ein Proteasehemmer (25x complete) und ein Phosphatasehemmer (10x PhosStop) in Volumina, bis beide als 1x-Verdünnung vorlagen, hinzugefügt. Das PBMC-Zellpellet wurde je nach Größe in unterschiedlichen Volumina des Puffer-Mixes resuspendiert, um ähnliche Proteinkonzentrationen zu erreichen. Die entsprechenden Volumina sind der Tabelle zu entnehmen.

Zellzahl des PBMC-Pellets (Mio.)	Volumen des TSDG-Puffer-Mixes ( $\mu$ l)
<4	40
4-9	60
9-13	80
13-17	100
17-21	120
>21	140

**Tabelle 6: TSDG-Volumina zur PBMC-Lyse**

Um die Zellen zu lysieren, wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde sieben Mal wiederholt. Anschließend wurde das Lysat bei 14000



RCF für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, um nicht lysierte Zellen und große Bruchstücke zu entfernen. Der Überstand (die zytoplasmatische Fraktion) wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Aliquots zu je 20 µl wurden bei -80 °C weggefroren.

### **3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA- (Bicinchoninsäure-) Assay verwendet. Dazu wurde das Pierce BCA Protein Assay-Kit benutzt. 10 µl pro Probe wurden mit PBS 1:7 verdünnt. Auf gleiche Art wurde mit 10 µl des TSDG-Puffer-Mixes verfahren, um einen Leerwert zu erhalten. Die Standardkurve wurde mit den im Kit enthaltenen bovinen Serumalbumin-Standards in verschiedenen Konzentrationen erstellt. Die Standards und die Verdünnungen der Proben und des TSDG-Puffer-Mixes wurden in Triplikaten auf eine transparente 96-well-Platte aufgebracht. Der BCA-Assay wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, jedoch wurden 20 µl Probe pro well eingesetzt. Nach Zugabe von 200 µl BCA-Working Reagent pro well wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde am plate reader Sunrise bei 562 nm mit der Magellan-Software 7.2 gemessen. Der Leerwert des TSDG-Puffer-Mixes wurde abgezogen. Für weitere Berechnungen wurde der Mittelwert der Triplikate eingesetzt.

### **3.10 Massenspektrometrie**

#### **3.10.1 FASP-Verdau (Filter-aided sample preparation-Verdau)**

Um die Proteinproben für die Massenspektrometrie vorzubereiten, wurde ein FASP-Verdau durchgeführt. Dieser dient einerseits dazu, Puffer und unverdauliche Partikel, die die Massenspektrometrie beeinflussen könnten, zu entfernen, andererseits dazu, die Proteine in Polypeptide zu zerlegen.

Pro Proband wurden 10 µl Protein eingesetzt und ad 100 µl mit 0,1M Tris/HCl (pH 8,5) aufgefüllt. Um Disulfidbrücken zwischen den Proteinen zu reduzieren, wurden anschließend 10 µl 100 mM DTT-Lösung zur Probe pipettiert und gut gemischt. Danach wurden die Proben bei 60 °C für 30 min auf dem Schüttler inkubiert und zum Abkühlen 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es

wurden 100 µl UA-Puffer hinzugefügt, wodurch eine Denaturierung der Proteine erreicht wurde. Im Anschluss wurden 10 µl 2-Iodacetamid-Lösung (300 mM) hinzupipettiert, um die Proteine zu alkylieren und maximal zu entfalten. Die Probe wurde 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, danach auf einen Microcon Zentrifugationsfilter aufgebracht und zentrifugiert, wobei die denaturierten Proteine im Filter hängenbleiben. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 14000 RCF für 15 min bei Raumtemperatur. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Im Anschluss wurde die Membran drei weitere Male mit je 200 µl UA-Puffer gewaschen. Um den Harnstoff zu entfernen und bessere pH-Werte für den Trypsinverdau zu erzielen, erfolgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 100 µl 50mM ABC-Puffer. Der Filter wurde in ein neues LoBind Eppendorf Röhrchen überführt. Es wurden 40 µl ABC-Puffer und 1 µg Lys-C auf den Filter pipettiert und bei RT für 120 min auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µg Trypsin und 10 µl ABC-Puffer hinzugefügt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm zusätzlich abgedichtet und der Trypsinverdau erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am Folgetag wurden die verdauten Peptide durch den Filter zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein neues LoBind Röhrchen überführt und 20 ml ABC-Puffer mit 2 % Acetonitril wurden auf den Filter gegeben und bei 16000 RCF für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Durchfluss mit TFA angesäuert, bis ein pH von 2 erreicht war, um den Trypsinverdau abzustoppen.

### **3.10.2 HPLC-Massenspektrometrie**

Die HPLC- (high performance liquid chromatography-) Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das die Chromatographie mit der Massenspektrometrie koppelt. Dabei ist die HPLC der Massenspektrometrie vorgeschaltet und dient zur Auftrennung der Probe. Das im Trypsinverdau entstandene Peptidgemisch lag flüssig vor und wurde als „mobile Phase“ durch eine Trennsäule gepumpt, welche die „stationäre Phase“ enthielt. Die Trennsäule war hier eine C18-Säule, bei der ein Kieselgel mit C18-Ketten auf der Oberfläche als „stationäre Phase“ diente. Diese unpolare Oberfläche wechselwirkt mit den hydrophoben Bereichen der zu analysierenden Peptide, was dazu führt, dass polare Peptide leichter eluiert werden und die Säule schneller verlassen. Die aufgetrennten Peptide wurden

anschließend der Massenspektrometrie zugeführt. Dort wurden sie zuerst an einer Ionenquelle ionisiert, was mittels Elektrospray-Ionisation erfolgte. Dabei wurde die Probe durch eine Kapillare in ein elektrisches Feld eingebracht, wobei sich kleine, gleichartig geladene Tröpfchen bilden, die die Kapillare als Aerosol verlassen. Da das Lösungsmittel immer mehr verdampft, rücken die gleichartigen Ladungen immer näher zusammen, bis sie sich schließlich abstoßen und freie Ionen in Gasphase vorliegen.

Die noch intakten Peptidionen wurden in der linearen Ionenfalle analysiert und selektiert, wobei nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis durchgelassen werden. Diese wurden dann in der Kollisionszelle fragmentiert und im Orbitrap Mass analyzer gemessen. Aus dem Fragmentspektrum des ausgewählten Peptides war die Aminosäuresequenz ableitbar.

Die Spektren wurden dann mit der Progenesis Software (Version 2.5, Nonlinear) relativ zueinander quantifiziert. Alle MS/MS Spektren wurden aus der Progenesis Software als Mascot generic file (mgf) exportiert und zur Identifikation der Peptide mit Mascot (Version 2.2) in der Ensembl database for human verwendet.

### 3.11 Westernblot-Analyse

#### 3.11.1 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für alle Experimente wurden 1,5 mm dicke Gele mit einem Acrylamidanteil von 15 % im Trenngel verwendet. Zuerst wurde das Trenngel nach folgendem Rezept hergestellt, wobei APS und TEMED als letztes hinzugegeben wurden:

Bestandteil	Volumen
4x Trennpuffer	2 ml
30 % Acrylamid	4 ml
aqua bidest.	2 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	12 µl

**Tabelle 7: Zusammensetzung Trenngel**

Das Trenngel wurde zwischen zwei saubere Glasplatten gefüllt und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu bekommen. Nach ca. 20 min wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel nach folgendem Rezept hergestellt:

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen</b>
4x Sammelpuffer	1 ml
30 % Acrylamid	480 µl
Aqua bidest.	2,52 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	12 µl

**Tabelle 8: Zusammensetzung Sammelgel**

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel aufgebracht und ein Gelkamm für 15 Probenaschen eingesetzt. Nach Aushärten des Sammelgels wurde das Gel entweder direkt verwendet oder eingeschlagen in feuchte Papiertücher für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert.

Pro Proband wurden für ein Gel 10 µg Protein eingesetzt. Die Probe wurde vorbereitet, indem das nötige Probenvolumen für 10 µg Protein berechnet und in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Das identische Volumen an 2x Laemmli-Puffer wurde hinzugegeben und die Probe wurde ad 20 µl mit 1x Laemmli-Puffer aufgefüllt.

Die Glasplatten wurden in eine Gelkammer eingesetzt. Ein Liter Laufpuffer wurde vorbereitet und zwischen die beiden Glasplatten gefüllt. Nach Entfernen des Gelkamms wurden die Taschen mit einer Kanüle mit Laufpuffer ausgespült. 3 µl eines gefärbten Proteinmarkers wurden in eine randständige Geltasche geladen. Anschließend wurden je 20 µl der vorbereiteten Proben pro Geltasche geladen, wobei darauf geachtet wurde, dass sowohl Proben von Rauchern als auch von Kontrollprobanden auf einem Gel vorhanden waren. Der restliche Laufpuffer wurde in die Kammer gefüllt und das Gel bei konstant 120 Volt für 90 min bei Raumtemperatur laufen gelassen.

### **3.11.2 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die Probenvorbereitung erfolgte auf Eis. Pro Proband wurden 7,5 µg Protein mit 7,5 µg aqua bidest. vorbereitet und 5x Ladepuffer im Verhältnis 1:5 hinzugegeben. Die Gele wurden in die Gelkammer eingesetzt, Laufpuffer wurde vorbereitet und zwischen die Gelplatten gefüllt. Pro Geltasche wurden 15 µg der vorbereiteten Probe geladen. Um die Vergleichbarkeit der Gele untereinander zu garantieren, wurde eine bestimmte Probe auf alle Gele auf die gleiche Position aufgetragen. Das Gel wurde bei konstant 150 V für 240 min laufen gelassen.

### **3.11.3 Immunoblotting SDS-Gele**

Beim Westernblot werden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde in einer Schale mit Transfer-Puffer eine Sandwich-Konstruktion vorbereitet. Auf die untere Hälfte des Plastikhalters wurde ein Schwamm gelegt. Darauf wurden 3 Whatman-Papiere platziert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, mit Transfer-Puffer abgespült und auf die Whatman-Papiere gelegt. Auf die Membran wurde das SDS-Gel aufgebracht. Zuletzt folgten 3 weitere Whatman-Papiere und darauf wieder ein Schwamm. Luftblasen wurden vorsichtig herausgedrückt. Der Plastikhalter wurde in eine Transfer-Kammer überführt und 1 Liter Transfer-Puffer wurde hinzugegeben. Der Blot wurde bei konstant 100 V für 90 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für mindestens 60 min in 1x Roti-Block-Lösung gelegt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken.

### **3.11.4 Immunoblot Nativgel**

Das Nativgel wurde für 15 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug in Solubilisations-Puffer gelegt, um native Proteinkomplexe zu zerlegen, die sonst eventuell im Gel zurückbleiben würden. Dann wurde der Blot auf gleiche Art wie beim SDS-Gel zusammengebaut. Er wurde bei konstant 250 mA für 90 min laufen gelassen und anschließend ebenfalls in 1x Roti-Block-Lösung geblockt.

### **3.11.5 Proteindetektion**

#### **3.11.5.1 Gesamtproteindetektion SDS-Gel – Coomassie-Färbung**

Die Detektion aller aufgetrennten Proteine im SDS-Gel erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung. Der Coomassie-Brillant-Blau-Farbstoff färbt Proteine

unspezifisch an und kann deswegen zur Gesamtproteindetektion genutzt werden. Das Gel wurde über Nacht auf dem Schüttler mit Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit aqua bidest. gewaschen. Es wurde am ChemiDoc XRS<sup>+</sup>-System oder dem Gel Doc EZ Imager eingescannt, wobei die Image Lab Software Version 4.0.1 verwendet wurde.

**3.11.5.2 Gesamtproteindetektion PVDF-Membran – Amido Black Färbung**  
Die Detektion aller auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteine wurde mit der Amido Black Staining Solution 2x nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach dem Waschen wurde die Membran getrocknet und anschließend unter Verwendung der Image Lab Software Version 4.0.1 am ChemiDoc XRS<sup>+</sup>-System eingescannt.

**3.11.5.3 Detektion spezifischer Proteine auf der PVDF-Membran**  
Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die PVDF-Membran nach dem Blocken in Primärantikörper-Verdünnungslösung eingelegt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal für je mindestens 10 min mit PBST gewaschen und danach auf dem Schüttler für 60 min bei RT mit Sekundärantikörper-Verdünnung inkubiert. Die hier verwendeten Sekundärantikörper waren jeweils an die horseradish-Peroxidase gekoppelt. Die Membran wurde 3 weitere Male mit PBST gewaschen. Zum Entwickeln wurden pro Membran 500 µl enhanced chemiluminescence- (ECL-) Lösung nach Herstellerangaben vorbereitet und die Membran vollständig damit benetzt. Bei Proteinen mit zu schwacher Signalintensität wurde statt ECL-Lösung die sensitivere Femto Maximum-Lösung verwendet. Zum Entwickeln wurde entweder das ChemiDoc XRS<sup>+</sup>-System verwendet oder die Blots wurden in der Dunkelkammer entwickelt, indem Röntgenfilme für eine definierte Zeit auf den Blot gelegt und dann am Tischentwickler Curix 60 entwickelt wurden.

## **3.12 Ermittlung der proteasomalen Aktivität**

### **3.12.1 Fluoreszenz-Assay**

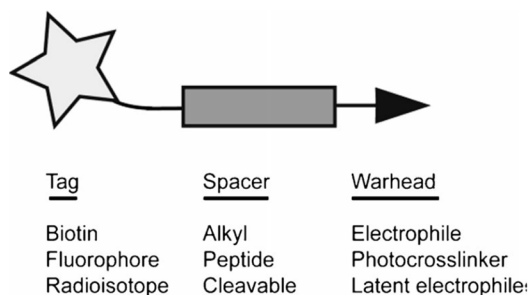
Um die Aktivität der aktiven Zentren des Proteasoms mit Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität ( $\beta_5$  und  $\beta_5i$ ) zu ermitteln, wurde das fluorogene Substrat Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin activity substrate (SLLVY) verwendet.

Der Fluorophor 7-amino-4-methylcoumarin wird durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität abgespalten und die Fluoreszenz kann als Maß für die CT-L Aktivität des Proteasoms angesehen werden.

Dazu wurde das Nativgel für 30 min bei 37 °C in Reaktions-Puffer inkubiert, welcher das fluorogene Substrat enthielt. Unmittelbar danach wurde es mit dem ChemiDoc XRS<sup>+</sup>-System eingescannt.

### 3.12.2 Activity-based protein profiling

Die Aktivität der verschiedenen katalytischen Untereinheiten des Proteasoms wurde mithilfe von activity-based probes (ABPs) untersucht. Im Unterschied zur im letzten Punkt beschriebenen Methode sind ABPs keine Substrate, die vom Proteasom umgesetzt werden, sondern Proteasominhibitoren, die kovalent an das aktive Zentrum des zu detektierenden Enzyms binden und dieses dadurch hemmen (Abbildung 3). Durch ihre spezifische Bindung an aktive Enzyme erlauben sie eine sichere Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Enzymen. Zudem sind sie mit einem „tag“ versehen, der die Detektion der ABPs via Fluoreszenzscanner erlaubt.



**Abbildung 3: Aufbau einer ABP:** Die ABP besteht zumeist aus dem Warhead, einer reaktiven Gruppe, die an das aktive Zentrum des Enzyms bindet, einem Tag, der die Detektion ermöglicht, und einem Spacer, der Tag und Warhead zusammenhält [aus: (Serim et al., 2012)].

Um die Aktivität der drei konstitutiven und der drei Immuno-Untereinheiten beurteilen zu können, wurden drei verschiedene ABPs genutzt, von denen jede die Unterscheidung zwischen einer Immuno-Untereinheit und der entsprechenden konstitutiven Untereinheit ermöglicht. Mit der Probe LW124 kann zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 1i$  unterschieden werden, die Probe MV151 ermöglicht eine Unterscheidung von  $\beta 2$  und  $\beta 2i$  und die Probe MVB127 kann zwischen  $\beta 5$

und  $\beta 5i$  differenzieren. Die verwendeten Konzentrationen und die Wellenlängen beim Scannen sind Tabelle 9 zu entnehmen.

