

**DER EINFLUSS VON PROTEASOMINHIBITOREN AUF DIE
CHEMOKINSEKRETION VON LUNGENEPITHELZELLEN UND
MYELOISCHEN ZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Anke Heimbürg, geb. Müller
geb. am 17.01.1964 in Magdeburg

Gutachter: PD Dr. med. Frank Bühling
Prof. Dr. Christoph Röcken

eingereicht am: 15.03.2006
verteidigt am: 14.07.2006

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema „Der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Chemokinsekretion von Lungenepithelzellen und myeloischen Zellen“ selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 12.03.06

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum April 1999 bis Dezember 2002 aus Mitteln der Deutschen Krebshilfe DKH 10-1355-Ge 1 finanziert.

DANKSAGUNG

Bei Herrn *Prof. Dr. S. Ansorge* möchte ich mich recht herzlich für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Immunologie das dieser Dissertation zugrunde liegende Forschungsthema bearbeiten zu können.

Für seine ständige Unterstützung bedanke ich mich auch bei Herrn *Prof. Dr. T. Welte*.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn *PD Dr. Frank Bühling*. Seine Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen, seine kritischen Ratschläge und praktischen Tipps während der experimentellen Laborarbeit, vor allem aber in der schwierigen Phase der schriftlichen Abfassung der Dissertationsarbeit haben mir sehr geholfen.

Frau *Dr. Annegret Gerber* hat als Projektleiterin dank ihrer hervorragenden Betreuung maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Besonders bedanke ich mich bei ihr für die geduldige Hilfe beim Erlernen vieler molekularbiologischer Methoden und ihre Fähigkeit immer wieder anzuspornen und neu zu motivieren.

Meinen Kolleginnen *Dr. Gudrun Koch*, *Dr. Aline Wille* und *Dr. Anita Reisenauer* danke ich für viele anregende Diskussionen zu wissenschaftlichen Fragestellungen (und weit darüber hinaus), unzählige gemeinsam verbrachte Stunden in Labor und Büro, an die ich mich sehr gern erinnere.

Danke an *Marianne Blichmann* dafür, dass sie mich in die Geheimnisse von Zellkulturen einweihte. Für die jederzeit kompetente experimentelle Hilfe und die außerordentlich angenehme und heitere Laboratmosphäre möchte ich mich bei *Gabi Weitz* und *Yvonne Peter* bedanken.

Bei Frau *B. John* und Frau *P. Alteneder* möchte ich mich für die Hilfe bei den Zytokinbestimmungen und Granulozyten-Migrationsassays bedanken.

Danke allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Immunologie, die mir immer, wenn es nötig war, helfend zur Seite standen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei *Dr. Ute Bank* für ihr stetes Interesse am Fortgang der Dissertationsarbeit (einschließlich der sanft drängelnden Nachfrage „Na, promovierst du heute wieder?“) sowie ihrer kritischen und sorgfältigen abschließenden Korrekturlesung.

Geduld mussten in den letzten Monaten besonders mein Mann Jens und unsere Kinder mit mir haben. Dafür danke!

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, Monika und Otto Müller, die jederzeit für unsere Kinder verfügbar waren und damit viele „stressige Situationen“ in der Familie entschärften. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

1	Einleitung	9
1.1	Proteolyse.....	9
1.2	Das Proteasom und seine Funktion in der Zelle.....	10
1.3	Proteasom und Zellzyklus	13
1.4	Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch das Proteasom.....	14
1.5	Chemokine und die Regulation der IL-8-Expression	15
1.6	Einfluss von Zytokinen auf Inflammationsprozesse in der Lunge.....	17
1.7	Proteasominhibitoren und ihr therapeutischer Einsatz	18
1.8	Zielstellung	21
2	Methoden	22
2.1	Zellkulturarbeiten	22
2.1.1	Kultivierung der Zellen	22
2.1.2	Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen	24
2.1.3	Vitalitätsbestimmungen mit Trypanblau	24
2.1.4	Einsatz von Proteasominhibitoren in Zellfunktionsassays	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Isolation von Gesamt-RNA	25
2.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	25
2.2.3	Reverse Transkription (RT).....	26
2.2.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
2.2.5	Herstellung der cDNA-Fragmente von IL-8 und β -Actin für quantitative RT-PCR	27
2.2.6	Amplifikation von IL-8-cDNA durch quantitative RT-PCR	28
2.2.7	Agarosegel-Elektrophorese	30
2.2.8	Untersuchung des Einflusses von Proteasominhibitoren auf die RNA- Stabilität nach Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin D	30
2.2.9	Ermittlung der IL-8-Neusyntheserate durch <i>Nuclear runoff</i> -Analysen ...	31
2.3	Biochemische und zellbiologische Methoden.....	33
2.3.1	Proteinbestimmung	33
2.3.2	Zytokinbestimmungen mittels Enzymimmunoassay	33
2.3.3	Proliferation.....	34

2.3.4	Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren mittels Trans-AM-Kit.....	34
2.3.5	Aktivierung der MAP-Kinasen	36
2.3.6	Chemotaxis in Agarose	36
2.4	Durchflusszytometrische Analysen.....	39
2.4.1	Vitalitätsbestimmung mit Propidiumiodid	39
2.4.2	Bestimmung von Enzymaktivitäten in vitalen Zellen	40
2.4.3	Zellzyklusuntersuchungen	41
2.4.4	Cyclin B- und D-Bestimmung.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Enzymaktivität des Proteasoms.....	43
3.1.1	Beeinflussung der Chymotrypsinaktivität	43
3.1.2	Beeinflussung der Trypsin-artigen Aktivität.....	45
3.1.3	Beeinflussung der Aktivität von Cysteinproteinasen	47
3.2	Einfluss der Proteasominhibitoren auf das Proliferationsverhalten der humanen Lungenepithelzelllinie A-549.....	49
3.3	Vitalitätsuntersuchungen nach Behandlung der Zelllinie A-549 mit Proteasominhibitoren.....	50
3.3.1	Vitalitätsprüfung unter Verwendung von Trypanblau	50
3.3.2	Durchflusszytometrische Vitalitätstestung mit Propidiumiodid.....	51
3.4	Einfluss der Proteasominhibitoren auf den Zellzyklus	51
3.4.1	Anteil der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen nach Hemmung des Proteasoms	51
3.4.2	Expression der Cycline B1 und D1	55
3.5	Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Proteasominhibitoren	56
3.5.1	IL-8, ENA-78 und MCP-1 in A-549-Zellen.....	56
3.5.2	Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den Zelllinien SK-MES, BEAS-2B, NCI-H727	60
3.5.3	Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den primären Lungenepithelzellen (NHBE und SAEC).....	61
3.5.4	Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den myeloischen Zelllinien MONO-MAC-6 und THP-1	62
3.6	Nachweis der biologischen Aktivität des freigesetzten IL-8.....	63
3.7	Wirkung der Proteasominhibitoren auf IL-8-mRNA-Konzentration.....	66
3.8	Einfluss der Proteasominhibitoren auf die RNA-Halbwertszeit.....	66
3.9	Wirkung der Proteasominhibitoren auf die RNA-Neusyntheserate	68
3.10	Einfluss von Proteasominhibitoren auf Transkriptionsfaktoren, die an IL-8- Neusynthese beteiligt sind.....	69

3.10.1 NF- κ B.....	69
3.10.2 AP-1	70
3.11 Einfluss der MAP-Kinase-Aktivierung auf die IL-8-Sekretion von A-549-Zellen	73
4 Diskussion	75
4.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit.....	75
4.2 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Sekretion von Chemokinen	75
4.2.1 Proteasominhibitoren und ihre Wirkungsweise	75
4.2.2 Beeinflussung der Zellproliferation und des Zellzyklus durch Proteasominhibitoren	77
4.2.3 Einfluss von Proteasominhibitoren auf IL-8-Sekretion in Zelllinien	80
4.2.4 Biologische Aktivität des nach Proteasominhibierung sekretierten IL-8.....	83
4.2.5 Wirkung von Proteasominhibitoren auf IL-8-mRNA	83
4.2.6 Einfluss der Proteasominhibitoren auf Transkriptionsfaktoren.....	85
5 Zusammenfassung.....	89
6 Literatur.....	90
Tabellarischer Lebenslauf	98

Abkürzungen

Englische Bezeichnungen kursiv

AB/AM	Antibiotikum/Antimykotikum
ARDS	<i>Adult Respiratory Distress Syndrome</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ENA-78	<i>Epithelial Neutrophil-Activating Protein-78</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HBS	<i>Hepes Buffered Saline</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMA	Phorbolmyristatazetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RANTES	<i>Normal T Cell Expressed and Secreted Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	<i>Ribonuclease</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytical Virus</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>real-time-PCR</i>
SI	Stimulationsindex
SSC	<i>Side Scatter</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
fMLP	Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin

1 Einleitung

1.1 Proteolyse

Die zelluläre Proteolyse ist von grundlegender Bedeutung bei allen physiologischen Prozessen aber auch bei pathophysiologischen Prozessen wie der Tumormetastasierung und der Entzündung.

Der proteolytische Abbau von Proteinen stellt einen zentralen Aspekt der Zellregulation dar, da die Funktionalität vieler Proteine über ihre Halbwertszeit gesteuert wird. Der proteolytischen Spaltung unterliegen sowohl langlebige Strukturproteine, die Bestandteil dauerhaften Gewebes wie Knochen oder Muskulatur sind, als auch Enzyme und Regulatorproteine, die z.B. den Zellzyklus steuern und eine kurze Lebensdauer haben.

Enzyme, die die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung katalysieren, werden als Proteasen bzw. Peptidasen bezeichnet und der Gruppe der Hydrolasen zugeordnet. Man unterscheidet Exo- und Endopeptidasen. Exopeptidasen spalten ausschließlich im Bereich der ersten C- oder N-terminalen Peptidbindungen und werden entsprechend als Amino- oder Carboxypeptidasen bezeichnet. Endopeptidasen katalysieren die Spaltung von Proteinen innerhalb der Polypeptidkette.

Proteolytische Prozesse werden in zwei Gruppen eingeteilt. Unter dem Begriff intrazelluläre Proteolyse werden der Abbau zelleigener Proteine im Proteasom, in Lysosomen und anderen Zellorganellen zusammengefasst. Die extrazelluläre Proteolyse umfasst einerseits die Hydrolyse von Matrixproteinen, die bei morphogenetischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, andererseits das Prozessing von biologisch aktiven Proteinen, die an der zellulären Kommunikation beteiligt sind. An der extrazellulären Proteolyse sind sowohl Plasmamembran-ständige als auch sezernierte Proteasen beteiligt. Auch lysosomale Enzyme wie die Kathepsine B, K und L können an der extrazellulären Proteolyse beteiligt sein, wenn sie in das umgebende Medium sezerniert werden^{1,2}.

Als wichtiger extrazellulärer Weg ist das System der Verdauungsproteasen anzusehen. Im Gastrointestinaltrakt katalysieren z.B. Pepsin, Carboxypeptidasen, Aminopeptidasen, Trypsin und Chymotrypsin den Abbau mit der Nahrung aufgenommener Proteine zu (Poly-) Peptiden.

Bei der *vollständigen Proteolyse* entstehen beim Abbau der Proteine freie Aminosäuren, die der Zelle für die Energiegewinnung oder Proteinneusynthese zur Verfügung stehen.

Im Gegensatz dazu werden bei der *limitierten Proteolyse* Peptidbindungen selektiv gespalten, was zur Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Zielproteine führen kann. Störungen in der Bildung und Wirkung von Proteasen können wesentlich zu pathologischen Veränderungen sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus beitragen, z.B. Hypertonie, Tumorerkrankungen und insbesondere deren Metastasierung, Blutgerinnungsstörungen, Viruserkrankungen, Wundheilungsstörungen und Entzündungsreaktionen.

1.2 Das Proteasom und seine Funktion in der Zelle

Einen der Hauptwege der intrazellulären Proteolyse stellt das proteasomale System dar, dass u. a. eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation und auch in der Regulation der Apoptose spielt. Das Proteasom ist der bisher am besten untersuchte proteinabbauende Komplex im Zytoplasma.

Proteasomen sind große Multienzymkomplexe, die zahlreich im Zytoplasma und im Zellkern eukaryoter Zellen lokalisiert sind. Sie sind sowohl am ubiquitin-abhängigen als auch am ubiquitin-unabhängigen, nichtlysosomalen Abbau zellulärer Proteine beteiligt³ und beeinflussen die Prozessierung von Antigenen. Meistens sind Proteasomen aus zwei funktionellen Einheiten aufgebaut. Als biologisch aktive Einheit innerhalb der Eukariontenzelle wird das 26S Proteasom angesehen. Die zylinderförmige 20S Untereinheit stellt das Kernstück des Proteasoms dar und zwei periphere 19S Regulatorkappen sitzen als Kappen auf den beiden Öffnungen des 20S Kernkomplexes. Außer den 19S-20S-19S Proteasomen findet man *in-vivo* auch 19S-20S Komplexe, wobei noch unklar ist, welche der beiden Formen für den Proteinabbau bedeutsamer ist. In verschiedenen Gewebe- und Zelltypen existieren Komplexe aus 19S-20S Proteasomen und dem Interferon- γ induzierten Heptamerring PA28 (11S)⁴. Über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus stimulieren sie die Generierung von Antigen-Peptiden und werden deshalb auch als Immunproteasomen bezeichnet⁵. Außerdem gibt es in tierischen Zellen sowohl freie 20S Proteasomen als auch 11S-20S-11S Komplexe, die aber nicht in der Lage sind, ubiquitin-markierte Proteine abzubauen.

Der zylindrische 20S Komplex wird durch vier gestapelte Ringsysteme gebildet, die aus jeweils sieben Untereinheiten bestehen⁶. Jede dieser Untereinheiten enthält drei katalytisch aktive Zentren (Abbildung 1). Die beiden äußeren α -Ringe bilden mit den regulatorischen 19S Partikeln (ca. 890 kDa) einen schmalen Tunnel, durch den ausschließlich denaturierte Proteine in das Innere des Proteasoms gelangen können⁷. Die regulatorischen 19S Untereinheiten bestehen aus einer „Basis“ und einem „Deckel“.

Der „Deckel“ besteht aus mindestens neun Polypeptiden und ermöglicht die hochaffine Bindung an die Poly-Ubiquitin-Moleküle und deren Abspaltung vom zu degradierenden Protein ⁸. Die abgespaltenen Ubiquitin-Moleküle stehen dann für weitere Proteinmodifizierungen zur Verfügung. Die direkte Verbindung zum 20S Proteasom wird durch die „Basis“ der 19S Untereinheit gebildet. Die sechs hier lokalisierten homologen ATPasen ermöglichen durch direkten Kontakt mit dem 20S Partikel das ATP-abhängige Öffnen des „Tunnels“ in den α -Ring des Proteasoms ⁹. Die ATPasen des 19S Komplexes sind damit sowohl für die Auffaltung des Proteins als auch für dessen Transport in das katalytisch aktive Zentrum des Proteasoms verantwortlich.

Die zwei β -Ringe des 20S Komplexes bilden das Innere des Zylinders, in dem Proteine hydrolytisch zu kleinen Polypeptiden von 3-25 Aminosäuren abgebaut ¹⁰ werden.

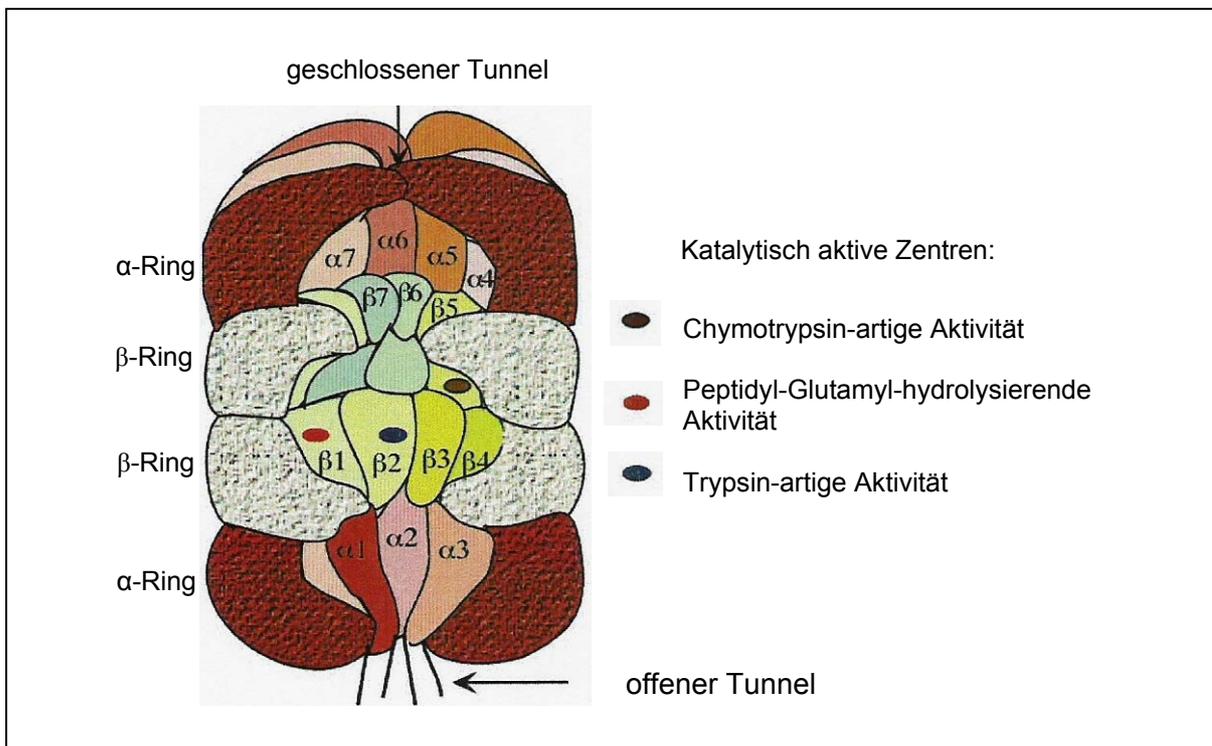


Abb.1: Das 20S Proteasom.

Die schematische Darstellung nach Kisselev ¹² zeigt die Lokalisation der Untereinheiten und der katalytisch aktiven Zentren. Der „Eingangstunnel“ an der Oberseite des Proteasoms ist geschlossen dargestellt, während an der Unterseite der „Tunnel“ geöffnet ist.

Die Sequenzen der β -Ringe besitzen untereinander weniger Homologien als die der α -Ringe. Die proteolytisch aktiven Zentren in den β -Untereinheiten sind N-terminale Threonine. Sie entstehen durch autolytische Prozesse, bei denen N-terminale Propeptide (besitzen fast alle β -Untereinheiten) während der Formation des 20S Proteasoms

abgespalten oder prozessiert werden. Aufgrund ihres aktiven Zentrums gehören Proteasomen zu den N-terminalen nucleophilen (Ntn-) Hydrolasen.

Entsprechend ihrer Spaltpräferenzen, deren Zuordnung mit Hilfe von Peptidsubstraten erfolgte, werden Chymotrypsin-artige, Trypsin-artige und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende (Caspase-artige) Aktivitäten des Proteasoms unterschieden ¹¹. Die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten spalten Peptidbindungen nach großen, hydrophoben Resten wie Tyrosin, Norleucin oder Phenylalanin, während durch Trypsin-artige Aktivitäten die Hydrolyse nach basischen Resten wie Arginin oder Lysin erfolgt. Durch Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende Aktivitäten können Peptide nach sauren Resten gespalten werden. Diese Spaltmuster sind jedoch nicht absolut festgelegt. Sie hängen in längeren Substraten u.a. von der umgebenden Sequenz ab, so dass Proteasomen Peptidbindungen nach nahezu jeder beliebigen Aminosäure eines Proteins spalten können ¹⁰.

Die für den proteasomalen Abbau bestimmten Proteine werden durch das ubiquitär vorkommende Protein Ubiquitin kenntlich gemacht. Die Kopplung des Ubiquitins an die entsprechenden Proteinsubstrate ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem unter ATP-Verbrauch verschiedene ubiquitin-konjugierende Enzyme (E1, E2, E3 und E4) aktiviert werden ^{13,14}. Die Substratspezifität dieser Enzyme erlaubt hochspezifische Reaktionen, die notwendig sind, um eine koordinierte Degradation zellulärer Proteine zu gewährleisten ¹⁵. Es wurden bereits viele Substrate des proteasomalen Abbaus beschrieben: Falsch gefaltete Proteine des Zytosols werden durch Chaperone der Hsp70-Familie erkannt und können über das Adapterprotein Chip dem Ubiquitin/Proteasom-System zugeführt werden ¹⁶. Fehlerhaft gefaltete oder kurzlebige Proteine des endoplasmatischen Retikulums werden nach Retrotranslokation ins Zytosol ebenfalls über den ubiquitin-proteasomalen Weg abgebaut ¹⁷. Auch die Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren wie p53, c-Jun, c-Fos, NF-κB/ IκB unterliegt der Kontrolle des Ubiquitin/ Proteasom-Systems ¹⁸. Die Zusammenfassung in Tabelle 1 verdeutlicht, dass der proteasomale Abbau von Proteinen einen zentralen Aspekt zellulärer Regulation darstellt.

Tab.1: Proteasomal abgebaute zelluläre Proteine (Auswahl)

Proteinklasse	Protein	Proteinfunktion
Cycline	Cyclin A, B, D, E	Ablauf des Zellzyklus
	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren	Regulation der Cyclin-Aktivität
Tumorsuppressor	p53	Transkriptionsfaktor
Onkogene	c-Fos/c-Jun	Transkriptionsfaktor
	c-myc	Transkriptionsfaktor
	N-myc	Transkriptionsfaktor
Inhibitor-Proteine	IκB	Inhibitor von NF-κB
	p130	Inhibitor von E2F-1
	Cdc25 Phosphatase	CDK1/Cyclin B Phosphatase
	Tyrosin Amino Transferase (TAT)	Tyrosin Metabolismus
	Topoisomerase I	DNA Supercoiling
	Topoisomerase IIα	DNA Supercoiling

1.3 Proteasom und Zellzyklus

Für die Entwicklung vielzelliger Organismen ist die Regulation der Zellteilung von entscheidender Bedeutung. Der Zellzyklus besteht aus zwei Hauptphasen, der S-Phase (Synthesephase) und der M-Phase (Mitose). Die G1-Phase schließt sich bei proliferierenden Zellen an die Mitose an, die G2-Phase folgt der DNA-Synthese und wird durch die Mitose beendet. Die Phasen G1, S und G2 bilden den als Interphase bezeichneten Zeitraum zwischen zwei Mitosen. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen werden vor allem durch heterodimere Proteinkinasen gesteuert, die aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit bestehen. Durch Phosphorylierungsreaktionen an Proteinen, die an der DNA-Synthese und der Mitose beteiligt sind, erfolgt deren Aktivierung oder Inaktivierung. Dabei stellt Cyclin die regulatorische und die cyclinabhängige Kinase die katalytische Untereinheit dar. Die Cycline werden durch Ubiquitin als Substrat für das Proteasom markiert und abgebaut. Der zeitlich regulierte proteasomale Abbau der Cycline und des Anaphase-Inhibitors Securin sind verantwortlich für die Steuerung des Zellzyklus¹⁹.

Die Fähigkeit von Proteasominhibitoren, den proteasomalen Abbau der Cycline zu beeinflussen, damit die Zellproliferation zu inhibieren und selektiv in proliferierenden Zellen Apoptose zu induzieren, macht sie zu attraktiven Kandidaten in der Entwicklung von Medikamenten.

1.4 Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch das Proteasom

Mit dem Synonym Rel- oder NF- κ B-Proteine wird eine Reihe von strukturell ähnlichen Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die im Verlauf der Immunantwort auf virale und bakterielle Erreger, oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine aktiviert werden und damit als wichtige Regulatoren von Immunantwort und Inflammationsprozessen gelten^{20,21}. Dazu zählen RelA (p65), NF- κ B1 (p50; p105), NF- κ B2 (p52; p100), c-Rel und RelB^{22,23}. Die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF α) gelten als die wichtigsten Aktivatoren dieser Transkriptionsfaktoren^{24,25}. Außerdem ist NF- κ B in den zelleigenen Schutz gegen Apoptose involviert, die u. a. durch DNA-Schädigung und Zytokineinfluss hervorgerufen wird. Die am häufigsten vorkommenden Formen von NF- κ B sind entweder ein Homodimer der p50-Untereinheit oder ein Heterodimer der Untereinheiten p50 und p65²⁶.

Im Ruhezustand ist NF- κ B im inaktiven Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B im Zytoplasma lokalisiert. In Regulationsprozesse des NF- κ B-Weges sind die Kinasen IKK α und IKK β involviert. Diese I κ B-Kinasen phosphorylieren das Inhibitorprotein I κ B, I κ B wird ubiquitinyliert und kann anschließend proteasomal abgebaut werden. Nach Abspaltung von I κ B gelangt der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern und aktiviert die Expression bestimmter Gene. NF- κ B ist in der Lage sich an κ B-Bindungsstellen unterschiedlichster Gene anzulagern und Transkriptionsvorgänge zu stimulieren. Unter anderem induziert NF- κ B die Transkription des Gens von I κ B α . Das neu synthetisierte I κ B bewirkt im Zellkern die Abtrennung des NF- κ B Dimers von der DNA und den Rücktransport ins Zytoplasma²⁷. Bisher ist für die Expression von Genen, die für 27 verschiedene Zytokine, Chemokine und Rezeptoren kodieren, eine Aktivierung durch NF- κ B²⁸ beschrieben. Zu diesen gehören auch die Gene proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-8²⁹.

1.5 Chemokine und die Regulation der IL-8-Expression

Chemokine

Im Rahmen der Entzündungsantwort werden pro- und antiinflammatorische Zytokine gebildet, deren Balance für den Entzündungsverlauf entscheidend ist.

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar. Sie verfügen über chemotaktische Aktivitäten und steuern die selektive Migration und Akkumulation von Leukozyten. Darüber hinaus aktivieren diese multifunktionellen Polypeptide bestimmte Zelltypen und induzieren die Produktion weiterer entzündungsrelevanter Zytokine. Sie sind somit wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Kaskade, die die Potenzierung der Entzündungsantwort bewirkt. Chemokine spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von inflammatorischen Prozessen wie Sepsis, entzündlichen Darm- und Lungenerkrankungen und Asthma. Die Eigenschaft von Zytokinen, die Synthese von weiteren Zytokinen zu induzieren, bewirkt eine inflammatorische Kaskade, durch die die Entzündungsantwort weiter potenziert wird.

Chemokine weisen ein Molekulargewicht von 8-11 kDa und große Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur auf. Die Einteilung der Chemokine erfolgt nach der Position der beiden ersten Cysteine (C), die entweder durch eine Aminosäure (X) voneinander getrennt oder direkt benachbart sind: *CXC-Chemokine* (z.B. Interleukin-8 (IL-8) und Epithelial Neutrophil-Activating Protein-78 (ENA-78)) aktivieren neutrophile Granulozyten, während *CC-Chemokine* (z.B. Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) und Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Protein (RANTES)) hauptsächlich auf Monozyten, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten wirken³⁰. Als einziger derzeit bekannter Vertreter der *C-Chemokine* wird Lymphotaktin beschrieben, der auf Lymphozyten chemotaktisch wirkt³¹. Die relativ neu beschriebene Gruppe der *CX₃C-Chemokine* weist drei Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinresten auf und ist membranständig. Fractalkine, Vertreter dieser Familie, wurden auf aktivierten Endothelzellen³² und aktivierten Mikrogliazellen des Gehirns gefunden. Heute sind mehr als 50 Chemokine bekannt, deren molare Masse meist zwischen 7 und 10 kD liegt. Beim Menschen befinden sich die Gene der CXC-Chemokine auf Chromosom 4 und zeigen eine Homologie von 20 bis 50 %, die der CC-Chemokine liegen auf Chromosom 17 mit einer Homologie von 28 bis 45 %.

Die Expression der Chemokine wird in erster Linie auf Transkriptionsebene gesteuert, aber auch posttranskriptionale Mechanismen wie z.B. proteolytische Prozessierungen oder Glykosylierungen werden in der Literatur beschrieben³⁰. Die Promotoren vieler Chemokine u.a. von IL-8, RANTES und MCP-1 haben Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1.

Regulation der IL-8-Expression

Der IL-8-Promotor (Abbildung 2) besitzt zusätzlich zu den Bindungsstellen für NF- κ B noch Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-IL-6 (C/EBP- β), einen Vertreter der C/EBP Familie sowie für AP-1. Für die Regulation der IL-8-Expression sind jedoch nur NF- κ B und AP-1 bedeutend. NF-IL-6 scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen³³⁻³⁵. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ist durch reaktive Sauerstoffmetabolite, H₂O₂, das proinflammatorische Zytokin TNF- α und den RSV (respiratory syncytial virus) stimulierbar. An die AP-1-Bindungsstellen koppeln cFos/JunD Heterodimere, die durch H₂O₂ stimuliert werden. Die Bindungsstellen der einzelnen Transkriptionsfaktoren aktivieren entweder unabhängig voneinander oder gemeinsam die Transkription des IL-8-Gens. Die Bindungsstelle von NF- κ B wird durch mindestens zwei Komplexe aktiviert, die Rel-A, c-Rel bzw. p50 enthalten. Diese Bindung wird durch TNF- α und RSV stimuliert. Die benachbarte Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-IL-6 kooperiert mit der NF- κ B-Bindungsstelle während der TNF- α -Antwort. Die Aktivierung verschiedener induzierbarer Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an den IL-8-Promotor stellt einen Regulationsmechanismus dar, durch den IL-8 zell- und stimuluspezifisch hochreguliert wird.

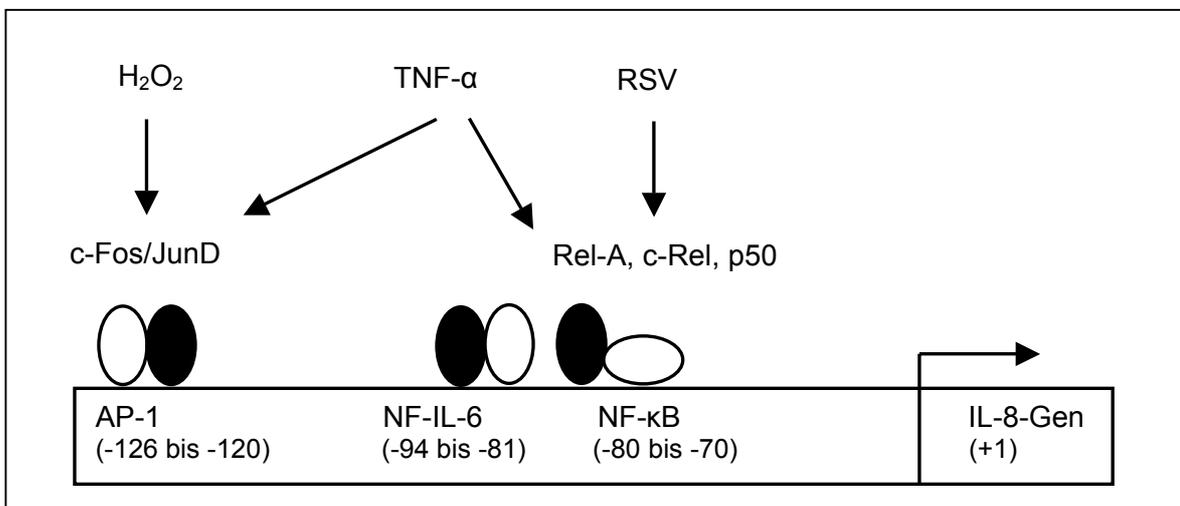


Abb. 2: Regulation des IL-8-Promotors.

Dargestellt sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-IL-6 und NF- κ B auf dem IL-8-Promotor in Bezug zum Transkriptionsstartpunkt des Gens (+1)³⁰.

Das 8,5 kD große IL-8 ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören die Neutrophilenaktivierung, Angiogenese, Histaminausschüttung, Regulation der Adhäsionseigenschaften von Zellen, Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und die Ausschüttung azurophiler Granula. Erhöhte IL-8-Spiegel wurden bei vielen

inflammatorischen Erkrankungen wie Sepsis, Psoriasis, rheumatoider Arthritis, ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome)³⁶ und der zystischen Fibrose beschrieben.

1.6 Einfluss von Zytokinen auf Inflammationsprozesse in der Lunge

Bei verschiedenen Lungenerkrankungen können entzündliche Reaktionen mit unterschiedlichem klinischen Schweregrad beobachtet werden. So wurde die Beteiligung von IL-8 an der Bildung und Manifestierung von Entzündungen der oberen Luftwege beschrieben²⁹.

In der frühen entzündlichen Phase induzieren Mikroorganismen die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Alveolarmakrophagen und Epithelzellen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen. Es folgt der Einstrom inflammatorischer Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, und Lymphozyten. Lokal sezernierte Immunglobuline und Surfactantproteine fungieren als Opsonine und unterstützen die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen, Granulozyten und Monozyten. Der Phagozytoseprozess und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-8 induzieren die Synthese von Lipidmediatoren wie Leukotrien B4 (LTB4) und von Proteasen sowie die Freisetzung toxischer Sauerstoffradikale. Im Verlauf der Entzündung produzieren die in den Bronchoalveolarraum eingewanderten Lymphozyten spezifische Antikörper und tragen damit zur beschleunigten Elimination von Erregern bei. Die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (wie IL-10), die Produktion und Sekretion von Proteaseinhibitoren und die Synthese antiinflammatorischer Lipidmediatoren und des Stickstoffmonoxids begrenzen die lokale Inflammation. Terminiert wird die Entzündung durch die Apoptose neutrophiler Granulozyten und ihre Elimination durch Alveolarmakrophagen.