ABP	Selektivität	Conc./Lysat [ $\mu\text{M}$ ]	Conc./50x [ $\mu\text{M}$ ]	ex $\lambda$ [nm]	em $\lambda$ [nm]
MV151	alle Untereinheiten	0,5	25	530	560
LW124	$\beta 1/\beta 1i$	0,25	12,5	488	514
MVB127	$\beta 5/\beta 5i$	1	50	532	560

**Tabelle 9: Activity-based probes**

Vorbereitend wurde pro Proband ein Ansatz für jede der drei ABPs hergestellt. Dazu wurden 15  $\mu\text{g}$  Protein pro Ansatz eingesetzt. Das größte dafür benötigte Volumen wurde festgesetzt (hier: 12,40  $\mu\text{l}$ ) und alle anderen Proben wurden mit TSDG-Puffer ad 12,40  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit HEPES-Puffer ad 30  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. 0,6  $\mu\text{l}$  einer ABP wurden hinzupipettiert und gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz auf dem Schüttler bei 37 °C für 60 min bei 600 rpm inkubiert, wobei die ABPs an die aktiven Untereinheiten des Proteasoms binden. Danach wurden pro Probe 7,5  $\mu\text{l}$  5x SB hinzupipettiert, um den Reaktionsprozess abzustoppen. Die Ansätze wurden bis zur Verwendung eingefroren.

Für die SDS-Gelelektrophorese der ABP-Ansätze wurden breite Gelkammern verwendet und die Volumina von Sammel- und Trenngel dementsprechend angepasst. Auf ein Gel wurden jeweils die Ansätze pipettiert, die dieselbe ABP enthielten. In die äußeren Taschen des Gels wurden 3  $\mu\text{l}$  eines gefärbten Proteinmarkers aufgetragen. Von den vorbereiteten Ansätzen wurden jeweils 15  $\mu\text{l}$  pro Geltasche aufgetragen. Das Gel wurde bei konstant 120 Volt für ca 90 min laufen gelassen und anschließend am Typhoon Scanner eingescannt.

### 3.13 Auswertung

#### 3.13.1 Densitometrische Auswertung der Daten

Die Westernblots, der Fluoreszenz-Assay sowie das Activity-based protein profiling wurden densitometrisch ausgewertet. Dazu wurde entweder die ImageJ



1.48v-Software (ABP-Gele, Westernblots) oder die ImageLab-Software Version 4.0.1 (Nativgele) verwendet. Die Auswertung erfolgte über die Signalstärke einzelner Banden. Bei den Westernblots wurden die Proben anhand der Amido Black Färbung normalisiert.

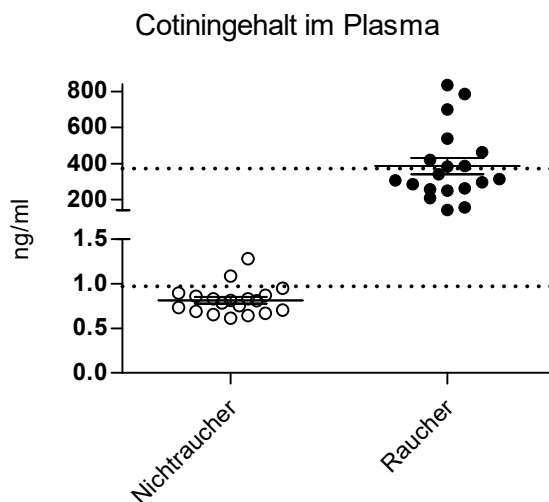
### **3.13.2 Statistische Auswertung der Daten**

Die Statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 5.00. Es wurde der Mann-Whitney-Test sowie für Korrelationen der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient angewendet. Ausreißer wurden mit dem ROUT-Test identifiziert und verworfen. Das Konfidenzintervall betrug 95 % und Signifikanzniveaus von 5 %, 1 % und 0,1 % wurden verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen und markiert mit \* für  $P < 0,05$ , mit \*\* für  $P < 0,01$  und mit \*\*\* für  $P < 0,001$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Cotinin-ELISA

Um sicherzustellen, dass die als Nichtraucher deklarierten Probanden keine nennenswerte Nikotinbelastung vorweisen, wurde per Cotinin-ELISA der Cotiningehalt im Plasma der Probanden bestimmt. Dabei zeigten sich die Cotininwerte der Raucher um mehr als 130fach erhöht im Vergleich zu den Werten der Nichtraucher. Die meisten Werte der Nichtraucher befanden sich an der Grenze der Detektion, während einige Werte der Raucher den höchsten Standardwert überschritten (Abbildung 4). Die Zuordnung in die Raucher- bzw. Nichtrauchergruppe war bei jedem Probanden korrekt.



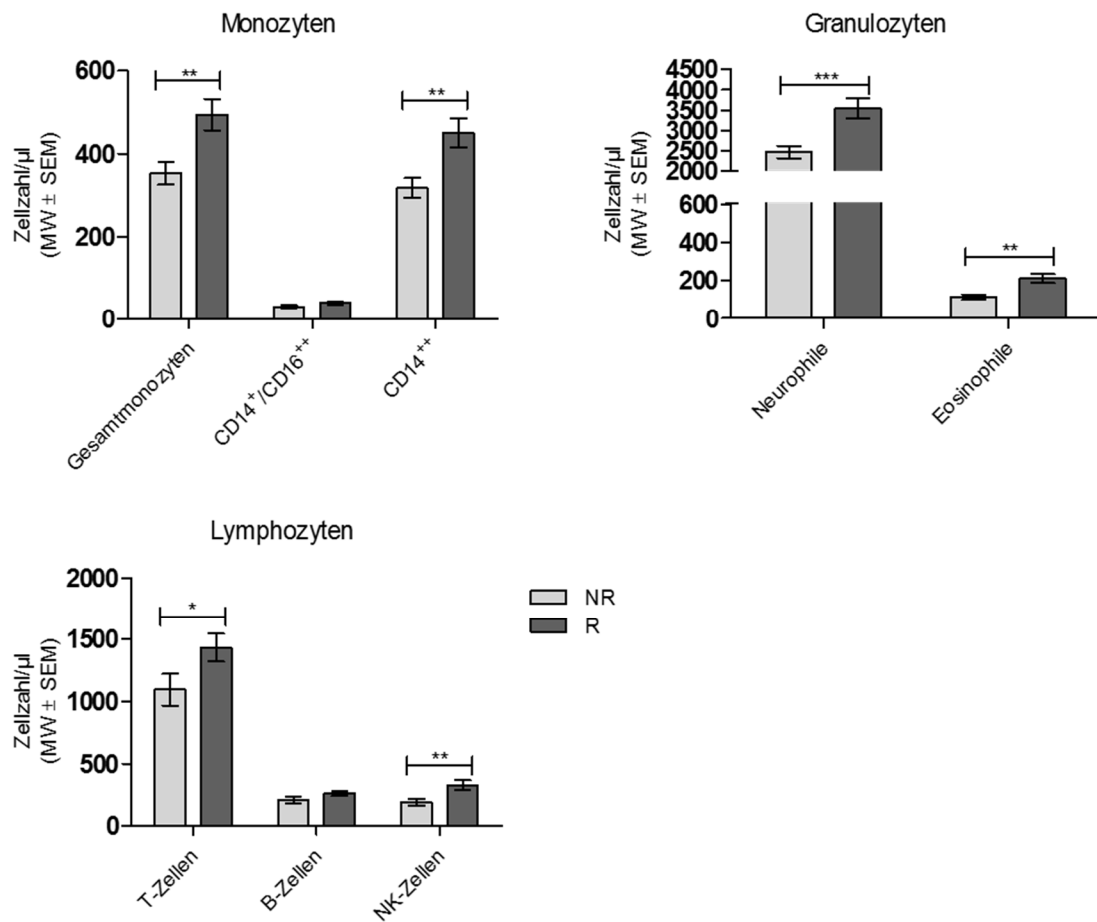
**Abbildung 4: Cotiningehalt im Plasma von Rauchern und Nichtrauchern:** Ermittelt mittels Cotinin-ELISA. Die gestrichelten Linien repräsentieren den höchsten und den niedrigsten mitgelieferten Standardwert.

### 4.2 Durchflusszytometrische Analyse

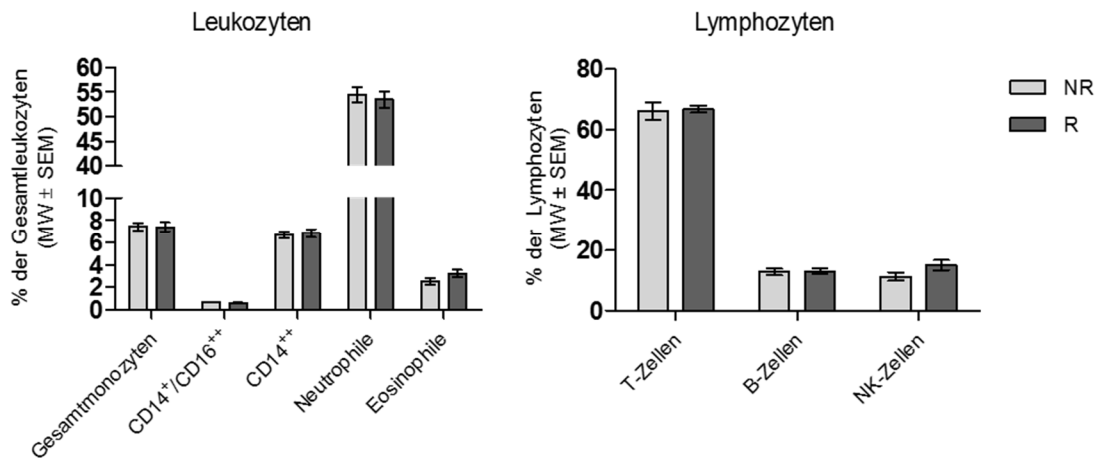
Um die Vergleichbarkeit des Blutes von Rauchern und Nichtrauchern zu gewährleisten, wurde die Zellzusammensetzung des Vollblutes beider Gruppen untersucht. Nach Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern wurden diese per Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden sowohl die absoluten Zellzahlen als auch die relative Zellzusammensetzung im Vollblut ermittelt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, wiesen die Raucher in allen ermittelten Zellgruppen außer den CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>-Monozyten und den B-Zellen signifikant mehr Zellen als die Nichtraucher auf (Abbildung 5A). Sowohl bei den Rauchern als auch bei

den Nichtrauchern waren die neutrophilen Granulozyten vor den T-Zellen die am häufigsten detektierten Zellpopulationen. Die relative Zellzusammensetzung des Vollbluts der Raucher unterschied sich in keiner Zellpopulation signifikant von der der Nichtraucher (Abbildung 5B).

**A**



## B



**Abbildung 5: Zellzusammensetzung des Vollblutes von Rauchern und Nichtrauchern:** Ermittelt mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern. (A) Absolute Zellzahlen von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten im Vollblut. (B) Relative Zellzusammensetzung des Vollbluts. MW ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 4.3 RNA-Expressionsanalyse

Um zu überprüfen, ob Rauchen die Expression des Proteasoms und seiner einzelnen Untereinheiten beeinflusst, wurde mittels RT-qPCR in isolierten PBMCs die mRNA-Expression verschiedener proteasomaler Gene getestet. Detektiert wurden verschiedene konstitutive und Immuno-Untereinheiten, Regulatoren und 19S-Untereinheiten.

Die Expressionswerte nahezu aller detektierten Gene zeigten relativ stabile Werte und lagen bei Rauchern und Nichtrauchern in einem vergleichbaren Range.

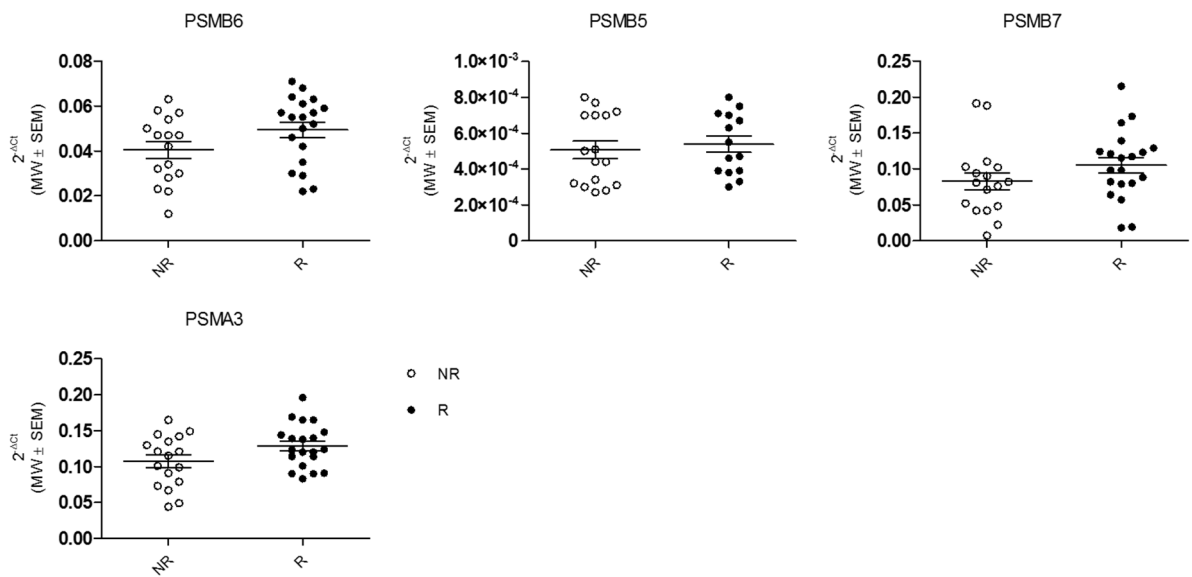
Bei allen getesteten konstitutiven Untereinheiten (PSMB6, PSMB5, PSMB7 und PSMA3) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern detektiert werden (Abbildung 6A).

Auch bei den Immuno-Untereinheiten (PSMB9, PSMB10 und PSMB8) zeigten sich keine Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Es fiel hingegen eine in beiden Gruppen leicht verminderte Expression von PSMB9 verglichen mit PSMB8 und PSMB10 auf (Abbildung 6B).

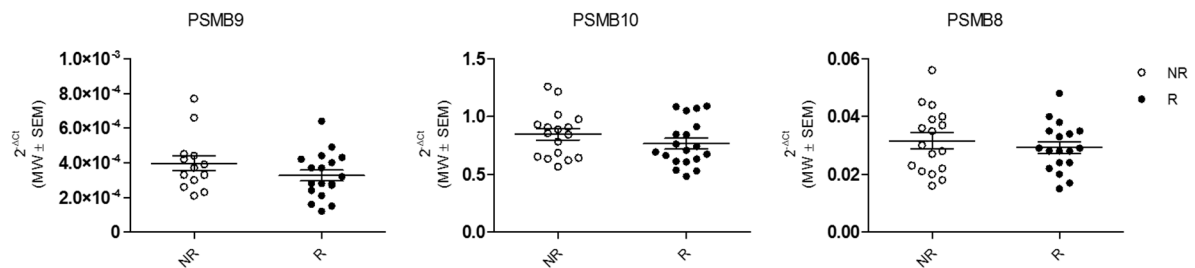
Ebenso unterschied sich die Expressionen der detektierten Regulatoren (Abbildung 6C) und 19S-Untereinheiten (Abbildung 6D) bei Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant.

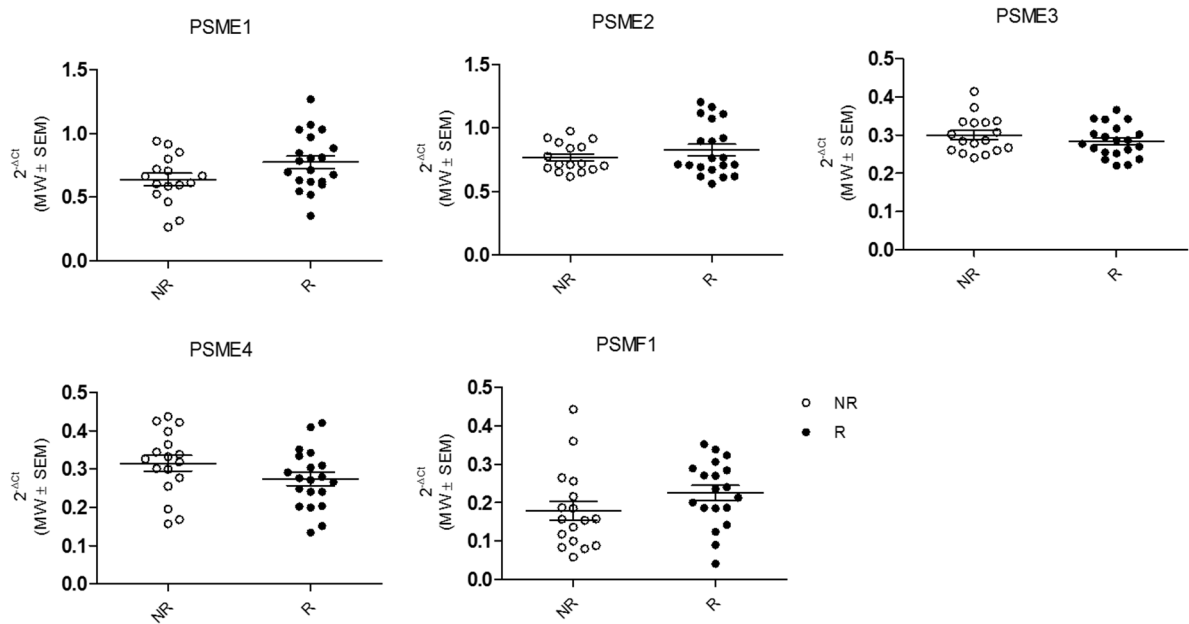
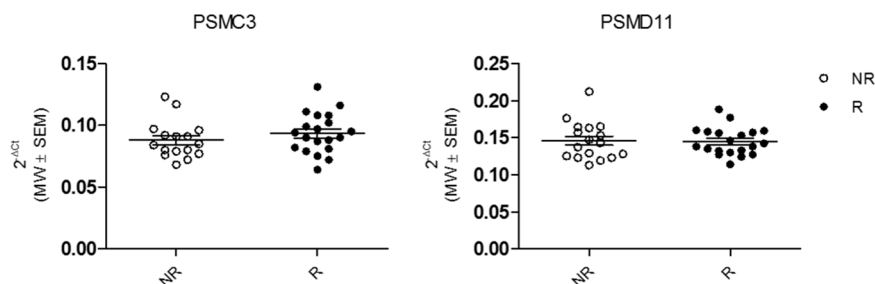
Somit lässt sich schlussfolgern, dass Rauchen die Expression proteasomaler Untereinheiten in PBMCs nicht signifikant beeinflusst.