Besondere Bedeutung für die Regulation der Immunantwort in der Lunge haben Epithelzellen. Sie bilden den Abschluss der Luft/Blut-Schranke zum Alveolarraum. Man unterscheidet Epithelzellen vom Typ I, die in erster Linie den Alveolarraum auskleiden, und vom Typ II, die Surfactant sekretieren und wahrscheinlich als Stammzellen für die Typ I Zellen dienen. Für Lungenepithelzellen ist sowohl die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen als auch von Entzündungsmediatoren³⁷ beschrieben. Die Sekretion von IL-8 wird in diesen Zellen durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β ³⁸, bakterielle Zellwandprodukte³⁹ und Viren^{40,41} induziert. Im Vergleich zu gesunden Patienten wurden in Bronchialepithelzellen⁴² und in Bronchiallavagen⁴³ asthmatischer Patienten erhöhte IL-8-Konzentrationen festgestellt.

In engem Zusammenhang mit dem komplexen Entzündungsgeschehen steht die Tumorgenese. Tumorzellen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren, die auch durch häufig in Tumorgewebe anzutreffende Hypoxie induziert werden. Der durch diese Zytokine induzierte Umbau des Stromas verbessert die Bedingungen für das Tumorwachstum, so wird z.B. die Expression von angiogenen Faktoren wie VEGF (Vascular endothelial growth factor) stimuliert und damit die Blutversorgung verbessert. Entzündungsmediatoren wie IL-8 können direkt als Wachstums- und Überlebensfaktoren auf Tumorzellen einwirken.

Auch Wachstum und Metastasierung von Lungentumoren epithelialen Ursprungs werden nachhaltig durch das Chemokin IL-8 beeinflusst. Besonders hohe IL-8-Konzentrationen wurden in Zelllinien und Patientenmaterial aus squamösen Lungenkarzinomen und Adenokarzinomen nachgewiesen^{44,45}. In unmittelbarer Umgebung des Tumors produziert, beeinflusst IL-8 durch parakrine und autokrine Mechanismen das Tumorwachstum. Mit humanen Lungenkarzinomzellen infizierte SCID Mäuse, die mit IL-8 neutralisierenden Antikörpern behandelt worden waren, zeigten eine 40 %ige Reduktion der Tumorgroße gegenüber den Kontrolltieren⁴⁶.

1.7 Proteasominhibitoren und ihr therapeutischer Einsatz

Der Abbau vieler an der Regulation der Zellzyklusprogression beteiligter Proteine wird durch das Proteasom katalysiert. Deshalb stellt die Inhibierung des Proteasoms einen neuen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, vor allem aber in der Tumorthherapie dar. Auf diesem Gebiet sind in den letzten Jahren große Fortschritte durch die Beschreibung natürlicher und die Herstellung synthetischer Proteasominhibitoren erreicht worden. Die Mehrzahl dieser Inhibitoren blockiert die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms. Durch die Hemmung dieser Aktivitäten wird die Proteindegradation in der Zelle drastisch verringert. Mit dem Einsatz von Inhibitoren der Trypsin- und Peptidyl-Glutamyl-artigen Aktivitäten des Proteasoms konnte dagegen nur eine geringe Reduktion des zellulären Proteinabbaus erreicht werden¹².

Peptidaldehyde

waren die ersten Proteasominhibitoren, die entwickelt wurden und werden bis heute immer noch am häufigsten genutzt⁴⁷. Diese Klasse von reversiblen Inhibitoren gelangt zwar schnell in die Zelle, bindet aber langsam an die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten⁴⁸.

Peptidaldehyde dissoziieren intrazellulär schnell, werden in inaktive Säuren umgewandelt und aus der Zelle transportiert.

Außer den proteasomalen Aktivitäten inhibieren Peptidaldehyde wie z.B.

ALLN (N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal),

MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al),

PSI (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al),

CEP1612

andere Serin- und Cysteinproteasen, unterscheiden sich darin aber in ihrer Selektivität und ihrer inhibitorischen Wirkung. Für das ursprünglich nur als Calpaininhibitor beschriebene ALLN, wurde auch die Inhibierung von Kathepsin B nachgewiesen. MG-132 weist eine höhere Selektivität gegenüber dem Proteasom als gegenüber den proteolytischen Aktivitäten der Calpaine und Kathepsine auf. Für die Inhibierung von Calpainen und Kathepsinen muss die 10fache Konzentrationen des Inhibitors eingesetzt werden ¹².

Peptidboronate

inhibieren die Aktivität des Proteasoms stärker als Aldehyde ⁴⁹ und verbinden sich über das aktivierte Threonin mit dem Proteasom. Die Proteasom- Boronat-Brücken haben geringere Dissoziationskonstanten als die Proteasom-Aldehyd-Brücken. Deshalb besteht die Inhibierung, obwohl Peptidboronate reversible Inhibitoren sind, praktisch für mehrere Stunden. Boronate sind selektiver als Aldehyde und beeinflussen Cystein- und Serinproteasen nur wenig. So inhibiert z. B. PS-341 (Pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-Boronat) das Proteasom 1000fach stärker als Serinproteasen ⁴⁹.

Die Kombination von Selektivität, Hemmpotenzial, Stabilität und geringen Nebenwirkungen dieser Inhibitorklasse führte dazu, dass Peptidboronate in den letzten Jahren sehr gut untersucht wurden. PS-341 (Bortezomib) als Vertreter der Dipeptid-Boronate befindet sich in der Phase II der klinischen Testung für Therapieansätze bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie z. B. dem Nierenzellkarzinom ^{50,51}. Unter dem Namen Velcade® erfolgte für diesen Proteasominhibitor die Zulassung in den USA 2003 und in Europa 2004 für die Indikation des Multiplen Myeloms.

Lactacystin

ist ein Metabolit aus *Streptomyces sp.*, der zunächst keine inhibitorische Aktivität besitzt. Unter neutralen pH-Bedingungen läuft eine spontane Umwandlung zu Clasto-Lactacystin- β -Lacton (im Weiteren β -Lacton) ab, das sich dann an die Threoninbindungsstellen, die die aktiven Zentren des Proteasoms darstellen, anlagern und damit die Aktivität blockieren kann ⁵². β -Lacton ist einer der instabilsten Proteasominhibitoren und wird bei

neutralem pH-Wert hydrolysiert. Er hemmt die Chymotrypsin-artige Aktivität des Proteasoms mit einem K_i -Wert von 8500 nM. β -Lacton inhibiert das Proteasom irreversibel und beeinflusst außer dem Kathepsin A, einer lysosomalen Carboxypeptidase, und der cytosolischen Tripeptidyl Peptidase II die Mehrzahl der Serin- und Cysteinproteasen nicht⁵³. β -Lacton zählt deshalb zu den hoch selektiven Proteasominhibitoren.

Peptid-Vinyl-Sulfone

sind synthetische, irreversible Proteasominhibitoren⁵⁴, die Serinproteasen nicht beeinflussen, aber als Inhibitoren für Cysteinproteasen beschrieben wurden. Der Vorteil dieser Verbindungen ist ihre einfache Synthese. Sie werden oft für Studien zur Strukturanalyse von Proteasomen in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen eingesetzt.

Epoxyketone

sind die selektivsten bekannten Proteasominhibitoren. Vertreter dieser Klasse sind z.B. Epoxymycin und Eponemycin. Die proteasomalen Untereinheiten sind die einzigen zellulären Proteine, die kovalent durch biotinylierte Derivate von Epoxymycin und Epomycin modifiziert werden können¹². Epoxymycin inhibiert die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms mit einem sehr hohen K_i -Wert (37.000 nM), während der Inhibitor Eponemycin und sein synthetisches Analog Dihydroeponemycin auf die Chymotrypsin-artigen und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden Aktivitäten mit niedrigen K_i -Werten von 65 nM bzw. 61 nM wirken¹². Die biotinylierten Derivate von Epoxymycin und Epomycin werden wie Peptid-Vinyl-Sulfone bei funktionellen Untersuchungen von Proteasomen eingesetzt.

Bivalente Inhibitoren

sind durch Polyethylenglykolanker verbundene Peptid-aldehyde, die in ihrem Inhibitorpotential 100fach stärker sind als monovalente Analoga. Ein großes Problem dieser Inhibitoren ist deren geringe Membranpermeabilität⁵⁵.

1.8 Zielstellung

Der therapeutische Einsatz von Proteasominhibitoren bei Tumorerkrankungen und entzündlichen Prozessen gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Da Lungenkarzinome die häufigste tumorassoziierte Todesursache in westlichen Ländern darstellen, sind Untersuchungen zur Wirkung von Proteasominhibitoren auf Lungenkarzinomzellen von großer Relevanz. Diese Untersuchungen sind eng mit dem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Wirkungen von Proteasominhibitoren verbunden.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Wirkung von Proteasominhibitoren auf die Funktion von Lungenkarzinomzellen.

Im Mittelpunkt sollte dabei die Untersuchung des Einflusses der Proteasominhibitoren auf:

- die Proliferation
- die Vitalität
- die Zellzyklusprogression und
- die Chemokinsekretion

der Zellen stehen.

Außerdem sollten die Regulationmechanismen und funktionellen Konsequenzen von Veränderungen der Chemokinsekretion untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Zellkulturarbeiten

2.1.1 Kultivierung der Zellen

2.1.1.1 Epithelzelllinien

Für die Experimente wurden käuflich erworbene Zelllinien der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), der American Type Culture Collection (ATCC) und der Firma Clonetics eingesetzt (Tabelle 2). Die adhärent wachsenden Zelllinien A-549, SK-MES, BEAS-2B, NCI-H727 wurden in Iscove`s modifiziertem Dulbecco`s Medium (IMDM-Medium, Biochrom) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom) und 1 % Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung (AB/AM, Life Technology) bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung kultiviert. Die Zellen wurden bei jeweils 80-90 % Konfluenz dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:4 gesplittet. Nach Verwerfen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit Hank`s-Salz-Lösung (ohne Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom) gewaschen, um Reste des verbrauchten Mediums vollständig zu entfernen. Mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technology) wurden die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von FCS-haltigem IMDM-Medium wurde der Ablöseprozess gestoppt. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei 280 x g für 5 min an. Nach der Resuspendierung mit frischem IMDM-Medium wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen für Funktionsansätze eingesetzt oder zwecks Weiterkultivierung erneut in Kulturflaschen ausgesät.

2.1.1.2 Myeloische Zelllinien

Die Kultivierung der myeloischen Suspensionszelllinien MONO-MAC-6 und THP-1 erfolgte in IMDM-Medium (Gibco) mit 10 % FCS und 1 % AB/AM-Lösung. Die MONO-MAC-6-Zellen erhielten zusätzlich 10 µg/ml Insulin (Sigma). Bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung wurden die Zellen in dreitägigem Rhythmus im Verhältnis 1:2 gesplittet. Dazu wurden sie bei 280 x g zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und für Versuche mit definierter Zellzahl eingesät bzw. weiterkultiviert.

2.1.1.3 Primärzellen

Ergänzend zu den Modellzelllinien erfolgten Experimente mit primären humanen Bronchialepithelzellen. Verwendet wurden die adhärent wachsenden NHBE- und SAEC-Zellen (Clonetics). NHBE-Zellen wurden kultiviert in BEGM-Basalmedium (Clonetics), SAEC-Zellen in SAGM-Medium (Clonetics) jeweils bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung. Die Primärzellen wurden bis zur Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert und dann für Versuche eingesetzt. Das Splitten und Einsäen der Primärzellen erfolgte nach dem bereits bei den Epithelzelllinien beschriebenen Schema.

Tab. 2: Beschreibung der verwendeten Zelllinien und Primärzellen

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
A-549	humane alveolare Lungenepithelzelllinie aus Karzinom	DSMZ
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzelllinie virustransformiert	Prof. A. Gillisen, Robert-Koch- Klinik Leipzig
NCI-H727	humane Bronchialepithelzelllinie aus kleinzelligem Lungenkarzinom	ATCC
SK-MES	humane Lungenepithelzelllinie aus squamösem Zellkarzinom	DSMZ
MONO-MAC-6	Akute-Monozyten-Leukämie-Zelllinie	DSMZ
THP-1	Akute-Monozyten-Leukämie-Zelllinie	DSMZ
SAEC	small airway epithelial cell (humane Alveolarepithelzellen)	Clonetics
NHBE	normal human bronchial epithelial cell (humane Bronchialepithelzellen)	Clonetics

2.1.2 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Ausgangsmaterial zum Einfrieren waren Zellkulturen im Normalmedium. Jeweils 1 bis 2×10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid in FCS) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach mindestens 24 h Einfrierzeit in einem Isopropanol-gefüllten Einfriercontainer (Nalgene™Cryo 1 °C Freezing Container) bei -80 °C erfolgte die Lagerung der Konserven in flüssigem Stickstoff.

Zum Revitalisieren wurde die Zellsuspension bei 37 °C aufgetaut und in Kulturflaschen mit 37 °C temperiertem Basalmedium überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um Reste des zytotoxisch wirkenden DMSO zu entfernen.

2.1.3 Vitalitätsbestimmungen mit Trypanblau

Die Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau (Sigma) durchgeführt. Dieser Farbstoff kann nicht in Zellen mit intakter Zellmembran eindringen und somit wurden nur tote Zellen angefärbt. Zur Bestimmung der Vitalität nach Inkubation mit Proteasominhibitoren (Kap. 2.1.1.1) wurden 20 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an Trypanblau vermischt. Anschließend wurde sofort die Zahl der ungefärbten vitalen sowie der angefärbten geschädigten Zellen durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Über den Mittelwert der ungefärbten Zellen errechnete sich die Lebendzellzahl pro ml wie folgt:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = Z \times F_f \times F_k$$

Z = Lebende Zellen pro Großquadrat
 F_f = Verdünnungsfaktor (2)
 F_k = Kammerfaktor (10000)

Durch das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl wurde die Vitalität der Zellkultur in Prozent ermittelt.

2.1.4 Einsatz von Proteasominhibitoren in Zellfunktionsassays

Zur Untersuchung von Effekten der Proteasominhibitoren auf Zellen wurde eine für den jeweiligen Versuchsansatz definierte Zellzahl in Zellkulturgefäße unterschiedlicher Größe in IMDM-Medium eingesät. Nach 24 h wurde zweimal mit Hank's-Salz-Lösung gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen in serumfreies HAM's F-12-Medium (Biochrom) überführt und folgende Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zugegeben:

ALLN - Calpain-Inhibitor I (N-Acetyl-L-Leucyl-L-Norleucinal)	(Bachem)
MG-132 - Calpain-Inhibitor IV (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)	(Bachem)
Clasto-Lactacystin β -Lacton (Omuralid)	(Calbiochem)
E-64d (L-trans-Epoxysuccinyl-Leu-3-Methylbutylamid-Ethylester)	(Bachem)

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren wurden die Zellen wie nachfolgend beschrieben für die entsprechenden Untersuchungen aufbereitet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen mussten diese zunächst lysiert und homogenisiert werden. Dazu wurde ein stark denaturierender, Guanidinisothiocyanat und Mercaptoethanol enthaltender Puffer, der RNasen sofort inaktiviert, eingesetzt. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bindungsbedingungen hergestellt und die Probe anschließend auf eine Mini-Säule aufgetragen. Die Gesamt-RNA wurde an eine Silikamembran gebunden, während die übrigen Substanzen ausgewaschen und abgetrennt wurden. Die an die Säule gebundene RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert.

In unseren Versuchen wurde der NucleoSpin[®]RNA II Kit (Macherey-Nagel) eingesetzt. Mit Proteasominhibitoren behandelte bzw. unbehandelte Kontrollzellen wurden vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert und das Pellet anschließend mit PBS gewaschen. Das Standardprotokoll des Herstellers wurde für die Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen nicht abgeändert.

2.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte durch eine Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm mit dem Spektrophotometer GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech). Als Referenz diente Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser in einer Quarzküvette, da Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Absorptionsmaximum haben und somit photometrisch quantifiziert werden können. Durch Messung der optischen Dichte

bei 280 nm zu 260 nm wurden Proteinkontaminationen in der RNA-Präparation erfasst. Eine RNA-Präparation mit einem Verhältnis der optischen Dichte von 1,8 bis 2,0 bei 260 nm zu 280 nm gilt als hochrein.

2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Für Genexpressionsstudien wurde die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde ein ursprünglich aus Viren isoliertes Enzym (Reverse Transkriptase) genutzt. Dieses Enzym ist anders als sämtliche Säuger-Polymerasen in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben.

Die reverse Transkription erfolgte mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit von Amersham Pharmacia Biotech, mit dem die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase (RT) aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV) katalysiert wird.