**A**



**B**



**C****D**

**Abbildung 6: Expressionsanalyse unterschiedlicher proteasomaler Untereinheiten auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR:** Nach RNA-Extraktion aus PBMCs, reverser Transkription und DNase Verdau wurde mittels RT-qPCR die Expression von **(A)** kompetitiven Untereinheiten, **(B)** Immuno-Untereinheiten, **(C)** Regulatoren und **(D)** 19S-Untereinheiten bestimmt. MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.4 Protein-Expressionsanalyse mittels HPLC-Massenspektrometrie

Proteasomen sind abundante Moleküle in der Zelle, ihre relative Menge lässt sich mittels Massenspektrometrie und label free quantification in einem high throughput Ansatz quantitativ bestimmen. Die Massenspektrometrie ermöglicht somit eine Detektion vieler proteasomaler Untereinheiten auf einmal. Die relative Abundanz der ermittelten proteasomalen Untereinheiten ist in Abbildung 7 ersichtlich. Dazu wurden pro Proband die detektierten Untereinheiten auf die

detektierte Gesamtproteinanzahl normalisiert. Es wurde ein cut-off von mindestens 30 Proteinen gewählt.

Von den 7 bekannten  $\alpha$ -Untereinheiten konnten 5 in allen Proben sicher detektiert werden ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$ ). Zwei der detektierten  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1$  und  $\alpha 3$ ) zeigten eine signifikante Erhöhung im Proteinlysate der Raucher gegenüber den Nichtrauchern (Abbildung 7A).

Auch bei den  $\beta$ -Untereinheiten imponierten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Von den katalytischen Untereinheiten konnten in beiden Gruppen nur Immuno-Untereinheiten ( $\beta 1i$  und  $\beta 5i$ ) detektiert werden.  $\beta 1i$  war bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern signifikant erhöht. Es war bei allen Rauchern nachweisbar, jedoch bei 5 der 20 Nichtraucher unterhalb der Nachweisgrenze.  $\beta 5i$  konnte in allen Proben nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Die übrigen katalytischen Untereinheiten ( $\beta 2i$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ ) blieben unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 7B).

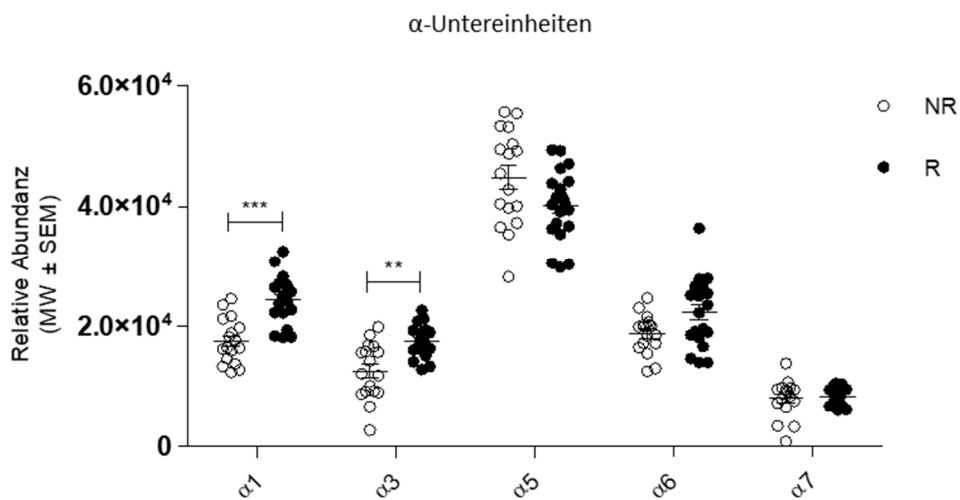
Bei den nicht-katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten konnten  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 6$  nachgewiesen werden,  $\beta 7$  war nicht detektierbar.  $\beta 3$  und  $\beta 4$  zeigten sich bei den Rauchern verglichen mit den Nichtrauchern signifikant erhöht. Beide Untereinheiten konnten bei allen Rauchern sicher nachgewiesen werden, jedoch konnte  $\beta 3$  bei 3 der 20 Nichtraucher nicht sicher detektiert werden. Bei  $\beta 6$  war kein Unterschied auszumachen (Abbildung 7B).

Es wurden zudem 6 19S-non-ATPase-Untereinheiten (Rpn1, Rpn3, Rpn5, Rpn7, Rpn9, Rpn11) detektiert. Diese konnten bei den Rauchern in allen Proben sicher nachgewiesen werden. Rpn1 und Rpn3 konnten bei 3 von 20 und Rpn9 und Rpn11 bei 2 von 20 Nichtrauchern nicht sicher detektiert werden. Die nachgewiesenen 19S-non-ATPase-Untereinheiten zeigten allesamt eine signifikante Abundanz-erhöhung bei den Rauchern verglichen mit den Nichtrauchern (Abbildung 7C). Die übrigen 19S-non-ATPase-Untereinheiten konnten nicht sicher nachgewiesen werden.

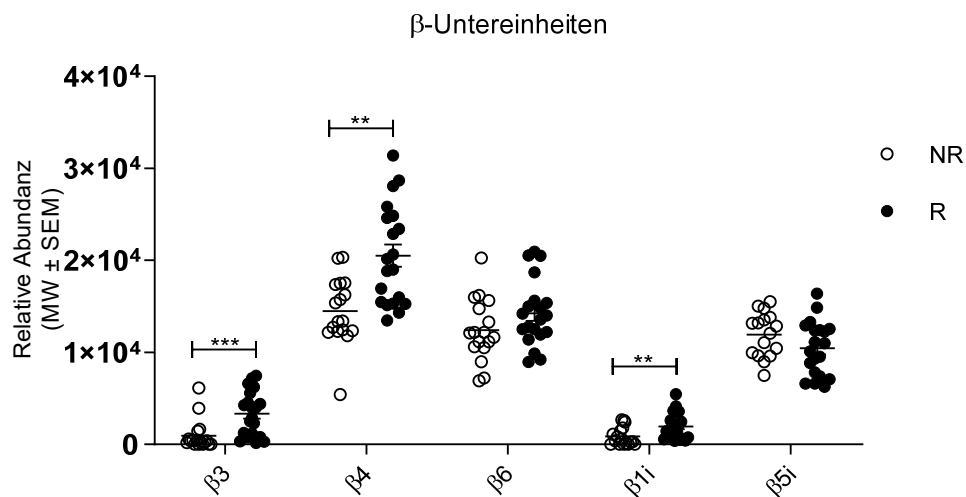
Mit Rpt2 und Rpt5 konnten 2 19S-ATPase-Untereinheiten detektiert werden. Diese waren in allen Proben zuverlässig nachweisbar. Ein signifikanter Abundanz-Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern wurde jedoch nur bei Rpt5 deutlich (Abbildung 7D). Die übrigen 19S-ATPase-Untereinheiten (Rpt1, Rpt3, Rpt4, Rpt6) waren nicht nachweisbar.

Von den regulatorischen Untereinheiten konnten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  nachgewiesen werden, PA28 $\gamma$  war nicht detektierbar. Die Abundanz unterschied sich bei Rauchern und Nichtrauchern bei beiden Untereinheiten nicht signifikant (Abbildung 7E).

**A**

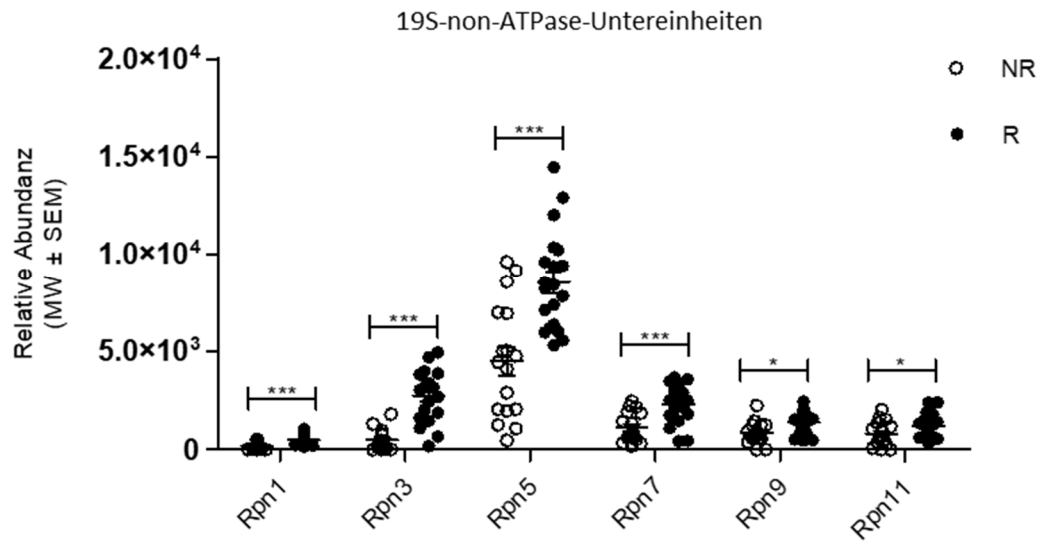


**B**

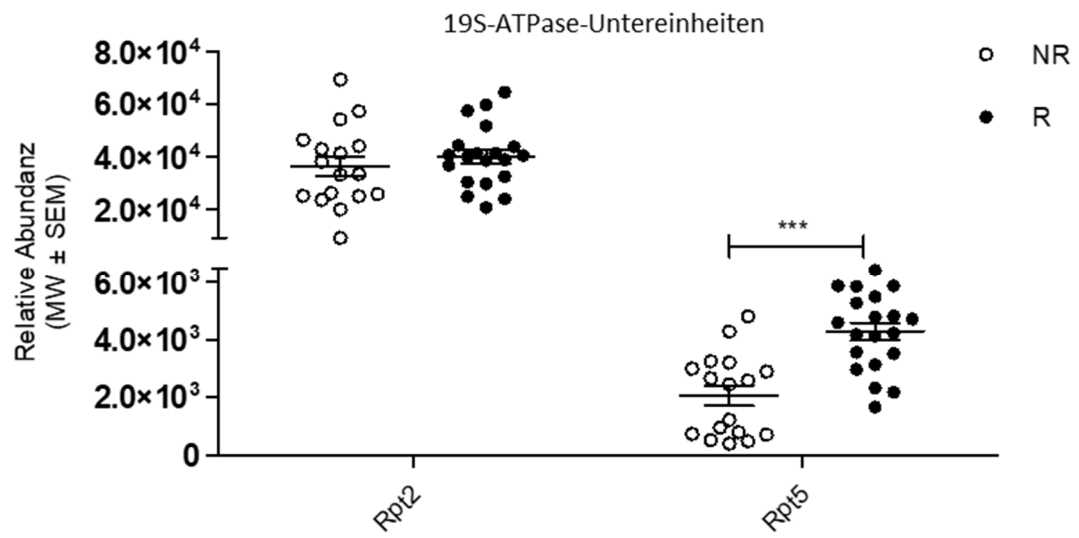


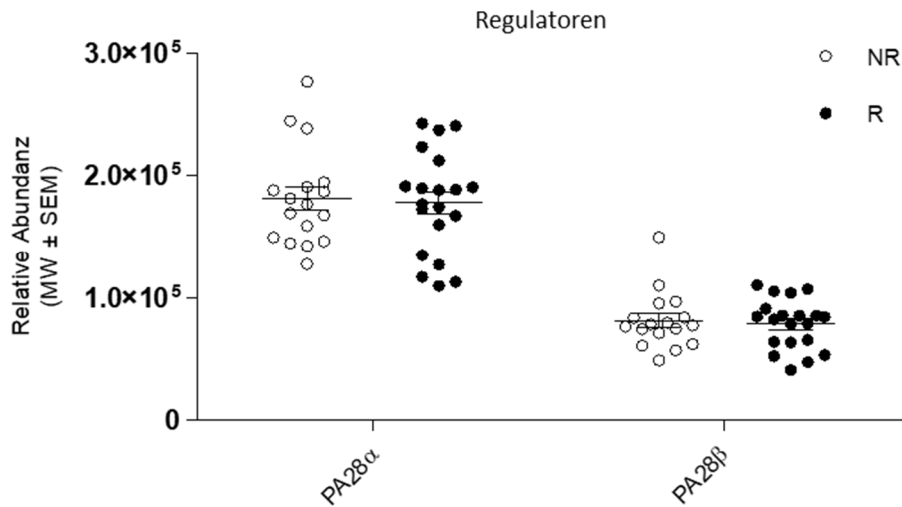


C



D



**E**

**Abbildung 7: HPLC-Massenspektrometrisch ermittelte Abundanzen proteasomaler Untereinheiten:** Nach FASP-Verdau der aus den PBMCs gewonnenen Proteinlysate wurden massenspektrometrisch die relativen Abundanzen der detektierbaren Proteine ermittelt. Es wurde zwischen **(A)**  $\alpha$ -Untereinheiten, **(B)**  $\beta$ -Untereinheiten **(C)** 19S-non-ATPase-Untereinheiten, **(D)** 19S-ATPase-Untereinheiten und **(E)** Regulatoren unterschieden. MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 4.5 Aktivitätsanalysen

### 4.5.1 Aktivität der katalytischen Untereinheiten

Um die Aktivität der katalytischen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  sowie  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  beurteilen zu können, wurde die Methode des Activity-based protein profiling genutzt. Dazu wurde das aus den PBMCs gewonnene Proteinlysate mit sogenannten activity-based probes (Abbildung 3), einer Art markierter Proteasominhibitoren, die spezifisch und kovalent an aktive Proteasomuntereinheiten binden, inkubiert. Nach der Gelelektrophorese kann die Aktivität der verschiedenen konstitutiven sowie Immuno-Untereinheiten per Fluoreszenzscanner ermittelt werden.

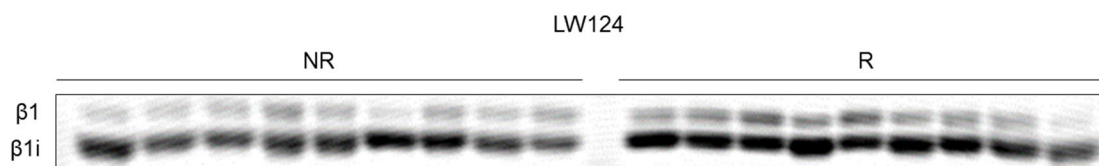
Durch die activity-based probe LW124 wurde die Aktivität der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 1i$  quantifiziert (Abbildung 8A). Sowohl bei der konstitutiven als auch bei der Immuno-Untereinheit zeigte sich kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Auffällig ist jedoch die Homogenität des Ranges, in dem sich die Werte bei der Immuno-Untereinheit  $\beta 1i$  bewegen, wohingegen vor allem bei den Rauchern bei der konstitutiven Untereinheit  $\beta 1$  eine breitere Streuung sichtbar ist (Abbildung 8B).

Ein ähnliches Bild bietet sich bei den durch die Probe MV151 detektierten Aktivitäten der Untereinheiten  $\beta 2$  und  $\beta 2i$  (Abbildung 8C). Auch hier unterscheidet sich die Aktivität der Untereinheiten zwischen Rauchern und Nichtrauchern kaum, die Homogenität der Aktivitäten der Immuno-Untereinheit fällt jedoch auch hier ins Auge (Abbildung 8D).

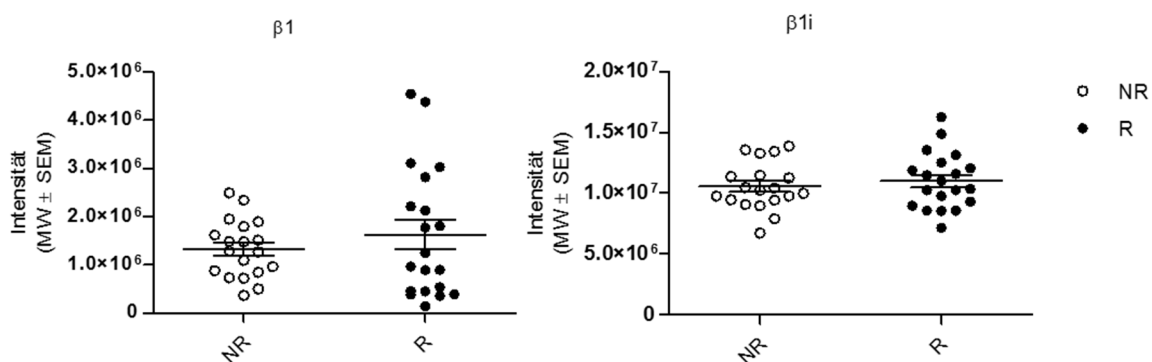
Durch die dritte activity-based probe wurden die Aktivitäten der Untereinheiten  $\beta 5$  und  $\beta 5i$  ermittelt (Abbildung 8E). Hier zeigte sich die Aktivität von  $\beta 5$  bei den Nichtrauchern im Vergleich zu den Rauchern gering erhöht, bei  $\beta 5i$  war kein Unterschied festzustellen. Wie schon bei  $\beta 1i$  und  $\beta 2i$  ist auch bei  $\beta 5i$  die geringe Streuung der Aktivitätswerte auffällig.

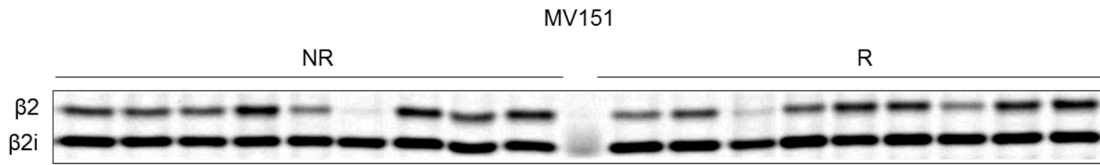
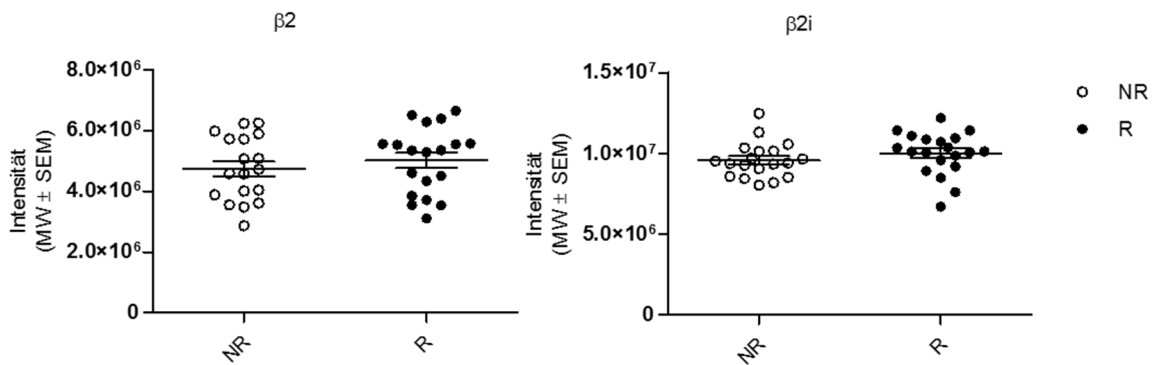
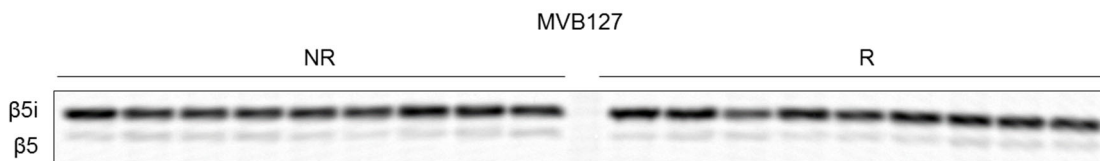
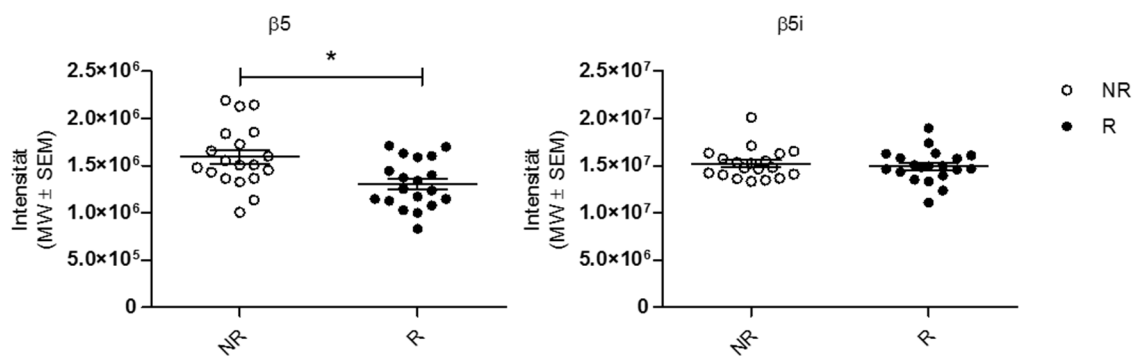
Bei allen ermittelten Pärchen aus konstitutiver und Immuno-Untereinheit war außerdem jeweils die Aktivität der Immuno-Untereinheit größer als die der zugehörigen konstitutiven Untereinheit (Abbildung 8B, D und F).

**A**



**B**



**C****D****E****F**

**Abbildung 8: Aktivität der katalytischen Untereinheiten, ermittelt mittels activity-based probe profiling:** Nach Inkubation der aus den PBMCs gewonnenen Proteinlysaten mit verschiedenen activity-based probes wurden per Fluoreszenzscanner die Aktivitäten der konstitutiven und der Immuno-Untereinheiten sichtbar gemacht. **(A)** LW124 ermöglicht eine Unterscheidung zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 1i$ , **(C)** MV151 zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 2i$  und **(E)** MVB127 zwischen  $\beta 5$  und  $\beta 5i$ . Dargestellt ist jeweils exemplarisch ein Ausschnitt aus dem großen Gel mit 9 Nichtraucher- und 9 Nichtraucherproben. Es zeigten sich weder bei **(B)**  $\beta 1$  und  $\beta 1i$ , noch bei **(D)**  $\beta 2$  und  $\beta 2i$

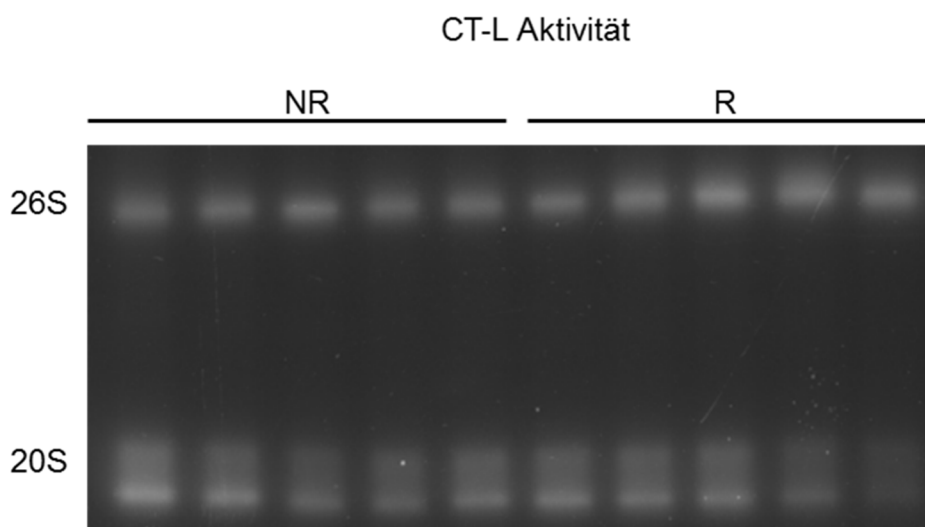
signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Die Aktivität von  $\beta 5$  war bei den Nichtrauchern signifikant erhöht, wohingegen  $\beta 5i$  keine Unterschiede zeigte (F). MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

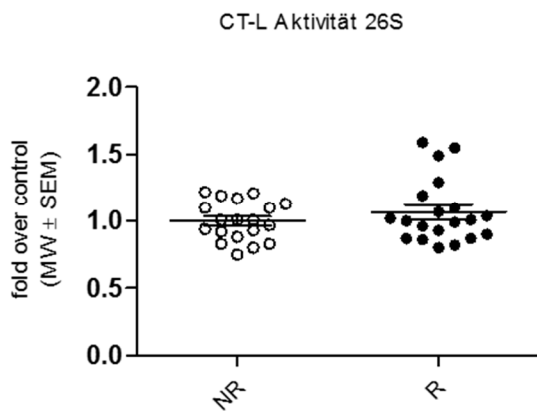
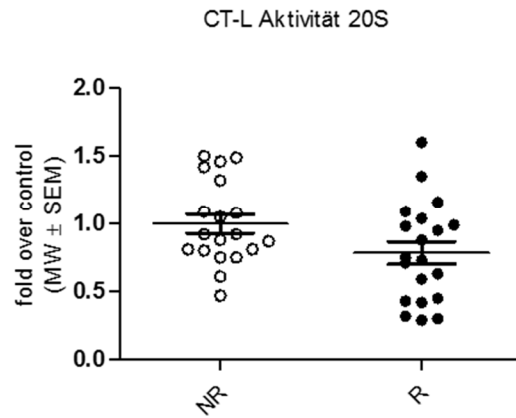
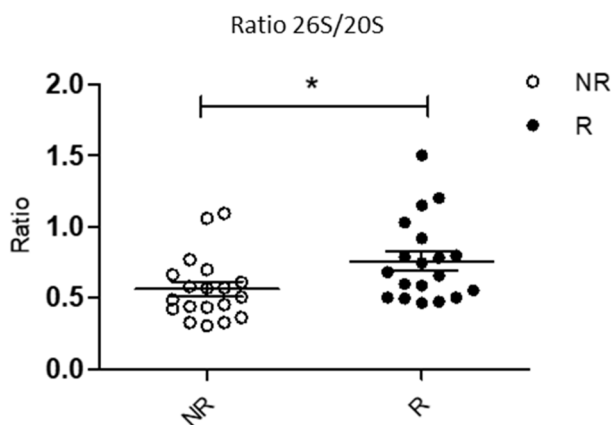
## 4.5.2 Aktivitätsanalysen im Nativgel

### 4.5.2.1 Aktivitätsanalyse der CT-L Aktivität innerhalb der 26S- und 20S-Komplexe

Nach nativer Zellyse und Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden und nativen Bedingungen liegen die 26S- und 20S-Komplexe weiter als aktive Komplexe vor. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, die Menge dieser aktiven Komplexe zu bestimmen. Zur Analyse wurde das aus den PBMCs gewonnene native Proteinlysate verwendet. Mit dem fluorogenen Substrat Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (SLLVY) kann nach Nativgelelektrophorese die Chymotrypsin-like Aktivität der in 26S- und 20S-Komplexe eingebauten proteasomalen Untereinheiten mittels Fluoreszenz-Assay sichtbar gemacht werden (Abbildung 9A). Die in der 26S-Untereinheit nachgewiesene CT-L Aktivität zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Abbildung 9B). Die Aktivität der 20S-Komplexe war bei Rauchern leicht, jedoch nicht signifikant, vermindert (Abbildung 9C). Die ermittelte 26S/20S-Ratio zeigte sich zu Gunsten der Raucher leicht erhöht (Abbildung 9D).

**A**



**B****C****D**

**Abbildung 9: Ermittlung der CT-L Aktivität im Nativgel mittels Fluoreszenzassay: (A)** Mittels fluorogenem Substrat wurde nach der Nativgelelektrophorese die CT-L Aktivität der aktiven Proteasomenkomplexe sichtbar gemacht. Dargestellt ist exemplarisch eines von 4 Gelen. Die CT-L Aktivität zeigte weder in den 26S-Komplexen **(B)** noch in den 20S-Komplexen **(C)** signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Jedoch zeigte sich eine bei den Rauchern signifikant erhöhte 26S/20S-Ratio **(D)**. MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.5.2.2 Nativgel-Westernblot-Analyse

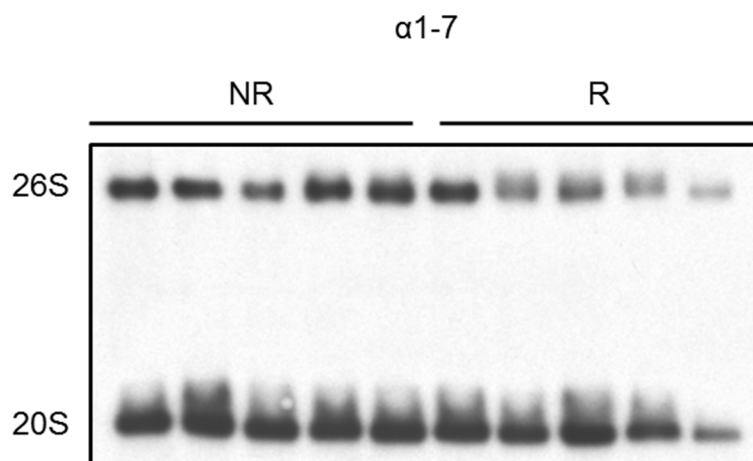
Beim Nativgel-Westernblot lässt sich nicht nur die proteasomale Aktivität der 20S- und 26S-Proteasomkomplexe detektieren, sondern auch durch anschließendes Blotting und Proteindetektion die Menge der Komplexe bestimmen. Im Unterschied zum proteomischen Ansatz der massenspektrometrischen Detektion proteasomaler Untereinheiten im Gesamtzellextrakt werden hier die zusammengebauten und aktiven Komplexe

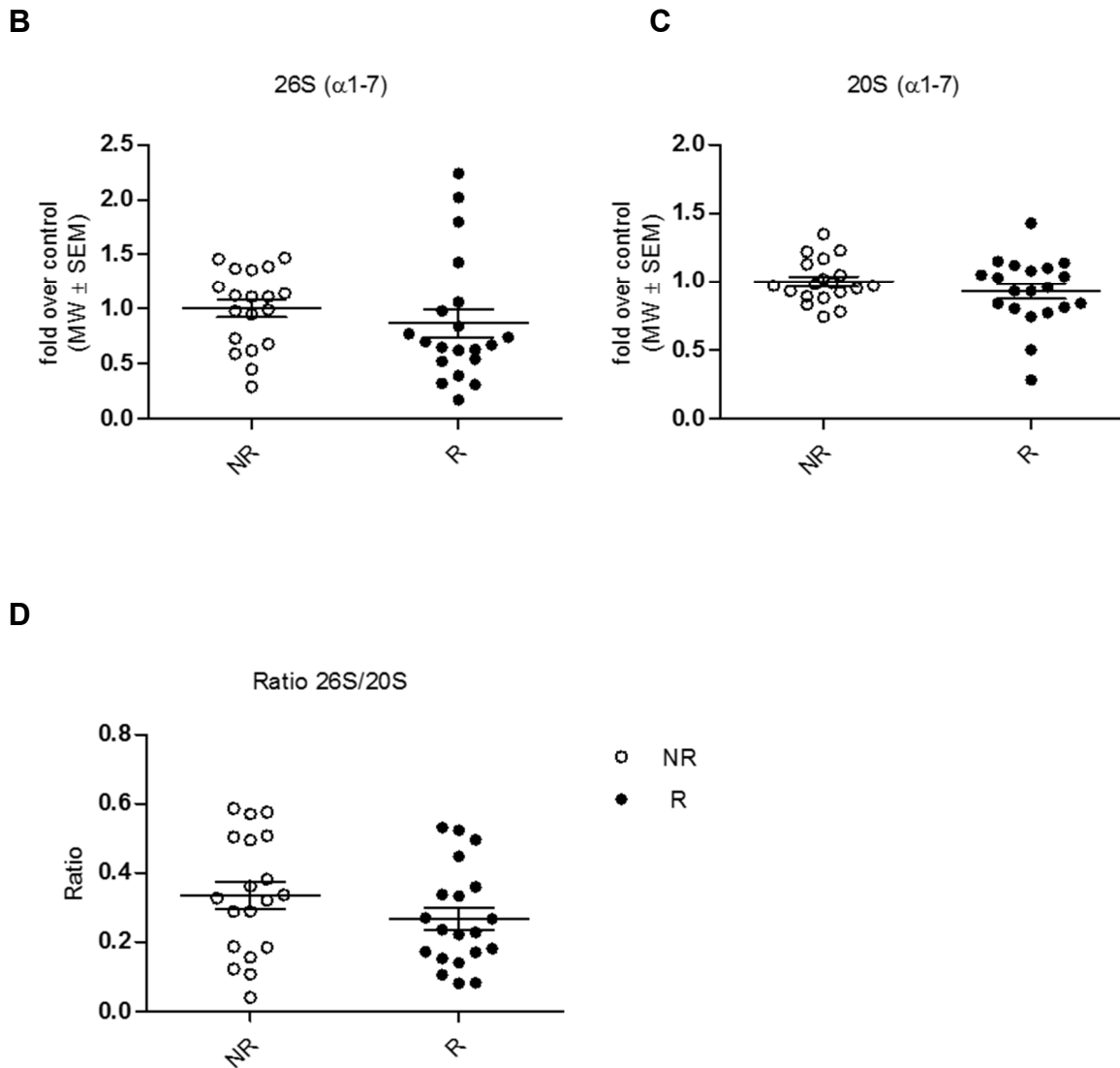
erst mittels Aktivitätsassays und dann deren relative Menge mittels Immunoblotten der Nativgele detektiert. So lassen sich Aktivität und Menge aktiver Komplexe in ein direktes Verhältnis setzen und die Aktivität pro Proteasom bestimmen. Freie Untereinheiten, die nicht in das Proteasom inkorporiert sind, werden hier nicht berücksichtigt.