Pro Ansatz wurden 1,5 µg RNA zu einem Volumen von 8 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und 10 min bei 65 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Die Neubildung der RNA-Sekundärstruktur wurde durch Abkühlen auf 4 °C verhindert. Anschließend wurden 1 µl DTT, 1 µl pd(N)₆ Primer (Random-Hexamerprimer binden zufällig an RNA) und 5 µl eines Mixes aus MMLV, RNase-Inhibitor und dNTP's zupipettiert. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C, anschließend 5 min bei 90 °C inkubiert. Als Ergebnis der reversen Transkription entstand ein Doppelstrang aus RNA und cDNA, der in der nachfolgenden PCR-Reaktion als Template für die Polymerisation diente.

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das PCR-Verfahren ist eine *in-vitro* Methode zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz. Dazu wird ein sequenzspezifisches Primerpaar, das hochspezifisch an eine Komplementärsequenz des gesuchten Gens bindet und einen bestimmten Genabschnitt eingrenzt, der zwischen den beiden Primern liegt, von einer DNA-Polymerase verlängert. Durch Wiederholung des Vorgangs werden weitere DNA-Stränge synthetisiert; es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten Genabschnitts. Da zur Vervielfältigung immer wieder die sich neu gebildeten DNA-Stränge durch Erhitzen getrennt werden müssen, benutzt man die DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums, die hitzebeständig ist (*Thermus aquaticus*; Taq-Polymerase). In einem Zyklus der DNA-Synthese werden zuerst Doppelstränge durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt, es erfolgt eine Anlagerung der Primer an ihre komplementäre Sequenz, gefolgt von ihrer Verlängerung durch die DNA-Polymerase, welche die Zielsequenz spezifisch synthetisiert (Denaturierung, Annealing, Elongation).

2.2.5 Herstellung der cDNA-Fragmente von IL-8 und β -Actin für quantitative RT-PCR

Aus A-549-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und nach Bestimmung der Konzentration wurden 1,5 μ g RNA in cDNA revers transkribiert. Mit den entsprechenden Primerpaaren für IL-8 und β -Actin (Tabelle 3) wurde am Cyler PCT-200 (Biozym) eine PCR durchgeführt.

Die Primersynthese erfolgte durch die Firma BioTez Berlin Buch GmbH. Die Amplifikation der PCR-Produkte wurde anschließend in einer Agarosegel-Elektrophorese mit Hilfe eines 100 bp Standards (Promega) überprüft.

Tab. 3: Primersequenzen zur Amplifikation des 291 bp großen IL-8- und 661 bp großen β -Actin-Fragmentes

cDNA-Fragmente	Primersequenzen
IL-8	sense 5' ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG 3' antisense 5' TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT 3'
β -Actin	sense 5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3' antisense 5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG 3'

Für die Klonierung der cDNA-Fragmente wurde der pCR[®]II-TOPO-Vektor aus dem Eukaryoten-TA-Klonierungskit der Firma Invitrogen verwendet. Der Vektor ist linearisiert und hat überhängende 3'-Desoxythymidinreste. Eine Ligation der PCR-Produkte an den Vektor ist möglich, da Taq-DNA-Polymerase an die 3'-Enden von PCR-Produkten Desoxyadenosinreste knüpft. Die wesentlichen Bestandteile des Vektors sind das LacZ α -Gen, der Sp6-Promotor, der ColE1-Replikationsursprung, die Ampicillin/Kanamycin-Resistenzgene sowie die multiple Klonierungsstelle. Es wurden ein IL-8-cDNA-Konstrukt von 291 bp und ein 661 bp großes β -Actin-cDNA-Konstrukt nach Herstellerangaben in den Vektor kloniert.

Die Transformation erfolgte in kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10F', Invitrogen) auf Luria-Bertani-(LB) Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-GAL. Je 10 transformierte Kolonien wurden auf LB-Bouillon mit Ampicillin überimpft. Die Plasmide wurden aus den Bakterienklonen mit Hilfe des Mini-Prep-Kits der Firma Qiagen isoliert. Das Isolationsprinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien durch NaOH/SDS-haltigen

Puffer in Gegenwart von RNase A und der Adsorption der Plasmid-DNA an eine Quarzmembran. Die Plasmidisolierung wurde lt. Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bgl*II, *Pst*I, Amersham Pharmacia Biotech) zur Kontrolle der integrierten cDNA-Fragmente geschnitten. Nach Angaben des Herstellers wurde ein Restriktionsansatz hergestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 0,7 %igen Agarosegel in Tris-Azetat-EDTA-(TAE) Puffer. Zur Größenidentifikation diente der 1 kb-DNA-Standard peQGOLD (PeqLab).

Die Sequenzierung der integrierten cDNA-Fragmente in der eingestellten Konzentration von 200 ng/µl erfolgte durch den Sequenzierservice der Firma GATC.

Die in den Vektor pCR[®]II eingebauten Sequenzen der IL-8-mRNA und der β-Actin-mRNA dienten als Standards für die quantitative RT-PCR.

2.2.6 Amplifikation von IL-8-cDNA durch quantitative RT-PCR

Die Amplifikation der IL-8-cDNA wurde im Light Cycler (Idaho Technology) für das 291 bp große Fragment durchgeführt. Als externer Standard wurde das „housekeeping“-Gen β-Actin, von dem vorausgesetzt wird, dass es in Zellen konstant exprimiert wird, mit einer Fragmentgröße von 661 bp verwendet.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes geht aus Tabelle 4 hervor.

Tab. 4: Stammlösungen, Konzentrationen und Volumina im PCR-Ansatz zur Amplifikation des 291 bp großen IL-8-Fragmentes und des 661 bp großen β-Actin-Fragmentes

Stammlösungen	Konzentrationen/ Volumen im Ansatz	
	IL-8 (291 bp)	β-Actin (661 bp)
SYBR [®] Green	0,4 x	0,4 x
dNTP	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM	3 mM
Taq-DNA-Polymerase	0,4 U	0,4 U
Primer forward (sense)	0,5 pmol/µl	0,5 pmol/µl
Primer reverse (antisense)	0,5 pmol/µl	0,5 pmol/µl
cDNA	2,5 µl	2,5 µl
Aqua dest.	ad 25 µl	ad 25 µl

Die Amplifikation des IL-8- und des β -Actin-Fragmentes wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Je 10 μ l des PCR-Ansatzes wurden in spezielle Reaktionsküvetten (Idaho Technology Inc.) pipettiert und kurz zentrifugiert. Die spezifischen Zyklusbedingungen für die Amplifikation des IL-8- und des β -Actin-Fragmentes sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des 291 bp großen IL-8- und des 661 bp großen β -Actin-Fragmentes

Zyklus	IL-8 (291 bp)	β-Actin (661 bp)
Denaturierung	95 °C, 0 s	95 °C, 0 s
Annealing	64 °C, 3 s	64 °C, 3 s
Elongation	72 °C, 14 s	72 °C, 20 s
Messpunkt	80 °C, 0 s	86 °C, 0 s
	40 Wiederholungen	40 Wiederholungen

In jedem Light Cycler-Lauf wurden 3 bekannte Ausgangskonzentrationen des jeweiligen zu amplifizierenden cDNA-Fragmentes (IL-8 oder β -Actin) zur Erstellung einer internen Standardkurve mitgeführt. Bei diesem als Standard mitgeführten definierten Ausgangsmaterial handelt es sich um Plasmid-DNA mit integriertem IL-8- bzw. β -Actin-Fragment (Kap. 2.2.5). Die Standards wurden auf folgende Konzentrationen eingestellt:

IL-8-Standard 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} μ g/ml

β -Actin-Standard 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} μ g/ml.

Der Farbstoff SYBR[®] Green bindet, unabhängig davon ob es ein spezifisches oder unspezifisches Produkt ist, an jegliche Doppelstrang-DNA. Die PCR-Produkte wurden am Ende der 40 Zyklen über einen Temperaturgradienten von 60 °C bis 95 °C langsam geschmolzen. Das entsprechende PCR-Produkt denaturiert bei seiner spezifischen Schmelztemperatur und setzt dabei die gesamte Menge des in den Doppelstrang interkalierten Farbstoffs SYBR[®] Green frei. Unspezifische Produkte und Primerdimere schmelzen unterhalb dieser spezifischen Schmelztemperaturen und können so detektiert werden. Die Schmelzkurve wurde somit für den Nachweis der Spezifität der amplifizierten Produkte genutzt.

Die IL-8- und β -Actin-Mengen wurden anhand des internen Standards kalkuliert. Nach jedem Light Cycler-Lauf wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese die Produktgrößen überprüft.

2.2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Zum Nachweis und zur Identifizierung von Plasmid-DNA, Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten wurde die Agarosegel-Elektrophorese genutzt. Dazu wurde ein 1,2 %iges Gel aus Agarose (Peq Gold Universal Agarose, Peqlab) und TAE-Puffer hergestellt. Das abgekühlte, verfestigte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit DNA-Proben und einem Größenstandard (100 bp-Standard, Promega) beladen. Die DNA-Proben wurden vorher mit Blau/Orange-6 x-Loading-Puffer (Promega) vermischt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von bis zu 120 V. Anschließend wurde das Gel 5-10 min in 2 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ermöglicht eine Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht. Die Größenidentifikation der DNA-Fragmente konnte durch Vergleich mit den Größenstandards erfolgen.

<u>50 x TAE Puffer (pH 8,0)</u>	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	18,6 g	EDTA
Ad	1000 ml	Aqua dest.

2.2.8 Untersuchung des Einflusses von Proteasominhibitoren auf die RNA-Stabilität nach Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin D

Actinomycin D, ein Streptomyzeten-Antibiotikum, bindet fest und spezifisch an doppelhelikale DNA und hindert sie daran, als Matrize für die RNA-Synthese zu dienen. Bei niedrigen Konzentrationen hemmt Actinomycin D die Transkription, ohne die DNA-Replikation oder die Proteinsynthese merklich zu stören. Actinomycin D wird daher häufig als hochspezifischer Inhibitor der Bildung neuer RNA in Pro- und Eukaryotenzellen verwendet.

In unseren Versuchen wurde ab dem Applikationszeitpunkt von Actinomycin D die Neusynthese von RNA gehemmt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR der spezifische IL-8-mRNA-Gehalt quantifiziert.

Nach 24-stündiger Vorinkubation in einer 6-Well-Platte mit Normalmedium wurden 2×10^6 A-549-Zellen nach beschriebenem Schema in serumfreiem Medium mit den Inhibitoren ALLN (50 µM) und β-Lacton (25 µM) behandelt. Nach 24 h wurde das Stimulationsmedium durch serumfreies Medium ersetzt und 10 µg/ml Actinomycin D (Sigma) zugesetzt. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4 h wurden Zellen abgelöst, pelletiert und die Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin^RRNA II Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

RNA (1 µg) wurde in komplementäre cDNA revers transkribiert und die Amplifikation der IL-8-cDNA erfolgte nach bereits beschriebener Methode. Als Kontrolle dienten mit Actinomycin D behandelte Zellen, die nicht mit Inhibitoren inkubiert wurden. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt der Actinomycin D-Applikation wurde als Nullwert gesetzt.

2.2.9 Ermittlung der IL-8-Neusyntheserate durch *Nuclear runoff*-Analysen

Mit Hilfe von *Nuclear runoff*-Versuchen wurde die Transkriptionsrate eines Gens in einer bestimmten Zeit ermittelt. Dazu wurden isolierte Zellkerne für 30 min mit Nukleotiden inkubiert. Die Menge der in dieser Zeit neusynthetisierten RNA konnte anschließend mit Hilfe der quantitativen RT-PCR im Verhältnis zur β -Actin-RNA ermittelt werden.

Für unsere Versuche wurden A-549-Zellen in Normalmedium eingesät. Nach 24 h wurde das Normalmedium gegen serumfreies Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 µM) und β -Lacton (25 µM) behandelt. Die *Nuclear runoff*-Versuche wurden nach einem Protokoll von Greenberg⁵⁶ durchgeführt.

Materialien für Nuclear runoff-Experimente:

<i>Lysepuffer</i>	10 mM	<i>Tris-HCl, pH 7,4</i>
	10 mM	<i>NaCl</i>
	3 mM	<i>MgCl₂</i>
	<i>autoklavieren</i>	
	0,1 %	<i>NP-40</i>
<i>Aufbewahrungspuffer</i>	50 mM	<i>Tris-HCl, pH 8,3</i>
	40 %	<i>Glycerin</i>
	5 mM	<i>MgCl₂</i>
	0,1 mM	<i>EDTA</i>
<i>Reaktionspuffer</i>	10 mM	<i>Tris-HCl, pH 8,0</i>
	5 mM	<i>MgCl</i>
	0,3 M	<i>KCl</i>
<i>5 mM DTT</i>		
<i>Nukleotide</i>	1 mM	<i>ATP</i>
	1 mM	<i>CTP</i>
	1 mM	<i>GTP</i>
	1 mM	<i>UTP</i>

Zellkernisolierung:

- 20 x 10⁶ A-549-Zellen mit Trypsin ablösen
- 5 min bei 4 °C zentrifugieren (300 x g) und Überstand verwerfen
- Zellpellet in eiskaltem PBS resuspendieren, auf 50 ml auffüllen und abzentrifugieren (4 °C, 300 x g) 2 x
- Zellpellet durch vorsichtiges Vortexen auflockern
- Zellpellet in 4 ml Lysepuffer resuspendieren (während der Pufferzugabe halbmaximal vortexen)
- Lysat 5 min auf Eis inkubieren
- 5 min zentrifugieren bei 4 °C, 300 x g, Überstand verwerfen (Zellkerne befinden sich im Pellet)
- Pellet durch vortexen in 4 ml Lysepuffer resuspendieren
- 5 min zentrifugieren bei 4 °C, 300 x g, Überstand verwerfen
- Zellkerne in 50 µl eiskaltem Aufbewahrungspuffer aufnehmen
- 5 µl Kerne 1:10 in kaltem PBS verdünnen und davon 20 µl mit Trypanblau (Sigma) anfärben, zählen und 10 x 10⁶ Kerne in 100 µl eiskaltem Aufbewahrungspuffer aufnehmen (Lagerung bei -80 °C möglich)

Lichtmikroskopisch wurde die Kernisolation überprüft. Ein Verklumpen der Kerne deutete darauf hin, dass die Kernmembran bei der Isolation beschädigt wurde und DNA austreten konnte. Außerdem musste gewährleistet sein, dass die Kerne frei von zytolasmatischen Strukturen waren, da diese den Eintritt der Nukleotide in den Zellkern verhindern. Nur intakte, zytoplasmafreie Kerne wurden für die Versuche verwendet.

Nuclear runoff-Experimente:

- Zellkerne (in Aufbewahrungspuffer) mit 100 µl Reaktionspuffer versetzen
- DTT (Endkonzentration im Ansatz: 5 mM) und Nukleotide ATP, CTP, GTP, UTP (Endkonzentration im Ansatz: je 1 mM) zugeben
- 30 min bei 30 °C inkubieren und anschließend auf Eis

Im Anschluss an die *Nuclear runoff*-Experimente wurde die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.2.1), die RNA-Konzentration bestimmt (Kap. 2.2.2) und anschließend 2 µg RNA revers transkribiert (Kap. 2.2.3). Durch quantitative RT-PCR am Light Cycler (Kap. 2.2.6) wurde der relative Gehalt an IL-8-mRNA in Bezug auf β-Actin bestimmt und ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (100 %) gesetzt.

2.3 Biochemische und zellbiologische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Micro BCA™ Protein-Assay der Firma Pierce Endogen. Das Prinzip beruht auf einer Cu^{2+} -Bindung an die Peptidbindungen der Proteine und dessen Reduktion zu Cu^+ in alkalischer Umgebung. Dieser Cu^+ -Komplex kann von Bicinchinon detektiert werden. Proportional zur Proteinmenge entsteht dabei ein violettes Reaktionsprodukt, das ein Absorptionsmaximum bei 540-590 nm hat.

In Abhängigkeit von den nachfolgenden Versuchen wurden 1 bis 4×10^6 Zellen bzw. Zellkerne in 0,25 bis 1,0 ml Puffer (0,5 % TritonX-100/PBS, pH 7,2) lysiert und nach 30 min Inkubation auf Eis 5 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Als Standard diente der im Kit enthaltene BSA-Standard (Bovine Serum Albumin, 2 mg/ml). Die Proteinbestimmung erfolgte in 96-Well-Platten, die 2 h bei 37°C lichtgeschützt inkubiert wurden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte am Plattenreader (DYNATEC MR 5000) bei einer Wellenlänge von 570 nm.

2.3.2 Zytokinbestimmungen mittels Enzymimmunoassay

Die Messung der Zytokine IL-8 (Interleukin-8), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), ENA-78 (Epithelial Neutrophil Activating Protein-78) und RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Protein) erfolgte mittels Enzymimmunoassays der Firma R&D Systems (Quantikine). An die Mikrotiter-Strips ist ein zytokinspezifischer Fangantikörper gebunden. Nach Bindung von Standard- bzw. Probenprotein kann ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter polyklonaler Antikörper das gebundene Antigen detektieren. Nach Substratzugabe entsteht ein Farbkomplex, dessen Menge proportional zur gebundenen Antigenmenge ist. Der Farbkomplex wurde bei 450 nm an einem Plattenreader Dynatech MR 5000 quantifiziert sowie auf eine mitgeführte Standardkurve bezogen.