#### **4.5.2.2.1 Detektion von $\alpha$ 1-7**

Durch einen Antikörper, der spezifisch an die  $\alpha$ -Untereinheiten 1-7 bindet, wurden die 20S  $\alpha$ -Untereinheiten in den 20S- und 26S-Komplexen der Raucher und Nichtraucher ermittelt (Abbildung 10A). Dabei konnte weder bei den 26S-Komplexen (Abbildung 10B) noch bei den 20S-Komplexen (Abbildung 10C) ein quantitativ signifikanter Unterschied an eingebauten  $\alpha$ -Untereinheiten festgestellt werden. Auch die 26S/20S-Ratio unterschied sich bei Rauchern und Nichtrauchern nur geringfügig (Abbildung 10D). Somit lässt sich sagen, dass sich die Menge der in aktive 20S- und 26S-Komplexe eingebauten  $\alpha$ -Untereinheiten bei Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant unterscheidet.

**A**





**Abbildung 10: Expression von  $\alpha$ 1-7 in den 20S- und 26S Komplexen:** (A) Nach der nativen Gelelektrophorese wurde ein Westernblot mit einem für die  $\alpha$ -Untereinheiten spezifischen Antikörper durchgeführt. Dargestellt ist exemplarisch einer von vier Blots. So wurden die  $\alpha$ -Untereinheiten in den 26S-Komplexen (B) und den 20S-Komplexen (C) gesondert detektiert. (D) zeigt die 26S/20S-Ratio. MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

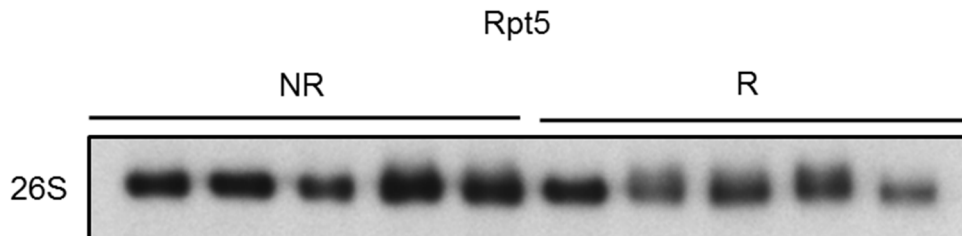
#### 4.5.2.2.2 Detektion von Rpt5

Um die in aktive 26S-Komplexe verbaute 19S-ATPase-Untereinheit Rpt5 zu detektieren, wurde ein weiterer Antikörper verwendet, der spezifisch an Rpt5 bindet. So konnte dieses nach Nativgelelektrophorese, Westernblot und Proteindetektion ermittelt werden (Abbildung 11A). In freien 19S-Komplexen vorliegendes Rpt5 wird dabei nicht berücksichtigt, weil durch die Nativgelelektrophorese nur zusammengebaute und aktive Komplexe aufgetrennt werden. Es zeigten sich in der Menge des eingebauten Rpt5 deutliche

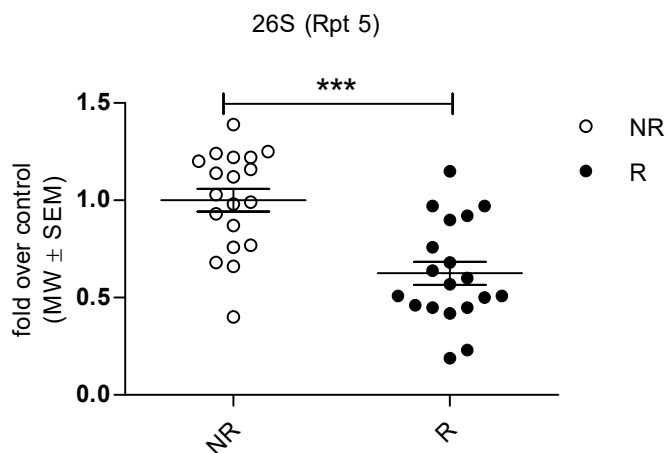


Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Das in aktive 26S-Komplexe eingebaute Rpt5 war bei Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern signifikant erniedrigt (Abbildung 11B).

**A**



**B**



**Abbildung 11: Relative Menge Rpt5 in aktiven 26S-Komplexen:** (A) Nach der nativen Gelelektrophorese wurde ein Westernblot mit einem für die 19S-ATPase-Untereinheit Rpt5 spezifischen Antikörper durchgeführt. Dargestellt ist exemplarisch einer von vier Blots. Es wurde das in 26S-Komplexe eingebaute Rpt5 detektiert (B). MW ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

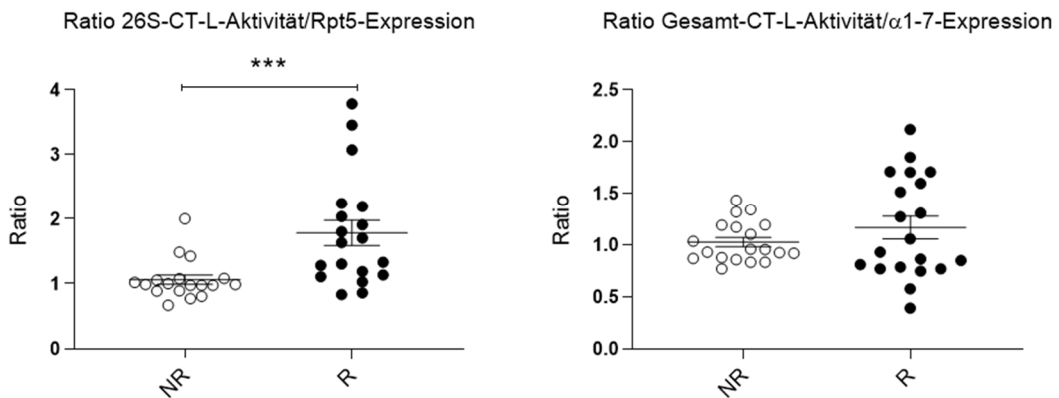
#### 4.5.3 Relative Proteasomaktivität

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der im 26S-Komplex verbauten Rpt5-Untereinheiten zur Komplexaktivität kann die relative Aktivität der einzelnen 26S-Komplexe ermittelt werden. Analog hierzu ist das Verhältnis der Gesamt-CT-L Aktivität in 20S- und 26S-Komplexen zu den ermittelten  $\alpha$ 1-7 Untereinheiten ein Marker für die relative Proteasomenaktivität der Gesamtkomplexe. Wir fanden hier eine signifikant erhöhte Ratio der 26S-Aktivität zur Rpt5-Expression bei Rauchern, bei Nichtrauchern zeigten sich keine Unterschiede (Abbildung 12A).

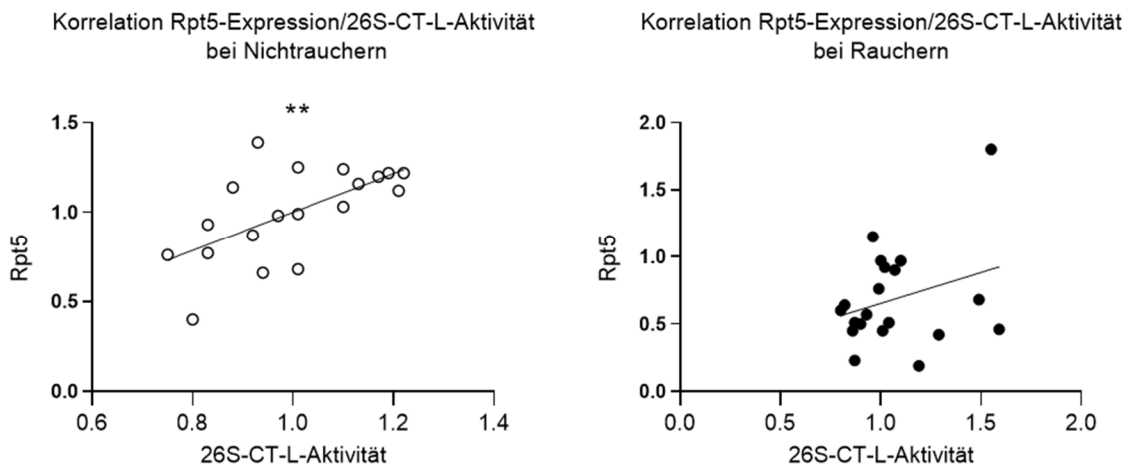
Dies deutet auf eine deutlich höhere relative 26S-Aktivität bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern hin. Die Ratio der Gesamt-CT-L Aktivität zur Expression der  $\alpha$ 1-7-Untereinheiten war bei Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant verändert (Abbildung 12A).

Außerdem korrelierten wir die Rpt5-Expression mit der 26S-CT-L Aktivität und die  $\alpha$ 1-7-Expression mit der CT-L Gesamtaktivität bei Rauchern und Nichtrauchern. In beiden Fällen konnte bei den Nichtrauchern eine signifikante Korrelation gesehen werden, bei den Rauchern jedoch korrelierten Aktivität und Menge der Komplexe nicht (Abbildung 12B und C). Diese Daten deuten darauf hin, dass die bei Nichtrauchern vorliegende direkte Regulation der Proteasomenaktivität durch Zusammenbau aktiver Komplexe verloren gegangen ist.

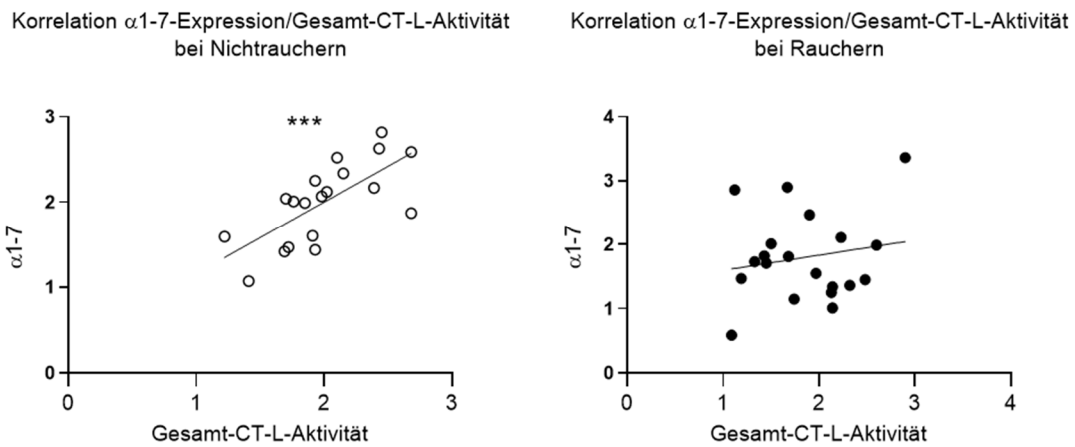
**A**



**B**



C



**Abbildung 12: Relative Proteasomenaktivität und Aktivitäts-Expressions-Korrelationen bei Rauchern und Nichtrauchern:** Es zeigte sich eine signifikant erhöhte relative Proteasomenaktivität bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern in 26S-Komplexen, bei Gesamtaktivität (26S und 20S) wurden keine Unterschiede gesehen (A). Die Rpt5-Expression und die CTL-Aktivität der 26S-Komplexe korrelierten signifikant bei Nichtrauchern, nicht jedoch bei Rauchern (B). Ebenso korrelierte die  $\alpha$ 1-7-Expression nur bei den Nichtrauchern signifikant mit der Gesamt-CTL Aktivität (C). MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, Korrelationen mittels linear regression, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## **5 Diskussion**

### **5.1 Bestätigung der Raucher als solche mittels Cotinin-Elisa**

Per Cotinin-Elisa wurde im Plasma von Rauchern Cotinin als Abbauprodukt von Nikotin ermittelt. Alle Raucher konnten als solche bestätigt werden. Da die Halbwertszeit von Nikotin deutlich niedriger (ca. 2-3 Stunden) als die Halbwertszeit von Cotinin (ca. 17 Stunden) liegt, bleiben Cotinin-Level bei Rauchern, die mehrmals täglich Zigaretten konsumieren, über den Tag hinweg relativ konstant. Somit eignet sich Cotinin deutlich besser als Biomarker für regelmäßigen Zigarettenkonsum als Nikotin (Benowitz, 1996). Cotininlevel im Plasma variieren je nach Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten und liegen bei Rauchern ca. zwischen 100 und 600 ng/ml (Zuo et al., 2018). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, bei denen alle Raucher ein Cotininlevel > 200 ng/ml aufwiesen. Bei einigen rauchenden Probanden lagen die Level jedoch noch deutlich höher, was auf einen nur kurz zurückliegenden Zigarettenkonsum hinweisen kann. Die Plasma-Cotininlevel bei Nichtrauchern rangieren je nach Passivrauchbelastung zwischen 0 und 14 ng/ml (Whincup et al., 2004). Bei der hier vorliegenden Studie fanden sich bei Nichtrauchern Werte zwischen 0,5 und 1,5 ng/ml. Dies deckt sich mit den bekannten Zahlen, da Personen, die angaben, regelmäßig mit Passivrauch belastet zu sein, nicht in die Studie eingeschlossen wurden.

### **5.2 Durchflusszytometrisch erhöhte absolute Zellzahlen bei Rauchern**

Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde das Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich seiner Zusammensetzung verglichen. In der relativen Zellzusammensetzung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, absolut waren jedoch alle ermittelten Zellgruppen außer den CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>-Monozyten und den B-Zellen bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern signifikant erhöht. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen zahlreicher vorausgegangener Studien, in denen bereits eine signifikant erhöhte Zellzahl der gesamten weißen Blutkörperchen, der Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden wurde (Freedman et al., 1996; Mansoor et al., 2013; Petitti and Kipp, 1986; Smith et al.,

2003). Freedman et al. beschrieben die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten sowie die neutrophilen Granulozyten als die durch Zigarettenrauch am meisten erhöhten Untergruppen. Die Neutrophilen waren hier ebenso die am deutlichsten erhöhte Subpopulation, jedoch waren in dieser Studie Monozyten und Eosinophile im Verhältnis stärker erhöht als die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten. Die Unterschiede können durch die Methode der Durchflusszytometrie erklärt werden. Da die Gating-Strategie händisch umgesetzt wurde, ist die Möglichkeit kleinerer Ungenauigkeiten gegeben. Darüber hinaus können sich Unterschiede ergeben, da es sich bei den in dieser Studie untersuchten Probanden um junge, gesunde Raucher mit relativ geringer Rauch-Gesamtexposition handelt. Im Gegensatz dazu waren die in anderen Studien analysierten Probandenkollektive deutlich älter und wiesen mehr pack-years auf (Freedman et al., 1996; Mansoor et al., 2013; Petitti and Kipp, 1986; Smith et al., 2003).

Die erhöhte Leukozytenzahl bei Rauchern ist wahrscheinlich als Korrelat der ständigen chronischen Entzündungsreaktion durch Zigarettenrauch zu werten (Yanbaeva et al., 2007). Zahlreiche vorhergehende Studien haben bereits berichtet, dass ein erhöhtes Level an Leukozyten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (Madjid and Fatemi, 2013) und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität einhergeht (Pearson et al., 2003; Ruggiero et al., 2007; Tamakoshi et al., 2007). Somit wird hier deutlich, dass bereits bei jungen Rauchern ohne subjektive Krankheitszeichen Blutbildveränderungen nachzuweisen sind, die auf eine chronische Entzündungsreaktion schließen lassen, durch welche das Risiko für Folgeerkrankungen erhöht und die Morbidität potenziell gesteigert wird.

Die relative Zellzusammensetzung des Blutes war zwischen Rauchern und Nichtrauchern ähnlich, sodass davon auszugehen ist, dass die erhobenen Daten zur Proteasomenexpression und -aktivität nicht durch eine Verschiebung der zellulären Komponenten erklärt werden können.

### **5.3 Änderungen in Expression und Abundanz der proteasomalen Untereinheiten**

Die mittels RT-qPCR ermittelte Expression verschiedener proteasomaler Gene in PMBCs zeigten weder bei den getesteten konstitutiven Untereinheiten noch bei den Immuno-Untereinheiten signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Konträr hierzu wiesen bereits mehrere Studien Veränderungen in der Genexpression proteasomaler Untereinheiten als Reaktion auf verschiedene Arten von oxidativem Stress nach. Rangasamy et al. wiesen 2009 eine verminderte Genexpression verschiedener proteasomaler Untereinheiten im Lungengewebe von berauchten Mäusen nach (Rangasamy et al., 2009). Kammerl et al. fanden in BAL-Zellen von COPD-Patienten eine reduzierte Expression der Immuno-Untereinheiten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Kammerl et al., 2016). Diese Diskrepanz zu den hier ermittelten Daten legt die Annahme nahe, dass die Expression proteasomaler Gene als Reaktion auf Zigarettenrauch möglicherweise eher in Gewebsarten wie Lungengewebe, welche direkt der Rauchexposition ausgesetzt sind, verändert ist. Außerdem kann gemutmaßt werden, dass beim gesunden, rauchenden Probanden noch keine Veränderungen nachweisbar sind, sondern diese erst bei manifester COPD auftreten. Änderungen in der Expression proteasomaler Gene in humanen PMBCs als Reaktion auf Zigarettenrauch wurden hier erstmals untersucht. Pettit et al. beschäftigten sich jedoch mit proteasomalen Veränderungen in PMBCs nach Diesel-Inhalation und wiesen eine Hochregulation verschiedener proteasomaler Gene nach (Pettit et al., 2012). Dies stützt die Vermutung, dass oxidativer Stress grundsätzlich Veränderungen der Genexpression von Proteinen des UPS im peripheren Blut nach sich ziehen kann, diese jedoch abhängig von der Art des Stressors und der Expositionsdauer sind. Zudem wurden bei Pettit nicht wie hier proteasomale Untereinheiten, sondern weitere Proteine, die im UPS eine Rolle spielen, detektiert. Somit ist eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben.

Die massenspektrometrisch ermittelte Abundanz der konstitutiven proteasomalen Untereinheiten ergab bei mehreren der detektierten Untereinheiten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Einige

Untereinheiten waren in der Gruppe der Raucher signifikant erhöht ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ). Keine der gefundenen Untereinheiten war jedoch bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern erniedrigt, was die Vermutung nahelegt, dass es bei Rauchern eher eine Tendenz zur erhöhten Expression konstitutiver proteasomaler Untereinheiten in PBMCs gibt. Leider konnten mehrere Untereinheiten, darunter auch die katalytischen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ , massenspektrometrisch sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern nicht nachgewiesen werden, wohingegen zwei der drei Immuno-Untereinheiten ( $\beta 1i$  und  $\beta 5i$ ) sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern detektiert werden konnten. Dies lässt auf den ersten Blick vermuten, dass – die katalytischen Untereinheiten betreffend – in PBMCs sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern weniger konstitutive Untereinheiten als Immununtereinheiten vorhanden sind. Dies erscheint nachvollziehbar, wenn man beachtet, dass PBMCs viele Immunzellen wie Lymphozyten oder Monozyten enthalten. Natürlich müssen jedoch auch nachweistechische Probleme in Betracht gezogen werden, welche für einen Detektionsunterschied in Frage kommen könnten. So können beispielsweise Unterschiede beim Proteinverdau Oberflächenreaktionen hervorrufen, die die massenspektrometrische Detektion einzelner Proteine beeinflussen (Heijs et al., 2015). Auch können Unterschiede in der Molekülzusammensetzung die Ionisation beeinflussen, was den Nachweis von Proteinen verschlechtern kann (Lanekoff et al., 2014; Vaysse et al., 2017).

Die Abundanz der Immuno-Untereinheit  $\beta 1i$  war als einzige der detektierten katalytischen Untereinheiten bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant erhöht. Van Rijt et al. fanden in Lungenzellen geraucher Mäuse konträr hierzu keine erhöhte Expression proteasomaler Untereinheiten (van Rijt et al., 2012). Kammerl et al. sowie Baker et al. untersuchten außerdem das Lungengewebe von COPD-Patienten und fanden keine veränderte Expression der Immuno-Untereinheiten (Baker et al., 2014; Kammerl et al., 2016). Diese Diskrepanzen weisen möglicherweise darauf hin, dass Patienten mit manifester COPD im Endstadium im Vergleich zu gesunden Rauchern nicht mehr zu einer kompensatorischen Induktion proteasomaler Untereinheiten in der Lage sind. Es muss jedoch im Hinterkopf behalten werden, dass in den vorhergehenden

Studien andere Zellarten analysiert wurden als PMBCs, sodass eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben ist.

Die ermittelten RNA- und Proteinlevel korrelierten weder bei Rauchern noch bei Nichtrauchern. Dies ist dadurch erklärbar, dass es von der RNA bis hin zur Proteinexpression viele Regulationsmechanismen gibt, die letztlich das Proteinlevel mit beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise die mRNA-Stabilität, regulatorische Proteine, die als Translationsmodulatoren wirken, oder die Ribosomendichte (Maier et al., 2009).

#### **5.4 Aktivitätsänderungen der proteasomalen Untereinheiten und Komplexe**

Mittels ABPs wurde die katalytische Aktivität der konstitutiven und Immuno-Untereinheiten untersucht. Es ließen sich bis auf eine leicht erhöhte  $\beta 5$ -Aktivität bei Nichtrauchern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Die Aktivitätsanalyse im Nativgel, durch welche exemplarisch die CT-L Aktivität in 20S- und 26S-Komplexen detektiert wurde, ergab ebenfalls keine Aktivitätsunterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Jedoch zeigte sich eine erhöhte 26S/20S-Ratio bei Rauchern, was für eine Aktivitätsverschiebung bei Rauchern in Richtung 26S-Proteasom spricht. Zudem wurde, stellvertretend für die 19S-ATPase Untereinheiten, im Westernblot des Nativgels Rpt5 detektiert. Die Detektionslevel waren bei Rauchern signifikant reduziert, was auf eine verminderte Assemblierung von 26S-Proteasomen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern hindeutet. Die relative Proteasomenaktivität, welche die Aktivität der Proteasomkomplexe ins Verhältnis zu ihrer Menge setzt, zeigte sich bei Rauchern bei den 26S-Komplexen deutlich erhöht. Die relative 20S-Aktivität unterschied sich nicht.

Obwohl sich die Aktivitäten der konstitutiven und Immuno-Untereinheiten zwischen Rauchern und Nichtrauchern kaum unterschieden, fiel jedoch sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern eine insgesamt höhere Aktivität der Immuno-Untereinheiten im Vergleich zu den konstitutiven Untereinheiten auf, was kongruent zu den massenspektrometrisch ermittelten Abundanzen ist. Dies könnte an der betrachteten Zellpopulation liegen. PBMCs bestehen größtenteils aus



Immunzellen und weisen deswegen sowohl bei rauchenden als auch bei nicht rauchenden Probanden mehr Immuno-Untereinheiten als konstitutive Untereinheiten auf (Dahlmann, 2016). Für  $\beta 1i$ , welches massenspektrometrisch als einzige detektierte katalytische Untereinheit bei den Rauchern eine erhöhte Abundanz, jedoch kein verändertes Aktivitätslevel aufwies, ist außerdem anzunehmen, dass bei Rauchern eine größere Menge an Untereinheiten nötig ist, um auf das gleiche Aktivitätsniveau wie Nichtraucher zu kommen. Leider ist, die anderen katalytischen Untereinheiten betreffend, eine derartige Schlussfolgerung nicht möglich, da diese aufgrund ihrer geringen Abundanz massenspektrometrisch nicht detektiert wurden. Bedacht werden muss jedoch auch, dass bei der Massenspektrometrie im Gegensatz zur Aktivitätsermittlung mittels ABPs alle in der Zelle vorhandenen Untereinheiten detektiert werden, auch diejenigen, die nicht in proteasomale Komplexe verbaut sind. Somit ist nicht mit letzter Sicherheit zu sagen, ob die massenspektrometrisch erhöhte  $\beta 1i$ -Abundanz bei Rauchern letztlich überhaupt zum Erreichen eines gleichen Aktivitätsniveaus nötig ist. Kammerl et al. untersuchten bereits in unterschiedlichen Zelltypen die Aktivität des Immunoproteasoms als Reaktion auf Zigarettenrauch und fanden in humanen Makrophagen eine isolierte Aktivitätsreduktion von  $\beta 5i$ . Außerdem wurde *in vivo* in Alveolarmakrophagen geraucher Mäuse nach vorübergehender Hochregulation von Standard- und Immunoproteasom nach zehn Tagen eine Verminderung der Immuno-Aktivität beobachtet (Kammerl et al., 2016). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen in der Aktivität der katalytischen proteasomalen Untereinheiten dynamische Prozesse sind, die möglicherweise bei gesunden Rauchern noch nicht nachzuweisen sind, sondern erst bei Patienten mit manifester COPD auftreten. Außerdem muss auch hier wieder bedacht werden, dass nicht – wie in dieser Studie – PMBCs untersucht wurden.

Die CT-L Aktivität, welche im Nativgel detektiert wurde, zeigte keine Aktivitätsunterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Ebenso wurde trotz massenspektrometrisch nachgewiesener erhöhter Abundanz mehrerer konstitutiver Untereinheiten auch kein Aktivitätsunterschied auf Basis des Einbaus von  $\alpha 1-7$  in 20S oder 26S-Komplexe festgestellt. Mehrere Studien

fanden konträr hierzu bereits eine Abnahme der 3 proteasomalen Aktivitäten (Caspase-like, Trypsin-like und Chymotrypsin-like) in Alveolarepithelzellen nach CSE-Exposition *in vitro* (van Rijt et al., 2012; Somborac-Bacura et al., 2013). In beiden Studien wurden jedoch Lungenzellen verwendet, die akut mit Zigarettenrauch-Extrakt bzw. Zigarettenrauch behandelt worden waren und nicht wie hier PBMCs. *In vivo* war in den Lungenzellen geraucher Mäuse nur die Trypsin-like-Aktivität vermindert (van Rijt et al., 2012). Konträr hierzu fanden Pickering et al. in embryonalen Fibroblasten von Mäusen als Reaktion auf durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachten oxidativen Stress eine Zunahme der drei proteasomalen Aktivitäten (Pickering et al., 2010). Der Einfluss von Zigarettenrauch auf die proteasomale Aktivität in PBMCs wurde bisher nicht untersucht, jedoch untersuchten Kipen et al. die Aktivität in Proteasomen von roten und weißen Blutzellen nach Exposition mit Diesel-Abgasen und stellten in den weißen Blutzellen eine Abnahme aller drei proteasomalen Aktivitäten fest (Kipen et al., 2010).

Zwar konnte kein signifikanter Unterschied der CT-L Aktivität der 20S- und 26S-Komplexe nachgewiesen werden, jedoch war die 26S/20S-Ratio bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern erhöht. Dies lässt den Schluss zu, dass bei Rauchern nicht nur mehr 19S-Untereinheiten vorliegen, sondern sich – zumindest, was die CT-L Aktivität angeht – eine proteasomale Aktivitätsverschiebung von den 20S-Proteasomen hin zu den 26S-Proteasomen vollzieht. Diese Vermutung deckt sich mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie, da massenspektrometrisch nahezu alle detektierten 19S-Untereinheiten bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern erhöht waren. Betrachtet man hingegen die RNA-Expression, die exemplarisch für die 19S-Untereinheiten Rpt5 und Rpn6 detektiert wurde, kam kein signifikanter Unterschied zur Darstellung. Dies lässt eine posttranskriptionelle Hochregulation der 19S-Untereinheiten bei den Rauchern vermuten und stützt die Theorie der Aktivitätsverschiebung hin zum 26S-Proteasom bei Rauchern.

Zudem wurde, stellvertretend für die 19S ATPase Untereinheiten, im Westernblot des Nativgels Rpt5 detektiert. Hierbei wird nur das in aktiven 26S-Komplexen verbaute Rpt5, nicht jedoch das in ungebundenen 19S-Untereinheiten

vorliegende detektiert. Da die Untereinheit Rpt5 streng stöchiometrisch in das 26S-Proteasom eingebaut wird, kann die Menge Rpt5 als Surrogat für die Menge des assemblierten 26S-Proteasoms angenommen werden. Die Detektionslevel von Rpt5 im Nativgel waren bei Rauchern signifikant reduziert, was auf eine verminderte Assemblierung von 26S-Proteasomen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern hindeutet. Diese Beobachtung deckt sich mit der Bestimmung der relativen Proteasomenaktivität, bei der die Aktivität der Proteasomkomplexe ins Verhältnis zu ihrer Menge gesetzt wird. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte relative Proteasomenaktivität der 26S-Komplexe bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern. Die relative 20S-Aktivität unterschied sich nicht. Diese Daten deuten darauf hin, dass weniger 26S-Proteasomen in Rauchern assemblieren, diese aber eine höhere relative Aktivität besitzen. Interessanterweise korrelierte bei Nichtrauchern die Menge der 26S-Proteasomkomplexe (bestimmt durch Rpt5 bzw.  $\alpha$ 1-7 Detektion) direkt mit der Aktivität dieser Komplexe. Bei den Rauchern war das nicht der Fall, was darauf hinweist, dass die verminderte Assemblierung der 26S-Proteasomkomplexe durch derzeit unbekannte Aktivierungsmechanismen kompensiert wird und Raucher damit relativ gesehen aktivere 26S-Proteasomenkomplexe im peripheren Blut besitzen.

Mehrere Studien, die an unterschiedlichen Zellgruppen durchgeführt wurden, kamen in der Vergangenheit zu dem Schluss, dass oxidativer Stress zur Dissoziation von 26S-Proteasomen in 20S-Proteasomen und 19S-Regulatoren führt und somit die Kapazität für den Abbau oxidativ veränderter Proteine gesteigert werden kann (Ben-Nissan and Sharon, 2014; Grune et al., 2011; Kammerl et al., 2019; Wang et al., 2017). Ebenso wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die beschriebene Dissoziation reversibel ist, was bedeutet, dass nach Wegfall des oxidativen Stressors eine Reassemblierung von 19S-Untereinheiten und 20S- zu 26S-Proteasomen möglich ist (Grune et al., 2011; Livnat-Levanon et al., 2014; Wang et al., 2017). Auch muss in Betracht gezogen werden, dass die verminderte Stabilität von 26S-Proteasomen bei Rauchern dem 20S-Proteasom die Möglichkeit bietet, sich mit anderen Regulatoren wie PA28 $\alpha/\beta$  zu assemblieren, um oxidativ modifizierte und fehlgefaltete Proteine abzubauen (Pickering et al., 2010). Die Diskrepanz zu den hier gefundenen

Ergebnissen lässt mehrere Mutmaßungen zu: Möglicherweise sind Langzeit-Raucher bereits durch andere Regulationsmechanismen so gut an den chronisch wiederkehrenden oxidativen Stress adaptiert, dass es zu keiner Dissoziation von 26S Proteasomen mehr kommt. Ein anderer Erklärungsversuch könnte sein, dass es bei den getesteten Probanden ebenfalls zur Dissoziation und Reassoziierung von 19S-Regulatoren und 20S-Proteasomen kommt, dies jedoch nach Beendigung des oxidativen Reizes so schnell vonstatten geht, dass derartige Vorgänge bei gesunden Probanden im peripheren Blut nicht mehr erfasst werden kann.