Für die Messung wurden 1×10^5 Zellen/ml in Normalmedium in einer 24-Well-Platte ausgesät, nach 24 h gewaschen und in serumfreiem Medium mit den Inhibitoren inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden Zellkulturüberstände entnommen und 5 min bei $280 \times g$ zentrifugiert, um tote Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen. Die Überstände wurden entweder frisch im Enzymimmunoassay eingesetzt oder bei -20°C bis zur Messung gelagert.

2.3.3 Proliferation

Für Untersuchungen zur Wirkung der Proteasominhibitoren auf die Proliferation von A-549-Zellen wurde die DNA-Syntheserate mit Hilfe des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin erfasst. Dazu wurden 2×10^4 A-549-Zellen/100 μ l Normalmedium/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät.

Nach 24 h wurde serumhaltiges durch serumfreies Medium ersetzt, die entsprechenden Inhibitoren zugefügt und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde [3 H]-Thymidin (Amersham Pharmacia Biotech) in einer Endkonzentration im Ansatz von 0,5 μ Ci/ml [3 H]-Thymidin zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua dest. lysiert und die radioaktiv markierte DNA auf entsprechende Filter gebunden. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillatorflüssigkeit in einem Counter (1450 MicroBeta Trilux, PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg) gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte A-549-Zellen.

2.3.4 Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren mittels Trans-AM-Kit

Für die Untersuchungen zur Regulation der Transkriptionsfaktoren wurde das Trans-AM-System der Firma Active Motif genutzt. Dieser Multiwell-Test auf Enzymimmunoassay-Basis ermöglicht den schnellen quantitativen Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktoren in Zell- bzw. Zellkernextrakten. Grundlage dieses Assays ist eine 96-Well-Platte, die mit einer zweisträngigen Oligonucleotidprobe beschichtet ist. Die Oligonucleotidprobe enthält die Konsensus-Bindungssequenz für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor. Die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors in der entsprechenden Probe bindet und wird mit einem primären anti-Transkriptionsfaktor- und einem sekundären Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten-Antikörper detektiert, der spektrophotometrisch quantifiziert werden kann.

Für die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurden die Untereinheiten p50 und p65 untersucht. Als Positivkontrolle für den Nachweis der NF- κ B-Aktivierung diente die Stimulation mit TNF- α (Boehringer, 100 ng/ml).

Der Transkriptionsfaktor AP-1 kann aus den Untereinheiten c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2, Jun-B, Jun-D und c-Jun zusammengesetzt sein, deren Aktivierung mit dem Trans-AM-System untersucht wurde. Als Positivkontrolle der AP-1-Aktivierung wurden die Zellen mit Phorbolmyristatazetat (PMA, Sigma, 100 ng/ml) stimuliert. Für die Versuchsansätze wurden jeweils 4×10^6 Zellen der Zelllinie A-549 in 75 cm² Zellkulturflaschen eingesät und nach beschriebenenem Schema mit den Proteasominhibitoren behandelt. Für die Untersuchungen zur Regulation der Transkriptionsfaktoren wurde die Inkubationszeit mit

den Inhibitoren auf 2 h verkürzt, da sich nach Literaturangaben^{57,58} und eigenen Vorversuchen zur Zeitkinetik bei 2-stündiger Behandlung ein Optimum bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zeigte. Die Isolation der Zellkerne erfolgte nach dem Protokoll von Schreiber et. al.⁵⁹. Die lysierten Zellkerne wurden aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach Proteinbestimmung wurden $20\text{ }\mu\text{g}$ Kernprotein für den Assay eingesetzt. Die Quantifizierung der aktivierten Transkriptionfaktoren erfolgte innerhalb von 5 min nach Versuchsende bei einer Wellenlänge von 450 nm am Plattenreader (Dynatech MR 5000).

Materialien für Trans-AM-Assays:

<i>Puffer A</i>	<i>1 ml</i>	<i>100 mM HEPES, pH 7,9</i>
	<i>0,1 ml</i>	<i>1 M KCl</i>
	<i>0,1 ml</i>	<i>10 mM EDTA</i>
	<i>0,1 ml</i>	<i>10 mM EGTA</i>
	<i>10 μl</i>	<i>1 M DTT; erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben</i>
	<i>50 μl</i>	<i>PMSF; erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben</i>
	<i>8,64 ml</i>	<i>Aqua dest. steril</i>
<i>Puffer B</i>	<i>2 ml</i>	<i>100 mM HEPES, pH 7,9</i>
	<i>1 ml</i>	<i>4 M KCl</i>
	<i>1 ml</i>	<i>10 mM EDTA</i>
	<i>1 ml</i>	<i>10 mM EGTA</i>
	<i>10 μl</i>	<i>1 M DTT; erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben</i>
	<i>100 μl</i>	<i>PMSF; erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben</i>
	<i>4,89 ml</i>	<i>Aqua dest. steril</i>

Protokoll der Zellkernisolierung:

- Zellen mit Trypsin ablösen
- Zellen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min bei $280 \times g$ zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in 10 ml PBS resuspendieren, 5 min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in 1 ml PBS resuspendieren, in kleines Reaktionsgefäß überführen
- 15 s zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in $400\text{ }\mu\text{l}$ Puffer A vorsichtig resuspendieren, 15 min auf Eis inkubieren
- $25\text{ }\mu\text{l}$ 10 % NP-40 zugeben, 10 s vortexen
- 30 s zentrifugieren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Überstand verwerfen
- Pellet (Kernpellet) in $50\text{ }\mu\text{l}$ Puffer B resuspendieren, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 min schütteln
- zentrifugieren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min und Überstände in neues Reaktionsgefäß überführen, $10\text{ }\mu\text{l}$ Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

2.3.5 Aktivierung der MAP-Kinasen

Da die AP-1-Aktivierung durch MAP-Kinasen beeinflusst wird ⁶⁰, wurden Zellen mit Inhibitoren der MAP-Kinasen vorinkubiert und nachfolgend mit Proteasominhibitoren behandelt. Jeweils 100.000 A-549-Zellen/1ml/Well wurden in einer 24-Well-Platte in serumhaltigem Normalmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte der Wechsel auf serumfreies Medium und die Zellen wurden mit folgenden Inhibitoren der Signaltransduktion vorinkubiert:

MEK1/2-Inhibitor U0129	(Cell Signaling)	Einsatz:	10 µM
p38-Inhibitor SB203580	(Upstate)	Einsatz:	5 µM
JNK-Inhibitor SP600125	(Merck)	Einsatz:	10 µM

Für Kontrollen wurde DMSO eingesetzt. Nach 90 min Vorinkubation mit den MAP-Kinase-Inhibitoren wurden die Proteasominhibitoren ALLN (50 µM) und β -Lacton (25 µM) zugegeben und die Versuchsansätze für weitere 24 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gewonnen, zentrifugiert und die IL-8-Konzentration mittels Enzymimmunoassay bestimmt.

Nach Ablösen der Zellen wurde durch Trypanblaufärbung die Vitalität der Zellen überprüft, um mögliche toxische Effekte der MAP-Kinase-Inhibitoren zu erfassen.

2.3.6 Chemotaxis in Agarose

Um zu untersuchen, ob das nach Proteasominhibitorinkubation von den Zellen vermehrt sekretierte IL-8 funktionelle Aktivität besitzt, wurde die chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten untersucht, da IL-8 als wichtiger chemotaktischer und aktivierender Faktor für neutrophile Zellen gilt. Dazu wurde die von Gerber et. al. ⁶¹ beschriebene modifizierte Agarose-Technik genutzt.

2.3.6.1 Isolation der Granulozyten

Die Isolation der polymorphkernigen Granulozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation von 20 ml heparinisiertem Vollblut über Polymorphprep-Dichtegradientenmedium (PolymorphprepTM) (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway). Nach der Lyse der Erythrozyten mittels Ammoniumchlorid wurde zweimal in PBS gewaschen. Reinheit und Vitalität der Granulozyten betragen zwischen 97-99 %.

2.3.6.2 Chemotaxis

Agarose (0,8 %ig, Agarose Standard EEO) (Serva, Heidelberg) wurde in MEM-Medium bei pH 7,3 angesetzt und mit 2 % Pferdeserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin sowie 20 mM HEPES (Life Technologies GmbH) angereichert. Die Agarose wurde in 60 x 15 mm Zellkulturschalen gegossen. Mit einer stumpf angeschliffenen Kanüle wurden Löcher mit einem Durchmesser von 2,5 mm in die Agarose gestanzt. Pro gestanztem Well wurden 20 µl Suspension der neutrophilen Granulozyten ($2,5 \times 10^7$ Zellen/ml) und in das benachbarte Well 20 µl des chemotaktischen Stimulus bzw. der konditionierten Zellkulturüberstände pipettiert. Die Spontanmigration der Granulozyten wurde im Verhältnis zur Mediumkontrolle ermittelt. Das bakterielle Peptid fMLP in einer Konzentration von 0,4 µM und rekombinantes IL-8 (R&D Systems) in den Konzentrationen 50, 100, 200, 400 ng/ml dienten als Positivkontrollen.

Der IL-8-Gehalt in den Überständen der mit Proteasominhibitoren behandelten A-549- und NCI-H727-Zellen wurde nach bereits beschriebenem Schema mittels Enzymimmunoassay quantifiziert. Jeweils 20 µl Überstand von A-549- bzw. NCI-H727-Zellen wurden für die Versuche verwendet. Die konditionierten Zellkulturüberstände der NCI-H727-Zellen konnten aufgrund ihres hohen IL-8-Gehaltes direkt für den Migrationsassay eingesetzt werden, während die Überstände der A-549-Zellen 10fach konzentriert wurden (Centrex UF-2, MW Cut-Off 3000, Schleicher & Schuell). Die Granulozytenmigration wurde nach 16 bis 18 h Inkubation bei 37 °C als Entfernung zwischen Rand des gestanzten Wells und der Wanderungsfrontlinie der Granulozyten (Abbildung 1) mikroskopisch ausgemessen (BH-2, Olympus, Hamburg). Für die Versuche wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt, d.h. jeweils 4 gestanzte Wells wurden mit den Stimuli befüllt. Der Migrationsindex wurde als Verhältnis der stimulierten gerichteten Wanderung zur Spontanmigration ermittelt.

2.3.6.3 Blockierung der IL-8 stimulierten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Um nachzuweisen, dass es sich bei der Stimulation der chemotaktischen Aktivität der neutrophilen Granulozyten um einen IL-8-spezifischen Effekt handelt, wurde der Versuchsansatz für die Chemotaxis in Agarose mit einem IL-8 neutralisierenden Antikörper wiederholt. NCI-H727-Zellen wurden mit 50 µM ALLN 24 h inkubiert, da diese Zelllinie unter den von uns untersuchten die höchste IL-8-Sekretion zeigte. Die konditionierten Zellkulturüberstände wurden mit einem anti-human-IL-8-Antikörper (R&D Systems, 10 µg/ml) oder einer Maus-IgG_{1κ}-Isotypkontrolle (Pharmingen, 10 µg/ml) 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente 100 ng/ml rekombinantes IL-8 (R&D

Systems). Der Ansatz für die Chemotaxis und die anschließende Versuchsauswertung wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.



Abb. 3 A: Spontanmigration isolierter Granulozyten in Agarose.

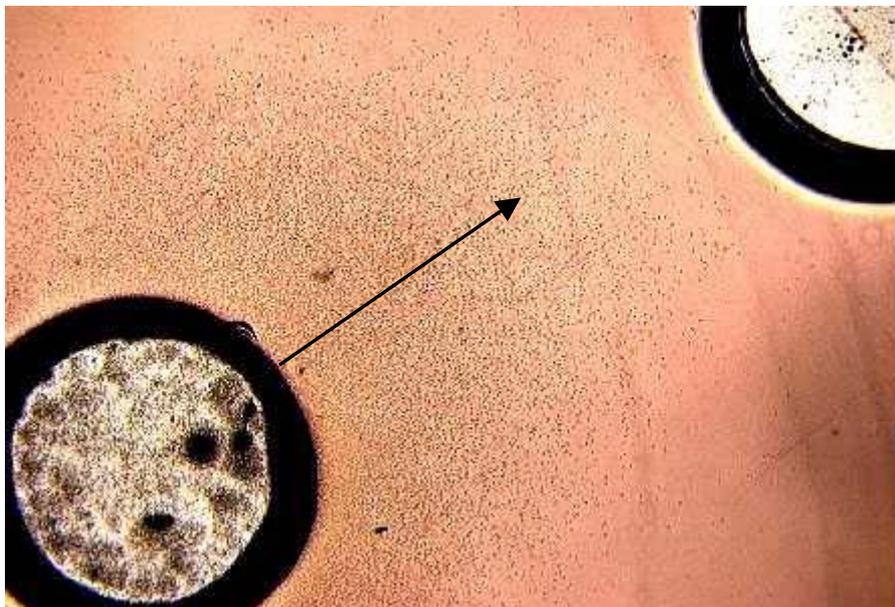


Abb. 3 B: Chemotaxis isolierter Granulozyten in Richtung des chemotaktischen Peptids fMLP.

2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen basierend auf Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, bei der eine simultane Messung mehrerer Zellparameter möglich ist. Diese Messmethode ist für Zellen unterschiedlichster Herkunft: Blutzellen, Zellen aus Körperflüssigkeiten (Liquor, Bronchiallavage), Tumorzellen geeignet. Die entscheidende Voraussetzung ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension (Konzentration etwa 10^6 Zellen/ml).

Das Prinzip beruht auf der Ablenkung eines fokussierten Laserstrahls beim Auftreffen auf die Zelle. Bei der Messung der Lichtstreuung trifft der Laserstrahl auf die zu analysierende Zelle und wird dabei in seiner Richtung verändert. Der größte Teil des Lichtes wird entlang des einfallenden Lichtstrahles in Vorwärtsrichtung gestreut (Vorwärtsstreulicht-FSC). Das Vorwärtstreulicht wird von der Querschnittsfläche beeinflusst und ist ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtstreulicht-SSC stellt das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl streuende Licht dar und hängt im Wesentlichen von der Granularität der Zellen ab.

Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die durch Laserlicht bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, ist es möglich Antigene, Nukleinsäuren oder intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge nachzuweisen. Die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ermöglicht die simultane Erfassung mehrerer Zellparameter, z.B. mehrerer Oberflächenantigene, Kombinationen von Zellzyklusparametern und Oberflächenantigenen oder die sichere Diskriminierung toter und lebender Zellen bei gleichzeitiger Analyse der Oberflächenmarker.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse ist in Ein- oder Zweiparameterdarstellung möglich.

2.4.1 Vitalitätsbestimmung mit Propidiumiodid

Propidiumiodid als stark basischer Farbstoff dringt bei defekten Zellmembranen gut in den sauren Zellkern ein. Es interkaliert in die helikale Struktur der DNA und kann, durch den Argon-Laserstrahl des Zytometers mit 488 nm angeregt, zur Emission bei ca. 690 nm gebracht werden. Fluoreszierende Zellen werden somit als nicht vital erfasst.

Für unsere Versuche wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit der Proteasominhibitoren abgelöst, gezählt und pelletiert. Danach wurden die Zellen in frisch hergestelltem Waschpuffer gewaschen und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Zellkonzentration wurde anschließend im Puffer auf 1×10^7 /ml eingestellt. Jeweils 100 μ l Zellsuspension wurde in spezielle Polysteren-Röhrchen (BD Biosciences) aliquotiert, das entspricht 1×10^6 Zellen. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes

wurde das Zellpellet in 200 µl der Propidiumiodid-Färbelösung und 300 µl PBS aufgenommen. Nach 20 min lichtgeschützter Inkubation bei 4 °C erfolgte die Messung am FACSCalibur (Becton Dickinson). Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit der Software Cellquest Pro.

Zur Auswertung wurde die Vitalität der unbehandelten Kontrollzellen mit der Vitalität der inhibitorbehandelten Zellen verglichen.

Materialien für Vitalitätsuntersuchungen:

Waschpuffer: PBS + 1% FCS (hitzeinaktiviert); pH 7,1-7,4 frisch herstellen

Propidiumiodid-Färbelösung: Propidiumiodid 10 µg/ml + 0,1% RNase in PBS

2.4.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten in vitalen Zellen

Zur Analyse der Proteaseaktivitäten in vitalen Zellen wurde die von Rothe und Valet⁶² beschriebene Methode unter Verwendung spezieller fluorogener Substrate eingesetzt. Die für durchflusszytometrische Untersuchungen eingesetzten Proteasesubstrate bestehen aus einer für das Enzym spezifischen Erkennungsregion und einer fluorogenen Gruppe, die nach enzymatischer Hydrolyse freigesetzt wird und aufgrund ihrer fluoreszierenden Eigenschaften am Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann. Die von uns verwendeten Substrate waren an das Rhodamin 110-Molekül gekoppelt, das nach Assfalg-Machleidt et. al.⁶³ schnell in intakte Zellen penetriert, wo es eine stabile Fluoreszenz gewährleistet.