## **5.5 Potenzielle Folgen der veränderten proteasomalen Expression und Aktivität**

Nachdem nachgewiesen wurde, dass proteasomale Aktivität und Zusammensetzung als Reaktion auf Zigarettenrauch und andere oxidative Stressoren dynamische Prozesse sind, muss über die Folgen dieser Ergebnisse nachgedacht werden. Zigarettenrauch führt nachgewiesenermaßen zu einer beeinträchtigten proteasomalen Qualitätskontrolle und folglich zu einer veränderten Proteostase. So wiesen van Rijt et al. eine vermehrte Akkumulation polyubiquitinerter Proteine in humanen Alveolarepithelzellen nach Behandlung mit CSE nach, was auf eine Modulation des Abbaus ubiquitinerter Proteine in Zellen nach Zigarettenrauchexposition hindeutet (van Rijt et al., 2012). Auch wurden bereits *in vivo* in Lungen von COPD-Patienten erhöhte Mengen unlöslicher polyubiquitinerter Proteine nachgewiesen (Min et al., 2011). Derartige Effekte wurden bereits auch für Immunzellen nach Inhibition von Immuno-Untereinheiten beschrieben (Schmidt et al., 2018). Diese Daten weisen darauf hin, dass die durch das Proteasom stattfindende Proteinqualitätskontrolle als Reaktion auf Zigarettenrauch entweder durch veränderte proteasomale Aktivität oder die vermehrte Akkumulation degenerativ veränderter und polyubiquitinerter Proteine, die die proteasomale Abbaukapazität übersteigt, maßgeblich beeinflusst wird.

Mehrere Studien legen nahe, dass Veränderungen der proteasomalen Aktivität, insbesondere der Aktivität der Immunoproteasomen, Einfluss nehmen auf die adaptive Immunabwehr. Dies betrifft einerseits Signalkaskaden, die für die

Aktivierung von Immunzellen essentiell sind. Es werden beispielsweise Oberflächenmarker auf Zellen, die eine Rolle für die T-Zell-Aktivierung spielen, nach Hemmung immunoproteasomaler Untereinheiten geringer exprimiert. Auch intrazelluläre Signalkaskaden werden beeinträchtigt (Berges et al., 2008; Naujokat et al., 2007). Zudem wurde eine beeinträchtigte Funktion dendritischer Zellen beobachtet, was wiederum die Stimulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen einschränkt (Naujokat et al., 2007). Bereits aktivierte T-Zellen zeigten nach Hemmung proteasomaler Untereinheiten verminderte Abbaukapazitäten für Proteine sowie eine verstärkte Apoptoseneigung (Berges et al., 2008; Schmidt et al., 2018). Zudem nimmt eine veränderte proteasomale Aktivität Einfluss auf die Antigenpräsentation auf MHC I im Rahmen der Infektabwehr. Derartige Antigene werden vorwiegend von Immunoproteasomen produziert (Groettrup et al., 2010). Bereits mehrere Studien zeigten, dass eine Hemmung des Immunoproteasoms die MHC I Antigenpräsentationen auf der Zelloberfläche beeinflussen (Kammerl et al., 2016; Kincaid et al., 2011). Auch bei Probanden mit manifester COPD wurden bereits erniedrigte MHC I Level auf der Oberfläche von Alveolarmakrophagen nachgewiesen (Hodge et al., 2011). Dies legt nahe, dass in bestimmten Gewebsarten, verursacht durch Zigarettenrauch oder anders gearteten oxidativen Stress, durch beeinträchtigte Immunoproteasomen und beeinträchtigte MHC I-Antigenpräsentation die Infektabwehr weniger leistungsfähig funktioniert. Dies könnte bei COPD-Patienten eine weniger effektive lokale Infektabwehr und somit ein erhöhtes Exazerbationsrisiko bedeuten. In dieser Studie wurde lediglich eine erhöhte Expression von  $\beta$ 1i bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nachgewiesen, die Aktivitäten der Immuno-Untereinheiten unterschieden sich nicht, sodass nach Rauchexposition veränderte proteasomale Aktivitäten, wie sie in anderen Gewebearten bereits nachgewiesen wurden, in PBMCs nicht zu beobachten waren. Dies spricht dafür, dass Proteasomen in dieser Zellpopulation eher weniger von den Effekten des Zigarettenrauchs betroffen sind. Die MHC I-Antigenpräsentation auf PBMCs wurde in dieser Studie nicht untersucht und muss Ziel weiterer Untersuchungen sein.

## 6 Zusammenfassung

Tabakkonsum und dessen Folgeerkrankungen sind weltweit für 6 Millionen Todesfälle jährlich verantwortlich. In mehreren vorhergehenden Studien wurde bereits ein Effekt von Zigarettenrauch auf Proteasomen in unterschiedlichen Zellen des Lungengewebes nachgewiesen. Proteasomen waren weniger aktiv, was zu einer Akkumulation oxidativ veränderter Proteine sowie veränderter MHC I-Antigenpräsentation führte (Kammerl et al., 2016; van Rijt et al., 2012). Auch in Lungenzellen von COPD-Patienten wurde bereits eine verminderte proteasomale Aktivität nachgewiesen (Kammerl et al., 2016). Somit können die proteasomale Aktivität und Expression potenziell als neue Biomarker für Früherkennung oder Verlauf von COPD-Erkrankungen in Betracht gezogen werden. Ziel dieser Studie war es, die Regulation des Proteasoms als Reaktion auf Zigarettenrauch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) bei gesunden Rauchern zu untersuchen, um nachzuweisen, ob bereits bei gesunden rauchenden Probanden ohne Krankheitsmanifestation Veränderungen in der proteasomalen Expression oder Aktivität festzustellen sind. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zellzusammensetzung des Blutes ermittelt und die Vergleichbarkeit der Probanden gewährleistet. Raucher wurden mit Hilfe eines Cotinin-Elisas als solche verifiziert. Anschließend wurden PBMCs aus dem Blut von 20 Rauchern und 20 Nichtrauchern isoliert und mittels RT-qPCR und Massenspektrometrie hinsichtlich ihrer proteasomalen Expression auf Transkript- und Proteinebene verglichen. Außerdem wurde mit Hilfe von activity-based-probes und Aktivitätsanalysen im Nativgel die Aktivität der verschiedenen Proteasomkomplexe in Blutzellen bestimmt. Es zeigte sich eine auf Proteinebene erhöhte Abundanz der Immuno-Untereinheit  $\beta 1i$  bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern, die jedoch nicht zu einer erhöhten immunoproteasomalen Aktivität beitrug. Die Gesamtaktivität des Proteasoms im Blut von Rauchern war nicht signifikant verändert gegenüber Nichtrauchern, es konnte jedoch eine Aktivitätsverschiebung bei Rauchern von 20S- hin zum 26S-Proteasom nachgewiesen werden. Während die Menge des assemblierten 26S-Proteasoms in PBMCs von Rauchern signifikant reduziert war, zeigten Raucher eine erhöhte relative Aktivität des 26S-Proteasoms. Dies deutet auf eine verminderte Assemblierung des 26S-Proteasoms in Blutzellen junger gesunder Raucher hin,

obwohl die Proteinmenge zahlreicher 19S-Regulatoruntereinheiten signifikant erhöht war. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Bestimmung der Expression und Aktivität des Proteasoms in Blutzellen ein möglicher Ansatz für eine Biomarkeranalyse ist. Trotz einer kleinen Stichprobenauswahl von nur 20 Probanden pro Gruppe konnten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern detektiert werden. Derzeit werden Methoden entwickelt, die darauf abzielen, die proteasomale Aktivität größerer Kohorten verlässlich zu analysieren (de Bruin et al., 2016). Differentielle Proteasomenaktivitäten in PBMCs könnten einerseits zur Identifikation von Risikopatienten und zur Krankheitsfrüherkennung dienen. Andererseits könnten veränderte proteasomale Eigenschaften als Angriffspunkt für neue Therapieansätze dienen.

## 7 Literaturverzeichnis

Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem. (Tokyo)* *115*, 257–269.

Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* *34*, J258–J265.

Bader, M., and Steller, H. (2009). Regulation of cell death by the ubiquitin–proteasome system. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 878–884.

Baker, T.A., Bach, H.H., Gamelli, R.L., Love, R.B., and Majetschak, M. (2014). Proteasomes in lungs from organ donors and patients with end-stage pulmonary diseases. *Physiol. Res.* *63*, 311–319.

Balch, W.E., Sznajder, J.I., Budinger, S., Finley, D., Laposky, A.D., Cuervo, A.M., Benjamin, I.J., Barreiro, E., Morimoto, R.I., Postow, L., et al. (2014). Malfolded protein structure and proteostasis in lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *189*, 96–103.

Barnes, P.J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 183–192.

Barnes, P.J. (2014). Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Chest Med.* *35*, 71–86.

Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., and Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* *92*, 367–380.

Ben-Nissan, G., and Sharon, M. (2014). Regulating the 20S Proteasome Ubiquitin-Independent Degradation Pathway. *Biomolecules* *4*, 862–884.

Benowitz, N.L. (1996). Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* *18*, 188–204.

Berges, C., Haberstock, H., Fuchs, D., Miltz, M., Sadeghi, M., Opelz, G., Daniel, V., and Naujokat, C. (2008). Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunology* *124*, 234–246.

de Bruin, G., Xin, B.T., Kraus, M., van der Stelt, M., van der Marel, G.A., Kisselev, A.F., Driessen, C., Florea, B.I., and Overkleeft, H.S. (2016). A Set of Activity-Based Probes to Visualize Human (Immuno)proteasome Activities. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *55*, 4199–4203.

Brusselle, G.G., Joos, G.F., and Bracke, K.R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* *378*, 1015–1026.



- Cecarini, V., Ding, Q., and Keller, J.N. (2007). Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* *41*, 673–680.
- Chu-Ping, M., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N. (1992). Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim. Biophys. Acta* *1119*, 303–311.
- Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* *64*, 111–126.
- Dahlmann, B. (2016). Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch. Biochem. Biophys.* *591*, 132–140.
- Decramer, M., Rennard, S., Troosters, T., Mapel, D.W., Giardino, N., Mannino, D., Wouters, E., Sethi, S., and Cooper, C.B. (2008). COPD as a Lung Disease with Systemic Consequences – Clinical Impact, Mechanisms, and Potential for Early Intervention. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* *5*, 235–256.
- Decramer, M., Janssens, W., and Miravittles, M. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* *379*, 1341–1351.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (2015). *Tabakatlas Deutschland 2015*.
- Donaldson, G.C., Law, M., Kowlessar, B., Singh, R., Brill, S.E., Allinson, J.P., and Wedzicha, J.A. (2015). Impact of Prolonged Exacerbation Recovery in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *192*, 943–950.
- Ebstein, F., Kloetzel, P.-M., Krüger, E., and Seifert, U. (2012). Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 2543–2558.
- Eiserich, J.P., van der Vliet, A., Handelman, G.J., Halliwell, B., and Cross, C.E. (1995). Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am. J. Clin. Nutr.* *62*, 1490S-1500S.
- Elbehairy, A.F., Ciavaglia, C.E., Webb, K.A., Guenette, J.A., Jensen, D., Mourad, S.M., Neder, J.A., and O'Donnell, D.E. (2015). Pulmonary Gas Exchange Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *191*, 1384–1394.
- Fabbri, L.M., Luppi, F., Beghe, B., and Rabe, K.F. (2008). Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* *31*, 204–212.
- Feldman, C., and Anderson, R. (2013). Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. *J. Infect.* *67*, 169–184.
- Finley, D. (2009). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 477–513.

Finley, D., Tanaka, K., Mann, C., Feldmann, H., Hochstrasser, M., Vierstra, R., Johnston, S., Hampton, R., Haber, J., Mccusker, J., et al. (1998). Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 244–245.

Finley, D., Chen, X., and Walters, K.J. (2016). Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 77–93.

Freedman, D.S., Flanders, W.D., Barboriak, J.J., Malarcher, A.M., and Gates, L. (1996). Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men. *Ann. Epidemiol.* *6*, 299–306.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* *82*, 373–428.

GOLD Report 2017 GOLD Report 2017. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. Available from: <http://goldcopd.org>.

Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* *426*, 895–899.

Gonçalves, R.B., Coletta, R.D., Silvério, K.G., Benevides, L., Casati, M.Z., da Silva, J.S., and Nociti, F.H. (2011). Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.* *60*, 409–424.

Groettrup, M., Kirk, C.J., and Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 73–78.

Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1062–1067.

Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A.M., Ngo, J.K., and Davies, K.J.A. (2011). HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1355–1364.

Guillaume, B., Stroobant, V., Bousquet-Dubouch, M.-P., Colau, D., Chapiro, J., Parmentier, N., Dalet, A., and Van den Eynde, B.J. (2012). Analysis of the Processing of Seven Human Tumor Antigens by Intermediate Proteasomes. *J. Immunol.* *189*, 3538–3547.

Halpin, D.M., Miravittles, M., Metzdorf, N., and Celli, B. (2017). Impact and prevention of severe exacerbations of COPD: a review of the evidence. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *Volume 12*, 2891–2908.

Heijs, B., Tolner, E.A., Bovée, J.V.M.G., van den Maagdenberg, A.M.J.M., and McDonnell, L.A. (2015). Brain Region-Specific Dynamics of On-Tissue Protein

Digestion Using MALDI Mass Spectrometry Imaging. *J. Proteome Res.* *14*, 5348–5354.

Hirano, H., Kimura, Y., and Kimura, A. (2016). Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics* *134*, 37–46.

Hodge, S., Matthews, G., Mukaro, V., Ahern, J., Shivam, A., Hodge, G., Holmes, M., Jersmann, H., and Reynolds, P.N. (2011). Cigarette Smoke-Induced Changes to Alveolar Macrophage Phenotype and Function Are Improved by Treatment with Procysteine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *44*, 673–681.

Hogg, J.C., and Timens, W. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 435–459.

HuangFu, W.-C., Liu, J., Harty, R.N., and Fuchs, S.Y. (2008). Cigarette smoking products suppress anti-viral effects of Type I interferon via phosphorylation-dependent downregulation of its receptor. *FEBS Lett.* *582*, 3206–3210.

Hwang, J.Y., Randall, T.D., and Silva-Sanchez, A. (2016). Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front. Immunol.* *7*.

Ishii, T., Sakurai, T., Usami, H., and Uchida, K. (2005). Oxidative Modification of Proteasome: Identification of an Oxidation-Sensitive Subunit in 26 S Proteasome †. *Biochemistry* *44*, 13893–13901.

Jia, J., Conlon, T.M., Sarker, R.S., Taşdemir, D., Smirnova, N.F., Srivastava, B., Verleden, S.E., Güneş, G., Wu, X., Prehn, C., et al. (2018). Cholesterol metabolism promotes B-cell positioning during immune pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *EMBO Mol. Med.* *10*, e8349.

Kammerl, I.E., Dann, A., Mossina, A., Brech, D., Lukas, C., Vosyka, O., Nathan, P., Conlon, T.M., Wagner, D.E., Overkleeft, H.S., et al. (2016). Impairment of Immunoproteasome Function by Cigarette Smoke and in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *193*, 1230–1241.

Kammerl, I.E., Caniard, A., Merl-Pham, J., Ben-Nissan, G., Mayr, C.H., Mossina, A., Geerlof, A., Eickelberg, O., Hauck, S.M., Sharon, M., et al. (2019). Dissecting the molecular effects of cigarette smoke on proteasome function. *J. Proteomics* *193*, 1–9.

Khan, E.M., Lanir, R., Danielson, A.R., and Goldkorn, T. (2007). Epidermal growth factor receptor exposed to cigarette smoke is aberrantly activated and undergoes perinuclear trafficking. *FASEB J.* *22*, 910–917.

Kincaid, E.Z., Che, J.W., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J.C., Welsh, R.M., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., et al. (2011). Mice

completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat. Immunol.* **13**, 129–135.

Koch, A., Steffen, J., and Krüger, E. (2011). TCF11 at the crossroads of oxidative stress and the ubiquitin proteasome system. *Cell Cycle* **10**, 1200–1207.

Kuipers, I., Guala, A.S., Aesif, S.W., Konings, G., Bouwman, F.G., Mariman, E.C., Wouters, E.F.M., Janssen-Heininger, Y.M.W., and Reynaert, N.L. (2011). Cigarette Smoke Targets Glutaredoxin 1, Increasing S-Glutathionylation and Epithelial Cell Death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 931–937.

Lampert, T., von der Lippe, E., and Müters, S. (2013). Verbreitung des Rauchens in der Erwachsenenbevölkerung in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **56**, 802–808.

Lander, G.C., Martin, A., and Nogales, E. (2013). The proteasome under the microscope: the regulatory particle in focus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 243–251.

Lanekoff, I., Stevens, S.L., Stenzel-Poore, M.P., and Laskin, J. (2014). Matrix effects in biological mass spectrometry imaging: identification and compensation. *The Analyst* **139**, 3528–3532.

Lange, P., Marott, J.L., Vestbo, J., Olsen, K.R., Ingebrigtsen, T.S., Dahl, M., and Nordestgaard, B.G. (2012). Prediction of the Clinical Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Using the New GOLD Classification: A Study of the General Population. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 975–981.