Folgende Substrate (Molecular Probes) fanden Anwendung:

1. Nachweis der Trypsin-artigen Aktivitäten durch bis-(CBZ-L-Isoleucyl-L-Prolyl-L-Arginin Amid)-Rhodamin 110, Dihydrochloridsalz (CBZ-Ile-Pro-Arg)₂-R110
2. Nachweis der Chymotrypsin-artigen Aktivitäten mit bis-(Succinoyl-L-Alanyl-L-Prolyl-L-Phenylalanyl Amid)-Rhodamin 110, (Sc-Ala-Ala-Pro-Phe)₂-R110
3. Nachweis der Aktivität der Cysteinproteinasen mittels bis-(CBZ-L-Phenylalanyl-L-Arginin Amid)-Rhodamin 110, Dihydrochloridsalz (CBZ-Phe-Arg)₂-R110

Für enzymatische Untersuchungen wurden A-549-Zellen 48 h in Normalmedium kultiviert, mit Trypsin abgelöst und eine Zellsuspension von 5 x 10⁶ Zellen/ml in HBS (*Hepes Buffered Saline*) eingestellt. Es wurden 250 µl dieser Zellsuspension mit 5 µl der

Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d in einer Konzentration von 50 μM und β -Lacton 25 μM 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Erfassung der Trypsin- und Chymotrypsin-artigen Aktivitäten wurde anschließend mit 5 μl der Substrate (CBZ-Ile-Pro-Arg)₂-R110 und (Sc-Ala-Ala-Pro-Phe)₂-R110 in einer Endkonzentration von 10 μM 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Versuchsansatz wurde mit dem Substrat für Cysteinproteinasen (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 mit gleicher Konzentration 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach der Inkubation durch schnelles Abkühlen auf 0 °C abgestoppt. Die Zellen wurden 5 min mit 1 μl Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ im Dunkeln gefärbt, um tote und lebende Zellen während der Messung am Durchflusszytometer voneinander zu trennen. Die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch die verwendeten Inhibitoren wurde an den vitalen Zellen am FACS Calibur bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm analysiert. In der Auswertung wurde die Enzymaktivität der stimulierten Zellen mit der Enzymaktivität der unstimulierten Kontrollzellen prozentual verrechnet.

2.4.3 Zellzyklusuntersuchungen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, quantitativ Aussagen bezüglich des DNA-Gehaltes der Zellen zu machen und dabei indirekt auf den Anteil der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus zu schließen. Der stark basische Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kann gut in den Zellkern eindringen und lagert sich in die helikale Struktur der DNA ein. Der Farbstoff wird durch den Laserstrahl des Zytometers angeregt und zur Fluoreszenz gebracht. Die Menge der DNA zeigt, in welcher Zellzyklusphase sich die Zelle befindet.

Die von uns verwendeten A-549-Zellen wurden nach den Stimulationsversuchen gezählt und pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Waschpuffer resuspendiert und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Eiskaltes 70 % Ethanol (10 ml) wurde unter ständigem Schütteln auf das Pellet getropft. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen war auch eine Lagerung der Proben bis zu 30 Tagen möglich. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 200 x g) wurde mit Puffer gewaschen, zentrifugiert und mit 5 ml Permeabilisierungspuffer 5 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Waschen, Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurde eine Zellkonzentration von $1 \times 10^7/\text{ml}$ in Waschpuffer eingestellt. In Polystyren-Röhrchen wurden 100 μl Zellsuspension (1×10^6 Zellen) aliquotiert, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 200 μl Propidiumiodid-Färbelösung und 300 μl PBS resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die

durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb von 4 h an einem FACSCalibur mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm. Die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgte mittels DNA-Auswerteprogramm Mod Fit LT™.

Materialien für Zellzyklusuntersuchungen:

Waschpuffer	PBS + 1% FCS (hitzeinaktiviert) pH 7,1-7,4; frisch herstellen
Permeabilisierungspuffer	Waschpuffer + 0,25 % Triton X-100
Propidiumiodid-Färbelösung	Propidiumiodid 10 µg/ml + 0,1% RNase in PBS

2.4.4 Cyclin B- und D-Bestimmung

Cycline als regulatorische Untereinheiten der cyclinabhängigen Kinasen werden im Zellzyklus phasenspezifisch akkumuliert und danach proteasomal abgebaut. Untersucht wurde der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Expression von Cyclin D (Anfangsphase des Zellzyklus (G0/G1)) und auf ein „spätes“ Cyclin (G2/M), Cyclin B. Die Expression beider Cycline überlagert sich innerhalb der einzelnen Phasen des Zellzyklus nicht und kann über FITC-markierte Antikörper am FACS analysiert werden. Verwendet wurden Antikörper der Firma Pharmingen :

FITC-konjugierter, monoklonaler Maus-anti-human-Cyclin D1-Antikörper

FITC-konjugierter, monoklonaler Maus-anti-human-Cyclin B1-Antikörper

FITC-konjugierte, monoklonale Maus-IgG1-Isotypkontrolle.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte bis zur Aliquotierung von 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen parallel zur durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse. Anschließend wurde die Zellsuspension mit je 20 µl der Antikörper oder der Isotypkontrolle für 30 min lichtgeschützt inkubiert, mit 2 ml Waschpuffer (Kap. 2.4.3) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspendierung des Pellets in 500 µl Fixativ (1 % Paraformaldehyd in PBS) erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Enzymaktivität des Proteasoms

3.1.1 Beeinflussung der Chymotrypsinaktivität

Dem multikatalytischen Enzymkomplex Proteasom, der hauptsächlich für die Proteolyse im Zytosol verantwortlich ist, werden momentan drei katalytische Aktivitäten zugeschrieben: die Chymotrypsin-artigen, die Trypsin-artigen und die Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden Aktivitäten. Die Mehrzahl der bisher beschriebenen natürlichen und synthetisch hergestellten Inhibitoren blockiert die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms wesentlich stärker als die Trypsin- und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden Aktivitäten. Nach Hemmung der Trypsin- und Peptidyl-Glutamyl-artigen Aktivitäten war nur eine geringe Reduktion des zellulären Proteinabbaus nachweisbar¹². Zur Charakterisierung der Chymotrypsin-artigen und Trypsin-artigen Aktivitäten sind Rhodamin-gekoppelte Substrate kommerziell erhältlich, mit deren Hilfe durchflusszytometrisch die Aktivität in vitalen Zellen untersucht werden kann.

Zum Nachweis der Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms und der möglichen Beeinflussung durch die verwendeten Inhibitoren nutzten wir das Substrat (SC-Ala-Ala-Pro-Phe)₂-R110 in einer Konzentration von 10 µM. Wie Abbildung 4 A zeigt, kam es nach Inhibierung des Proteasoms zu einer drastischen Abnahme der Chymotrypsin-artigen Aktivität in A-549-Zellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG-132 (50 µM) eine Restaktivität des Chymotrypsins von 41 % messbar. Die Inkubation mit ALLN (50 µM) führte zur Abnahme der Chymotrypsin-artigen Aktivität auf 37 % des Ausgangswertes. Die stärkste Beeinflussung der Chymotrypsin-artigen Aktivität zeigte sich nach Behandlung mit dem selektiven Proteasominhibitor β-Lacton (25 µM). Die Aktivität sank auf 25 % des Kontrollniveaus. Die Inhibierung der Cysteinproteinasen durch E-64d bewirkte eine Abnahme der Chymotrypsin-artigen Aktivität auf 71 % des Kontrollwertes. Unspezifische Reaktionen des Substrates könnten der Grund für die Hemmung der Chymotrypsin-artigen Aktivität durch E-64d sein. Am Beispiel eines repräsentativen Versuchs sind in Abbildung 4 B die Histogramme der Rhodamin-110 vermittelten Fluoreszenzintensitäten nach Inhibierung der Chymotrypsin-artigen Aktivitäten dargestellt.

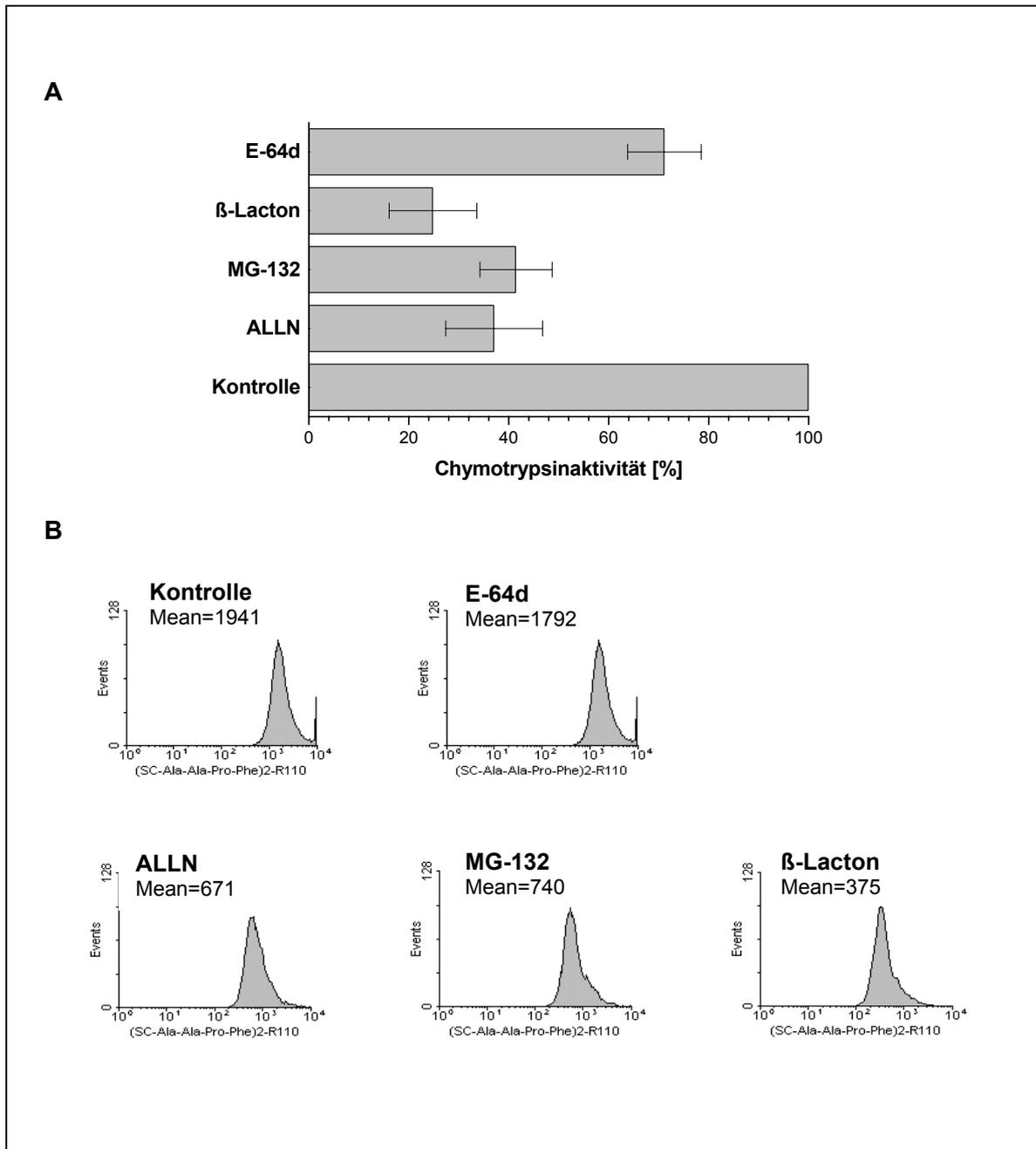


Abb. 4: Chymotrypsin-artige Aktivität in vitalen Zellen der Zelllinie A-549 unter dem Einfluss von Proteasominhibitoren.

Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und E-64d 50 μ M inkubiert und die Chymotrypsin-artige Aktivität mit dem Substrat (SC-Ala-Ala-Pro-Phe)₂-R110 (10 μ M) am Durchflusszytometer gemessen. Abb. 4 A stellt die Zusammenfassung von 4 unabhängigen Versuchen (Mittelwerte \pm SEM) dar. Dabei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle 100 % gesetzt. Die Histogramme in Abb. 4 B zeigen gemessene Fluoreszenzintensitäten (im Bereich FL1, 515-545nm) eines repräsentativen Versuchs.

3.1.2 Beeinflussung der Trypsin-artigen Aktivität

Ein analoger Versuchsansatz wurde für die Messung der Trypsin-artigen Aktivität verwendet. Als Substrat diente dabei bis-(CBZ-L-Isoleucyl-L-Prolyl-L-Arginin Amide)-Rhodamin 110, Dihydrochloridsalz. Für die enzymatischen Untersuchungen wurden A-549-Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml verwendet. Die Inhibitoren ALLN, MG-132, β -Lacton, E-64d wurden in den Konzentrationen 50 μ M und β -Lacton 25 μ M eingesetzt und jeweils für 1 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Substrat in einer Konzentration von 10 μ M für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgende Propidiumiodidfärbung diente der Markierung der toten Zellen, bevor die Messung durchflusszytometrisch an einem FACSCalibur erfolgte. Die mittlere Fluoreszenzintensität der stimulierten Proben wurde relativ zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Abbildung 5 A zeigt, dass sämtliche verwendeten Inhibitoren zu einer Suppression der Trypsin-artigen Aktivität des Proteasoms führten. Nach Inkubation mit ALLN war eine Trypsinrestaktivität von 91 %, nach Inkubation mit β -Lacton von 79 % und nach Inkubation mit E-64d von 67 % messbar. Die stärkste Inhibierung der Trypsin-artigen Aktivität des Proteasoms wurde nach Behandlung der Zellen mit MG-132 (57 % Restaktivität) erreicht. Die entsprechenden Histogramme eines ausgewählten Versuchs sind in Abbildung 5 B grafisch dargestellt.

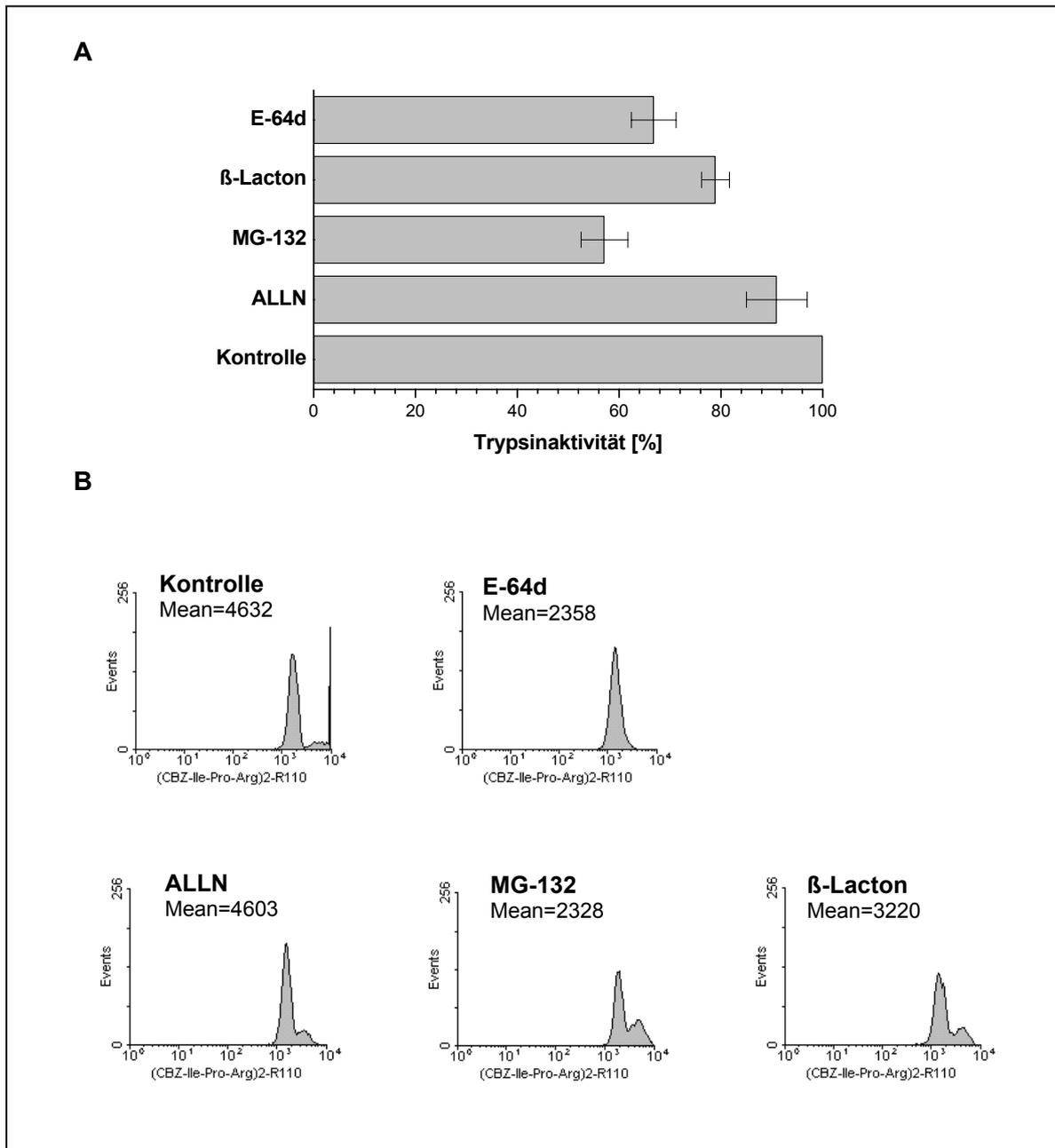


Abb. 5: Trypsin-artige Aktivität in vitalen Zellen der Zelllinie A-549 nach Behandlung mit Proteasominhibitoren.

Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und E-64d (50 μ M) inkubiert. Die Trypsin-artige Aktivität wurde mit dem Substrat (CBZ-Ile-Pro-Arg)₂-R110 (BZI PAR, 10 μ M) am Durchflusszytometer gemessen. In Abb. 5 A sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen \pm SEM dargestellt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Abb. 5 B zeigt am Beispiel eines repräsentativen Versuchs Histogramme der Fluoreszenzintensitäten, die im Bereich FL1 (515-545nm) gemessen wurden.

3.1.3 Beeinflussung der Aktivität von Cysteinproteinasen

Neben der Proteolyse im Zytosol und im Extrazellulärraum enthält besonders das endosomal/lysomale Kompartiment eine Reihe proteolytischer Enzyme, die für einen vollständigen oder limitierten Abbau von Proteinen verantwortlich sind. Schätzungsweise 90 % aller langlebigen Proteine werden in diesem Kompartiment, dem vor allem Cystein- und Serinproteinasen zugeordnet werden, proteolytisch gespalten. Um zu untersuchen, ob die verwendeten Inhibitoren die Proteolyse in den Lysosomen beeinflussen, wurde deren Einfluss auf die Aktivität der Cysteinproteinasen ermittelt.

Nach dem bereits beschriebenen Versuchsschema wurde die Enzymaktivität der Cysteinproteinasen mit dem Substrat bis-(CBZ-L-Phenylalanyl-L-Arginine Amid)-Rhodamin 110, Dihydrochloridsalz (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 (10 µM) in vitalen A-549-Zellen bestimmt. Nach anschließender Färbung mit Propidiumiodid erfolgte der Ausschluss toter Zellen am Durchflusszytometer. Nach Inhibierung mit ALLN (50 µM), MG-132 (50 µM) und dem Inhibitor für Cysteinproteinasen E-64d (50 µM) wurde eine fast vollständige Hemmung der proteolytischen Aktivität der Cysteinproteinasen (3 % Restaktivität) erreicht. Mit dem als selektiver Proteasominhibitor beschriebenen β-Lacton (25 µM) war noch eine Restaktivität von 47 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6 A) nachweisbar. Abbildung 6 B zeigt anhand eines repräsentativen Versuches die entsprechenden Histogramme der Rhodamin-110 vermittelten Fluoreszenzintensitäten.

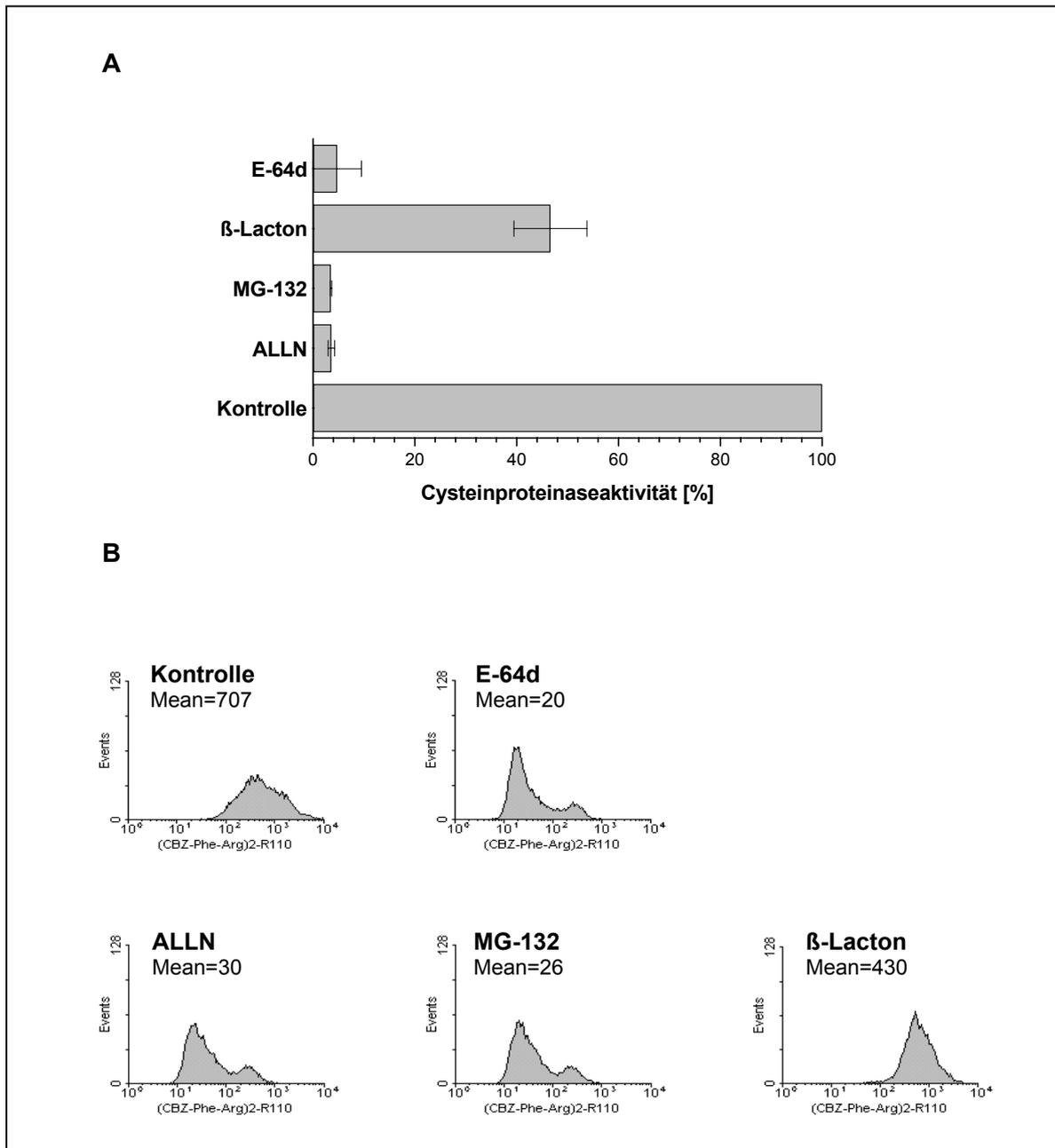


Abb. 6: Aktivität von Cysteinproteinasen in vitalen Zellen der Linie A-549.

Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und E-64d 50 μ M inkubiert. Die Cysteinproteinasaktivität wurde mit dem Substrat (CBZ-Phe-Arg)₂-R110 (10 μ M) am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind in Abb. 6 A die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen \pm SEM. Die mittlere Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Abb 6 B zeigt Histogramme der im Bereich FL1 (515-545nm) gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Grafisch dargestellt ist ein repräsentativer aus 3 unabhängigen Einzelversuchen.

3.2 Einfluss der Proteasominhibitoren auf das Proliferationsverhalten der humanen Lungenepithelzelllinie A-549

Das proteasomale System ist für den Abbau zahlreicher Proteine, die die Progression des Zellzyklus beeinflussen, verantwortlich. Da in weiteren Experimenten der Einfluss von Proteasominhibitoren auf den Zellzyklus in A-549-Zellen ermittelt werden sollte, wurde zunächst das Proliferationsverhalten dieser Zellen nach Inkubation mit Proteasominhibitoren untersucht. Anhand der speziell für die unterschiedlichen Inhibitoren gemessenen Proliferationshemmung sollte eine effektive Inhibitorkonzentration für die weiteren Versuche ermittelt werden. Dazu wurde die Proliferation der Zellen mittels [³H]-Thymidineinbau in die DNA erfasst.

Die verwendeten Proteasominhibitoren führten zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proliferationsrate. Nach Inkubation mit 50 µM ALLN wurde noch eine Proliferationsrate von 10 % gemessen, während nach Behandlung mit MG-132 noch 25 % der ursprünglichen DNA-Synthese nachweisbar waren. Gegenüber dem Ausgangswert führte die Inkubation mit β-Lacton bereits bei einer Konzentration von 25 µM zu einer Proliferationshemmung auf 5 % des Kontrollniveaus. Für nachfolgende Versuche wurden die Inhibitoren in Konzentrationen eingesetzt, bei denen sich eine deutliche Proliferationshemmung gegenüber den Kontrollzellen zeigte. Der Cysteinproteinaseinhibitor E-64d beeinflusste das Proliferationsverhalten der A-549-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (100 %) nicht. Dieser Inhibitor wurde in weiteren Versuchen 50 µM eingesetzt, da bei dieser Konzentration eine signifikante Inhibierung der Aktivität der Cysteinproteinasen (Restaktivität von 3 %) nachweisbar war. Für weiterführende Versuche wurden folgende Inhibitor-Konzentrationen verwendet:

E-64d	-	50 µM
ALLN	-	50 µM
MG-132	-	50 µM
β-Lacton	-	25 µM

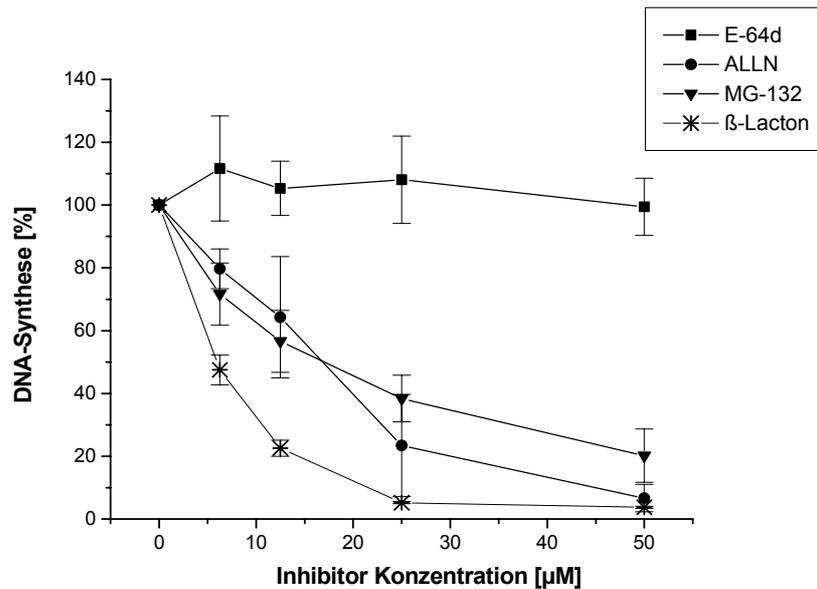


Abb. 7: Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Zelllinie A-549 durch Proteasominhibitoren.

Die Zellen wurden 24 h nach der Einsaat für weitere 24 h mit folgenden Inhibitoren inkubiert: ALLN, MG-132, β-Lacton und E-64d. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM und 50 µM eingesetzt. Als Maß für die Proliferation wurde die DNA-Syntheserate anhand des Einbaus von [³H]-Thymidin in die DNA bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen (Mittelwerte ± SEM).

3.3 Vitalitätsuntersuchungen nach Behandlung der Zelllinie A-549 mit Proteasominhibitoren

Um toxische Einflüsse der Inhibitoren als Ursache für die beobachtete Hemmung der DNA-Synthese auf die verwendeten Zelllinien auszuschließen, wurden zwei unterschiedliche Vitalitätstests eingesetzt.

3.3.1 Vitalitätsprüfung unter Verwendung von Trypanblau

Da der Farbstoff Trypanblau nur bei Beschädigung der Zellmembran in das Zellinnere gelangt, werden nur tote oder schwer geschädigte Zellen angefärbt. Nach 24 h Inkubation mit den Inhibitoren wurden Zellen der Linie A-549 aus der Zellkultur mit Trypsin abgelöst und der Anteil lebender Zellen mikroskopisch bestimmt. Die Ergebnisse aus Tabelle 6 Spalte 1 zeigen, dass in unseren Versuchen die Proteasom- und Cysteinproteinase-inhibitoren keinen zytotoxischen Einfluss auf die verwendeten Zelllinien hatten. Die

Vitalitätsraten der unbehandelten Kontrolle und der Proben, die mit Inhibitoren inkubiert wurden, unterschieden sich nicht und lagen bei 97 % - 98 %.

3.3.2 Durchflusszytometrische Vitalitätstestung mit Propidiumiodid

Als weitere Möglichkeit zur Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen mit Propidiumiodid markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kann nur durch die defekte Zellmembran in die Zellen eindringen. Am Durchflusszytometer konnten tote Zellen anhand des erhöhten Fluoreszenzsignals nach Aufnahme des Farbstoffs von vitalen Zellen abgegrenzt werden. Aus Tabelle 6 Spalte 2 ist ersichtlich, dass die Vitalität der Zellen, die mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μM), MG-132 (50 μM), β -Lacton (25 μM) bzw. dem Cysteinproteinaseinhibitor E-64d (50 μM) inkubiert wurden, nicht beeinflusst wurde.

Beide Methoden führten zu analogen Ergebnissen bei der Vitalitätsermittlung.

Tab. 6: Vitalitätsbestimmung von A-549-Zellen zur Überprüfung der Toxizität der verwendeten Inhibitoren mittels Trypanblau- und Propidiumiodidfärbung

	% lebende Zellen	
	1. Trypanblau	2. Propidiumiodid
Kontrolle	97,3 \pm 0,4	98,1 \pm 0,8
ALLN (50 μM)	97,9 \pm 1,5	96,9 \pm 0,3
MG-132 (50 μM)	98,6 \pm 0,9	95,4 \pm 0,9
β -Lacton (25 μM)	98,1 \pm 0,9	94,9 \pm 1,8
E-64d (50 μM)	98,8 \pm 0,8	96,6 \pm 0,2

3.4 Einfluss der Proteasominhibitoren auf den Zellzyklus

3.4.1 Anteil der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen nach Hemmung des Proteasoms

Das Durchlaufen des Zellzyklus erfordert den Proteasom-gesteuerten Abbau regulatorischer Proteine, z.B. der Cycline, cyclinabhängiger Kinaseinhibitoren und der Anaphase-Inhibitorproteine. Einzelne Zellzyklusphasen können anhand des DNA-Gehaltes der Zellen durchflusszytometrisch unterschieden werden. Die G0/G1-Phase wird

auch als Ruhephase im Zellzyklus bezeichnet. In dieser Phase liegt ein normaler diploider Chromosomensatz vor. Nach Färbung mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff zeigen entsprechende Zellen ein klar definiertes Fluoreszenzsignal. In der folgenden S-Phase (DNA-Replikation) findet eine Verdopplung des DNA-Gehaltes statt und die messbare Fluoreszenzintensität in entsprechenden Zellen nimmt zu. In der G2/M-Phase befinden sich die Zellen kurz vor der Teilung in zwei Tochterzellen und enthalten einen tetraploiden Chromosomensatz, der durch eine im Vergleich zur G0/G1-Phase verdoppelte Fluoreszenzintensität gekennzeichnet ist.

Um den Einfluss der Proteasominhibitoren auf den Zellzyklus untersuchen zu können, wurden die Zellen zunächst mit Ethanol fixiert, permeabilisiert und anschließend mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid markiert.

Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen nach Inhibierung des Proteasoms mit ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und nach Inhibierung der Cysteinproteinasen durch E-64d (50 μ M). Bei allen verwendeten Proteasominhibitoren zeigte sich eine Anreicherung von Zellen in der G2/M-Phase im Vergleich zur Kontrolle. Die größte Verschiebung der prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde nach Inkubation der Zellen mit dem selektiven Proteasominhibitor β -Lacton beobachtet. Die Inhibierung der Cysteinproteinaseaktivität bewirkte keine Veränderung der Zellzyklusverteilung.

Abbildung 9 zeigt vergleichend die Analysen des DNA-Gehaltes von unbehandelten A-549-Kontrollzellen und von A549-Zellen, die 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und E-64d (50 μ M) inkubiert wurden. Dargestellt sind die Histogramme der Propidiumiodid-vermittelten Fluoreszenzintensitäten eines repräsentativen Versuches. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zum DNA-Gehalt jeder Einzelzelle.