Li, J., Sun, S., Tang, R., Qiu, H., Huang, Q., Mason, T.G., and Tian, L. (2016). Major air pollutants and risk of COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **11**, 3079–3091.

Li, X., Thompson, D., Kumar, B., and DeMartino, G.N. (2014). Molecular and Cellular Roles of PI31 (PSMF1) Protein in Regulation of Proteasome Function. *J. Biol. Chem.* **289**, 17392–17405.

Livnat-Levanon, N., Kevei, É., Kleifeld, O., Krutauz, D., Segref, A., Rinaldi, T., Erpapazoglou, Z., Cohen, M., Reis, N., Hoppe, T., et al. (2014). Reversible 26S Proteasome Disassembly upon Mitochondrial Stress. *Cell Rep.* **7**, 1371–1380.

Lopez, A.D. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur. Respir. J.* **27**, 397–412.

MacNee, W. (2001). Oxidants/antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to therapy. *Novartis Found. Symp.* **234**, 169–185; discussion 185-188.

Madjid, M., and Fatemi, O. (2013). Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update. *Tex. Heart Inst. J.* *40*, 17–29.

Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* *583*, 3966–3973.

Mansoor, M.A., Stakkestad, J.A., and Drabløs, P.A. (2013). Higher Leukocyte Subpopulation Counts in Healthy Smoker Industrial Workers than in Nonsmoker Industrial Workers: Possible Health Consequences. *Acta Haematol.* *129*, 218–222.

McCutchen-Maloney, S.L. (2000). cDNA Cloning, Expression, and Functional Characterization of PI31, a Proline-rich Inhibitor of the Proteasome. *J. Biol. Chem.* *275*, 18557–18565.

McDonough, J.E., Yuan, R., Suzuki, M., Seyednejad, N., Elliott, W.M., Sanchez, P.G., Wright, A.C., Gefter, W.B., Litzky, L., Coxson, H.O., et al. (2011). Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* *365*, 1567–1575.

Meiners, S., and Eickelberg, O. (2012). What shall we do with the damaged proteins in lung disease? Ask the proteasome! *Eur. Respir. J.* *40*, 1260–1268.

Meiners, S., Keller, I.E., Semren, N., and Caniard, A. (2014). Regulation of the Proteasome: Evaluating the Lung Proteasome as a New Therapeutic Target. *Antioxid. Redox Signal.*

Messner, B., Frotschnig, S., Steinacher-Nigisch, A., Winter, B., Eichmair, E., Gebetsberger, J., Schwaiger, S., Ploner, C., Laufer, G., and Bernhard, D. (2012). Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell Death Dis.* *3*, e424.

Min, T., Bodas, M., Mazur, S., and Vij, N. (2011). Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *89*, 577–593.

Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 104–115.

Naujokat, C., Berges, C., Höh, A., Wieczorek, H., Fuchs, D., Ovens, J., Miltz, M., Sadeghi, M., Opelz, G., and Daniel, V. (2007). Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* *120*.

Niewerth, D., Kaspers, G.J., Assaraf, Y.G., van Meerloo, J., Kirk, C.J., Anderl, J., Blank, J.L., van de Ven, P.M., Zweegman, S., Jansen, G., et al. (2014). Interferon- $\gamma$ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *7*, 7.

- Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., and Suttorp, N. (2010). Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *181*, 1294–1309.
- Osoata, G.O., Yamamura, S., Ito, M., Vuppusetty, C., Adcock, I.M., Barnes, P.J., and Ito, K. (2009). Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *384*, 366–371.
- Papi, A., Bellettato, C.M., Braccioni, F., Romagnoli, M., Casolari, P., Caramori, G., Fabbri, L.M., and Johnston, S.L. (2006). Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 1114–1121.
- Paulin, L.M., Diette, G.B., Blanc, P.D., Putcha, N., Eisner, M.D., Kanner, R.E., Belli, A.J., Christenson, S., Tashkin, D.P., Han, M., et al. (2015). Occupational Exposures Are Associated with Worse Morbidity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *191*, 557–565.
- Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers, G.L., et al. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* *107*, 499–511.
- de la Peña, A.H., Goodall, E.A., Gates, S.N., Lander, G.C., and Martin, A. (2018). Substrate-engaged 26 S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation. *Science* eaav0725.
- Petitti, D.B., and Kipp, H. (1986). The leukocyte count: associations with intensity of smoking and persistence of effect after quitting. *Am. J. Epidemiol.* *123*, 89–95.
- Pettit, A.P., Brooks, A., Laumbach, R., Fiedler, N., Wang, Q., Strickland, P.O., Madura, K., Zhang, J., and Kipen, H.M. (2012). Alteration of peripheral blood monocyte gene expression in humans following diesel exhaust inhalation. *Inhal. Toxicol.* *24*, 172–181.
- Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J.A. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* *432*, 585–595.
- Polverino, F., Cosio, B.G., Pons, J., Laucho-Contreras, M., Tejera, P., Iglesias, A., Rios, A., Jahn, A., Sauleda, J., Divo, M., et al. (2015). B Cell-Activating Factor. An Orchestrator of Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *192*, 695–705.
- Postma, D.S., Bush, A., and van den Berge, M. (2015). Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* *385*, 899–909.

Predmore, J.M., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Westfall, M.V., Dyke, D.B., Pagani, F., Powell, S.R., and Day, S.M. (2010). Ubiquitin Proteasome Dysfunction in Human Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies. *Circulation* 121, 997–1004.

Pryor, W.A., and Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686, 12–27; discussion 27-28.

Rangasamy, T., Misra, V., Zhen, L., Tankersley, C.G., Tuder, R.M., and Biswal, S. (2009). Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L888–L900.

van Rijt, S.H., Keller, I.E., John, G., Kohse, K., Yildirim, A.O., Eickelberg, O., and Meiners, S. (2012). Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L814–L823.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771.

Rodriguez-Roisin, R. (2000). Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 117, 398S-401S.

Rom, O., Avezov, K., Aizenbud, D., and Reznick, A.Z. (2013). Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 187, 5–10.

Ruggiero, C., Metter, E.J., Cherubini, A., Maggio, M., Sen, R., Najjar, S.S., Windham, G.B., Ble, A., Senin, U., and Ferrucci, L. (2007). White blood cell count and mortality in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 1841–1850.

Savulescu, A.F., and Glickman, M.H. (2011). Proteasome Activator 200: The HEAT is on... *Mol. Cell. Proteomics* 10, R110.006890-R110.006890.

Schmidt, C., Berger, T., Groettrup, M., and Basler, M. (2018). Immunoproteasome Inhibition Impairs T and B Cell Activation by Restraining ERK Signaling and Proteostasis. *Front. Immunol.* 9, 2386.

Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (2009). Targeting Proteins for Destruction by the Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 73–96.

Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schröter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., et al. (2010). Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* 142, 613–624.

Serim, S., Haedke, U., and Verhelst, S.H.L. (2012). Activity-Based Probes for the Study of Proteases: Recent Advances and Developments. *ChemMedChem* 7, 1146–1159.

Shang, F., and Taylor, A. (2011). Ubiquitin–proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 5–16.

Smith, M.R., Kinmonth, A.-L., Luben, R.N., Bingham, S., Day, N.E., Wareham, N.J., Welch, A., and Khaw, K.-T. (2003). Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis* 169, 331–337.

Soler-Cataluna, J.J. (2005). Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 60, 925–931.

Somborac-Bacura, A., van der Toorn, M., Franciosi, L., Slebos, D.-J., Zanic-Grubisic, T., Bischoff, R., and van Oosterhout, A.J.M. (2013). Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells. *Exp. Physiol.* 98, 316–325.

Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochem. Biokhimiia* 74, 1411–1442.

Stadtmueller, B.M., and Hill, C.P. (2011). Proteasome Activators. *Mol. Cell* 41, 8–19.

Stämpfli, M.R., and Anderson, G.P. (2009). How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 377–384.

van der Strate, B.W.A., Postma, D.S., Brandsma, C.-A., Melgert, B.N., Luinge, M.A., Geerlings, M., Hylkema, M.N., van den Berg, A., Timens, W., and Kerstjens, H.A.M. (2006). Cigarette Smoke–induced Emphysema: A Role for the B Cell? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 751–758.

Sullivan, A.K. (2006). Activated Oligoclonal CD4+ T Cells in the Lungs of Patients with Severe Emphysema. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 486–486.

Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., Benthem, J. van, Wester, P., and Opperhuizen, A. (2011). Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 8, 613.

Tamakoshi, K., Toyoshima, H., Yatsuya, H., Matsushita, K., Okamura, T., Hayakawa, T., Okayama, A., Ueshima, H., and NIPPON DATA90 Research Group (2007). White blood cell count and risk of all-cause and cardiovascular mortality in nationwide sample of Japanese--results from the NIPPON DATA90. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 71, 479–485.

van der Vaart, H. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 59, 713–721.



Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.

Vaysse, P.-M., Heeren, R.M.A., Porta, T., and Balluff, B. (2017). Mass spectrometry imaging for clinical research - latest developments, applications, and current limitations. *The Analyst* 142, 2690–2712.

VerPlank, J.J.S., and Goldberg, A.L. (2017). Regulating protein breakdown through proteasome phosphorylation. *Biochem. J.* 474, 3355–3371.

Vestbo, J., Hurd, S.S., Agustí, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martinez, F.J., Nishimura, M., et al. (2013). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 347–365.

Vogelmeier, C., Buhl, R., Criée, C., Gillissen, A., Kardos, P., Köhler, D., Magnussen, H., Morr, H., Nowak, D., Pfeiffer-Kascha, D., et al. (2007). Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 61, e1–e40.

Vogelmeier, C.F., Criner, G.J., Martinez, F.J., Anzueto, A., Barnes, P.J., Bourbeau, J., Celli, B.R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L.M., et al. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 557–582.

Wang, X., Chemmama, I.E., Yu, C., Huszagh, A., Xu, Y., Viner, R., Block, S.A., Cimermancic, P., Rychnovsky, S.D., Ye, Y., et al. (2017). The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 292, 16310–16320.

Wei, J., Rahman, S., Ayaub, E.A., Dickhout, J.G., and Ask, K. (2013). Protein Misfolding and Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Lung Disease. *Chest* 143, 1098–1105.

Whincup, P.H., Gilg, J.A., Emberson, J.R., Jarvis, M.J., Feyerabend, C., Bryant, A., Walker, M., and Cook, D.G. (2004). Passive smoking and risk of coronary heart disease and stroke: prospective study with cotinine measurement. *BMJ* 329, 200–205.

World Health Organization (2015). WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking, 2015.

Xu, H., Fu, J., Ha, S.-W., Ju, D., Zheng, J., Li, L., and Xie, Y. (2012). The CCAAT box-binding transcription factor NF-Y regulates basal expression of

human proteasome genes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 818–825.

Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Ito, T., Kiuchi, T., Ono, A., Miyajima, S., Nagai, K., Higashi, T., Matsuno, Y., et al. (2015). Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Lab. Invest.* 95, 625–634.

Yanbaeva, D.G., Dentener, M.A., Creutzberg, E.C., Wesseling, G., and Wouters, E.F.M. (2007). Systemic Effects of Smoking. *Chest* 131, 1557–1566.

Yang, S.-R., Yao, H., Rajendrasozhan, S., Chung, S., Edirisinghe, I., Valvo, S., Fromm, G., McCabe, M.J., Sime, P.J., Phipps, R.P., et al. (2009). RelB Is Differentially Regulated by I $\kappa$ B Kinase- $\alpha$  in B Cells and Mouse Lung by Cigarette Smoke. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 147–158.

Zuo, H., Nygård, O., Vollset, S.E., Ueland, P.M., Ulvik, A., Midttun, Ø., Meyer, K., Igland, J., Sulo, G., and Tell, G.S. (2018). Smoking, plasma cotinine and risk of atrial fibrillation: the Hordaland Health Study. *J. Intern. Med.* 283, 73–82.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol(ar)
ABP	Activity-based probe
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
cl	Centiliter
cm	Centimeter
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CP	Core particle
CRP	C-reaktives Protein
CSE	Cigarette smoke extract
CT-L	Chymotrypsin-like
C <sub>t</sub> -Wert	Threshold cycle-Wert
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FASP	Filter Aided Sample Prep
FSC	Forward scatter
g	Gramm
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstrucive Lung Disease
HEAT	Huntingtin-elongation factor 3-PR65/A subunit of PP2A-lipid kinase TOR
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
iBALT	Inducible bronchus-associated lymphoid tissue
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH $_2$ PO $_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
m	Meter
M	Mol(ar)
mA	Milliampere
MgCl $_2$	Magnesiumchlorid

MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
ml	Milliliter
mM	Millimol(ar)
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NF-Y	Nuklearer Transkriptionsfaktor-Y
nm	Nanometer
Nrf1	Nuclear factor erythroid 2-related factor 1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBST	Phosphate buffered saline+Tween
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCF	Relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revolutions per minute
RP	Regulatory particle
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Side scatter
SLLVY	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin activity substrate
TCF11	Transkriptionsfaktor 11
T-L	Trypsine-like
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris-aminomethan
UA-Puffer	Urea-Puffer
UPS	Ubiquitin-proteasome-system
VEGFR	Vascular endothelial growth factor-receptor
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Kompositionsmöglichkeiten der katalytischen Untereinheiten im 20S core particle des Proteasoms.....	13
Abbildung 2: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie.....	41
Abbildung 3: Aufbau einer ABP .....	55
Abbildung 4: Cotiningehalt im Plasma von Rauchern und Nichtrauchern .....	58
Abbildung 5: Zellzusammensetzung des Vollblutes von Rauchern und Nichtrauchern .....	60
Abbildung 6: Expressionsanalyse unterschiedlicher proteasomaler Untereinheiten auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR .....	62
Abbildung 7: HPLC-Massenspektrometrisch ermittelte Abundanzen proteasomaler Untereinheiten .....	66
Abbildung 8: Aktivität der katalytischen Untereinheiten, ermittelt mittels activity-based probe profiling .....	68
Abbildung 9: Ermittlung der CT-L Aktivität im Nativgel mittels Fluoreszenzassay .....	70
Abbildung 10: Expression von $\alpha$ 1-7 in den 20S-und 26S Komplexen .....	72
Abbildung 11: Relative Menge Rpt5 in aktiven 26S-Komplexen.....	73
Abbildung 12: Relative Proteasomenaktivität und Aktivitäts-Expressions-Korrelationen bei Rauchern und Nichtrauchern.....	75

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die hier verwendete Nomenklatur der 20S $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten .....	14
Tabelle 2: Übersicht über die hier verwendete Nomenklatur der proteasomalen Regulatoren.....	16
Tabelle 3: Probandenkollektiv .....	35
Tabelle 4: Oberflächen-Antigene zur durchflusszytometrischen Analyse .....	37
Tabelle 5: Primer-Mix für quantitative PCR-Reaktion .....	46
Tabelle 6: TSDG-Volumina zur PBMC-Lyse.....	48
Tabelle 7: Zusammensetzung Trenngel .....	51
Tabelle 8: Zusammensetzung Sammelgel .....	52
Tabelle 9: Activity-based probes .....	56



## **11 Danksagung**

Meiner Doktormutter, Betreuerin und Arbeitsgruppenleiterin, Prof. Dr. Silke Meiners, danke ich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen, die ständige Ansprechbarkeit, die immense fachliche Unterstützung und die motivierenden Worte auf dem Weg der Entstehung dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe des Meiners-Labs danke ich für die Unterstützung bei der Labortätigkeit und die wertvollen fachlichen Ratschläge. Insbesondere danke ich Frank Dahlströhm für die Hilfe bei der PBMC-Preparation, Dr. Ilona Kammerl und Dr. Vanessa Welk für die Einweisungen in die Labortätigkeiten, Christina Lukas für die organisatorische Unterstützung und Dr. Oliver Vosyka für die Betreuung der Aktivitätsanalysen. Außerdem danke ich Dr. Marion Frankenberger für die Supervision der Durchflusszytometrie. Den übrigen Teammitgliedern und Ehemaligen des Meiners-Labs danke ich für die guten Gespräche und Ratschläge und die freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Dadurch entstand für mich eine sehr angenehme und fruchtbare Arbeitsatmosphäre.

Meiner Schwester Franziska Schimmer danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung in schwierigen und stressigen Zeiten.

Meinem Ehemann Andreas Peierl danke ich für die Begleitung meines Studiums und meiner Dissertation und sein großes Verständnis, mit dem er mir immer einen Ausgleich zu Labor, Studium und Klinik gegeben hat.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, deren großes Vertrauen in mich mein Leben sehr bereichert und deren Unterstützung während des Studiums unverzichtbar für mich war.

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Julia Peierl, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

*„Einfluss von Zigarettenrauch auf Komposition und Aktivität des Proteasoms in humanen PBMCs“*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

Egweil, 30.07.2020

Ort, Datum

Julia Peierl

Unterschrift