Die unbehandelte Kontrolle stellt das Normalbild der Verteilung der Zellen während des Zellzyklus dar. Der prozentual höchste Anteil von Zellen in unseren Versuchen befindet sich in der G0/G1-Phase (71 %), während in der nachfolgenden S- bzw. G2/M-Phase 20 % bzw. 9 % der Zellen zu sehen sind. Eine ähnliche Verteilung der Zellzyklusphasen zeigte sich nach Behandlung mit E-64d. Unter Einfluss der Proteasominhibitors ALLN verringerte sich der Anteil der Zellen, die sich in der G0/G1-Phase befinden (49 %) zugunsten der G2/M-Phase (17 %). Die Inhibierung des Proteasoms durch MG-132 bewirkte in der untersuchten Lungenepithelzelllinie A-549 eine deutliche Verschiebung des relativen Anteils von Zellen aus der G0/G1-Phase (49 %) in die G2/M-Phase (27 %). Der deutlichste Effekt war unter Einfluss des selektiven Proteasominhibitors β -Lacton sichtbar. Das Histogramm zeigt, dass nur noch 43 % der Zellen der G0/G1-Phase

zuzuordnen waren, während sich 25 % in der die S-Phase und 32 % in der G2/M-Phase befanden.

Insgesamt bewirkte die Inkubation der Zellen mit den Proteasominhibitoren eine Akkumulation von Zellen, die sich in der G2-Phase befanden.

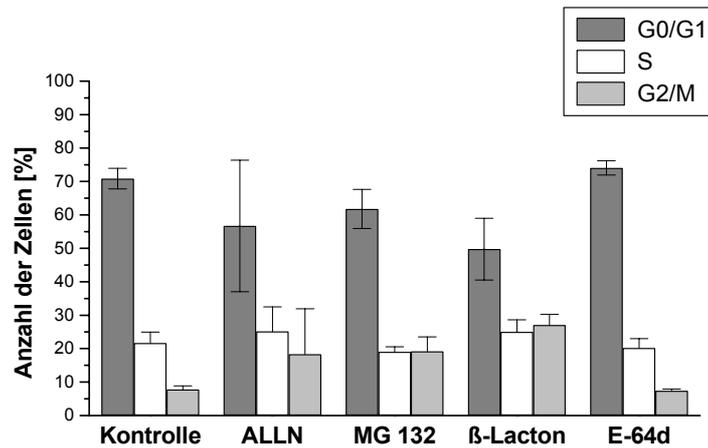


Abb. 8: Verteilung von A-549-Zellen auf Phasen des Zellzyklus.

Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG 132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) und E-64d (50 μ M) inkubiert. Durch Ethanolfixierung wurden die Zellen permeabilisiert und die DNA mit einer Propidiumiodidlösung angefärbt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfolgte mit dem Auswerteprogramm Mod Fit LT™. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen \pm SEM.

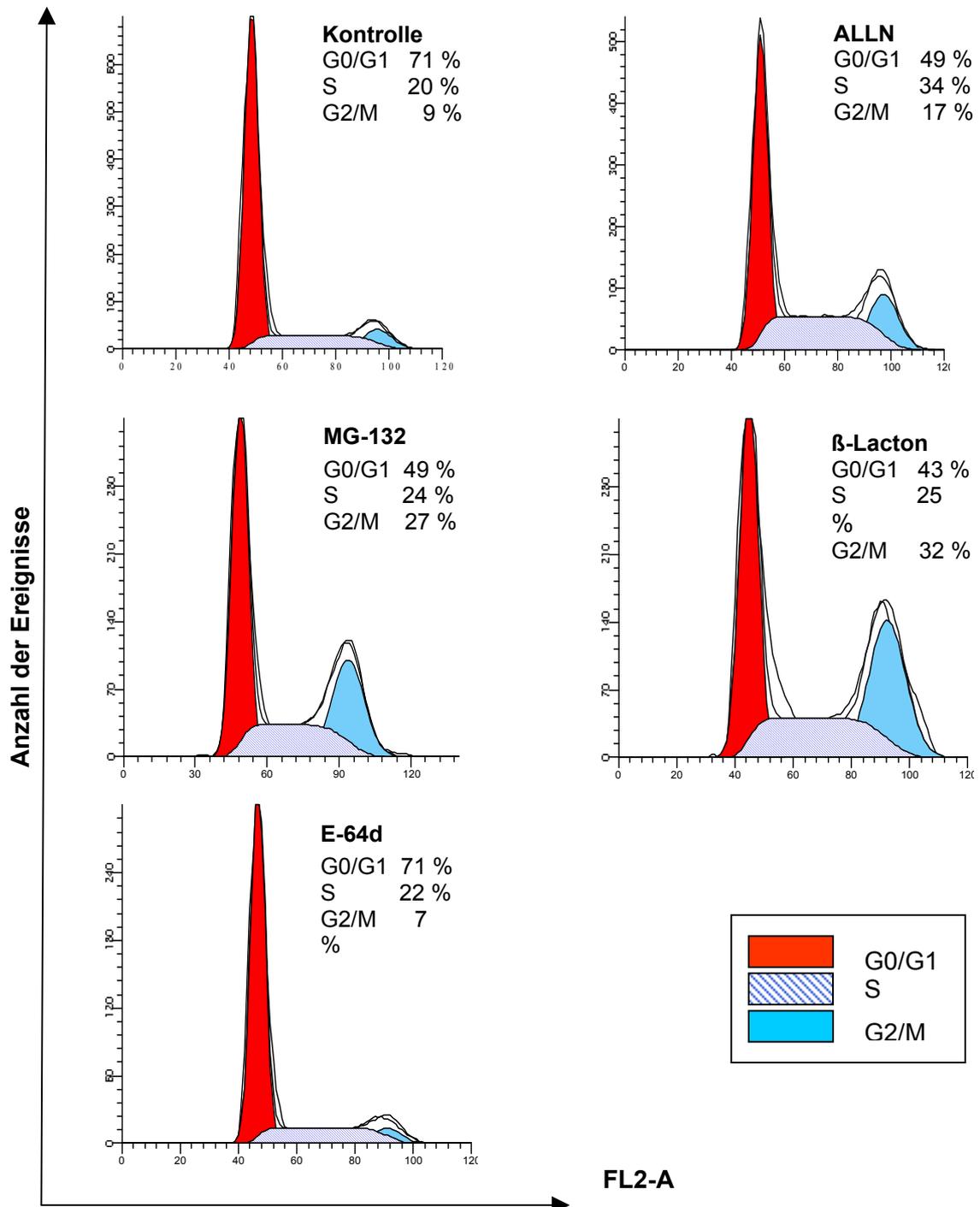


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen in A-549-Zellen nach Inkubation mit Proteasom- und Cysteinproteinaseinhibitoren.

Die Zellen wurden für 24 h mit den Inhibitoren behandelt. Nach einer Propidiumiodidfärbung erfolgte die Analyse des DNA-Gehaltes am Durchflusszytometer. Dieser repräsentative Versuch zeigt die Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase nach Proteasominhibition durch ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), β -Lacton (25 μ M) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen deutlich. Die Zuordnung der Zellen in die Zellzyklusphasen erfolgte automatisch mit dem Programm Mod Fit LTTM. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase dargestellt.

3.4.2 Expression der Cycline B1 und D1

Die Kontrolle des Zellzyklus erfolgt hauptsächlich durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen, die aktive Komplexe bilden. Die Bildung und Aktivität dieser Komplexe wird einerseits durch die Neusynthese und den Abbau der Cycline und andererseits durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Komplexe reguliert. Von den bisher bekannten acht Cyclinen findet man Cyclin D1 in der ersten Phase des Zellzyklus, der G0/G1 Phase. Im Gegensatz dazu wird Cyclin B1 im Verlauf der G2/M Phase synthetisiert und während der Mitose abgebaut.

Eine mögliche Ursache der beobachteten Akkumulation von Zellen in der G2/M Phase könnte eine veränderte Konzentration oder Verfügbarkeit der phasenspezifischen Cycline darstellen. Deshalb schlossen sich Untersuchungen zur Expression der Cycline B1 und D1 in A-549-Zellen an. Mit Hilfe FITC-konjugierter Cyclin B1- und D1-Antikörper wurde der Anteil der Zellen, die das jeweilige Cyclin exprimierten, vor und nach Inhibierung des Proteasoms und der Cysteinproteinasen am Durchflusszytometer gemessen. Die Inkubation der A-549-Zellen mit ALLN, MG-132 und β -Lacton führte zu einem 1,5fachen bis 2,5fachen Anstieg der relativen Zahl von Zellen, die messbare Mengen des Cyclins B1 enthielten (Abbildung 10 A). Nach Inhibierung des Proteasoms und der Cysteinproteinasen wurde analog zur Verteilung der Zellen im Zellzyklus kein Anstieg des Anteils von Zellen, die Cyclin D1 exprimierten, nachgewiesen (Abbildung 10 B).

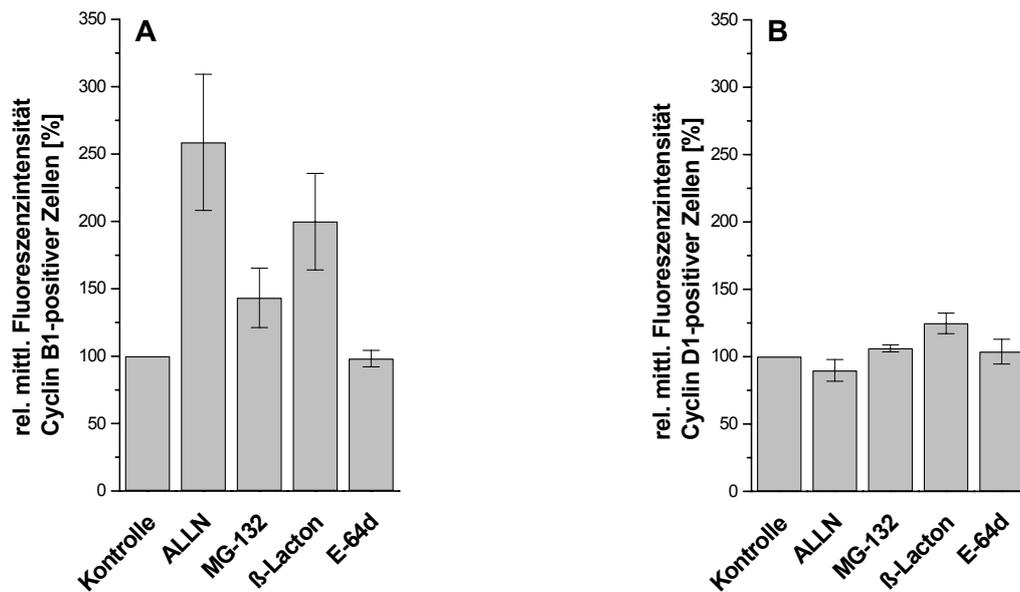


Abb. 10: Expression von Cyclin B1 und D1 in Zelllinie A-549.

Die Zellen wurden 24 h vorinkubiert und anschließend 24 h mit den Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) behandelt. Nach Ethanolfixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit 20 μ l Anti-Cyclin B1 [A]-bzw. D1 [B]-FITC-markierten Antikörpern. Die am Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenz wurde prozentual mit der unbehandelten Kontrolle (100 %) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.5 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Proteasominhibitoren

3.5.1 IL-8, ENA-78 und MCP-1 in A-549-Zellen

Für die Untersuchungen zur Zytokinsekretion nach Inhibierung des Proteasoms wurde die Modellzelllinie A-549 genutzt. Diese Lungenkarzinomzelllinie mit Charakteristika der Typ II Pneumozyten sezerniert zahlreiche Zytokine und Chemokine und war deshalb für unsere Untersuchungen sehr gut geeignet. Aus der Gruppe der C-X-C Chemokine wurde die Sekretion von IL-8 und ENA-78 untersucht. Als Vertreter der C-C Chemokine wurde der Einfluss der Proteasominhibitoren auf MCP-1 und RANTES ermittelt.

Für die Sekretionsversuche wurden die Zellen 24 h vorinkubiert und nachfolgend 24 h unter serumfreien Bedingungen mit den Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d jeweils 50 μ M und β -Lacton 25 μ M behandelt. Anschließend wurden Zellkulturüberstände gewonnen und der Zytokingehalt mit Hilfe von Enzymimmunoassays quantifiziert. Abbildung 11 zeigt die Zytokinsekretion nach Proteasom- und Cysteinproteinaseinhibierung. Abbildung 11 A

zeigt deutlich, dass die Proteasominhibitoren einen signifikanten Anstieg der IL-8-Produktion induzieren, während nach Hemmung der Cysteinproteinasen durch E-64d keine Veränderung nachweisbar war. Der stärkste Anstieg der IL-8-Konzentration (11fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle) wurde nach 24-stündiger Inkubation mit ALLN beobachtet. Im Gegensatz dazu war nach Inkubation mit ALLN, MG-132 und β -Lacton eine 50 %ige Hemmung der ENA-78-Sekretion in den Zellkulturüberständen messbar, während auch hier die Inhibierung der Cysteinproteinasen durch E-64d keinen Einfluss hatte (Abbildung 11 B). Abbildung 11 C zeigt einen bis zu 20fachen Abfall der MCP-1-Sekretion.

RANTES als Vertreter der C-C Chemokine war in den Überständen der A-549-Zellen nicht nachweisbar.

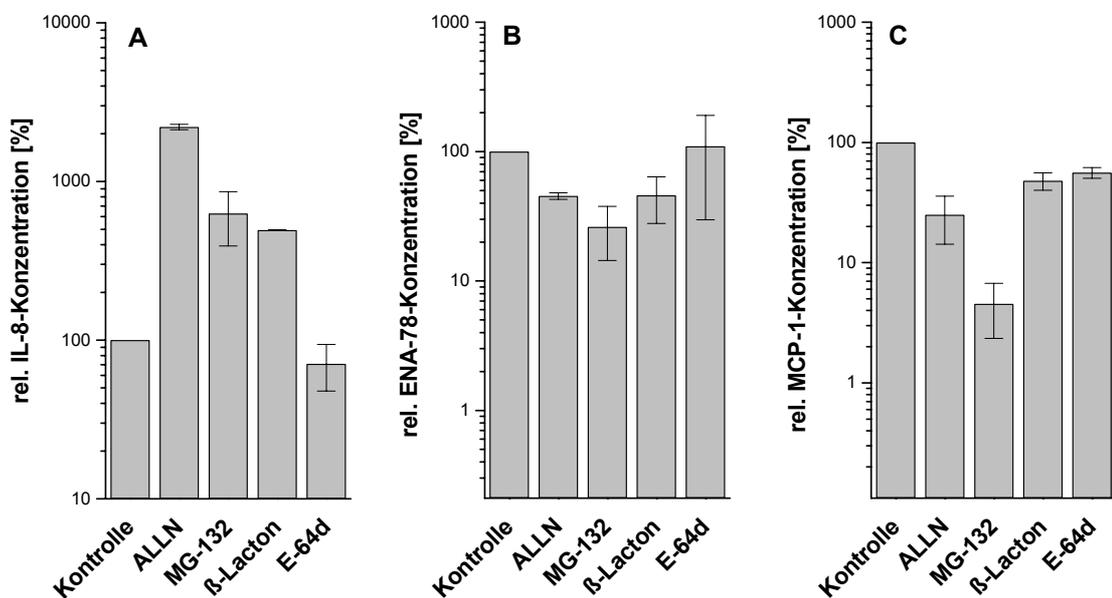


Abb. 11: Zytokinsekretion der Zelllinie A-549 nach Inhibierung von Proteasom und Cysteinproteinasen.

Die Zellen wurden 24 h vorinkubiert und 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), E-64d (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) behandelt. Anschließend wurden Zellkulturüberstände durch Zentrifugation gewonnen, mittels Enzymimmunoassay die Konzentration von IL-8 [A]; ENA-78 [B]; MCP-1 [C] bestimmt und als relative Werte bezogen auf die Zytokinsekretion unbehandelter Zellen (100 %) dargestellt (Mittelwerte \pm SEM). Diese Grafik fasst die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammen.

Da sich bei der Sekretion von IL-8 nach Inhibierung des Proteasoms ein drastischer Anstieg zeigte, wurde die Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Inhibitoreffekts untersucht. Dazu wurden die Inhibitoren ALLN, MG-132 und E-64d in den Konzentrationen 6,25; 12,5; 25; 50 μM und β -Lacton in den Konzentrationen 3,125; 6,25; 12,5 und 25 μM untersucht. Der Versuchsablauf entsprach dem bereits oben beschriebenen Schema und die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 12 A zeigt den Anstieg der IL-8-Sekretion in Abhängigkeit von der ALLN-Konzentration bis zum 12fachen des Ausgangswertes bei der maximal eingesetzten Konzentration von 50 μM . Einen deutlichen Unterschied zu ALLN und β -Lacton zeigt in Abbildung 12 B der Verlauf der IL-8-Sekretion nach Inkubation mit MG-132. Bei einer MG-132-Konzentration von 6,25 μM wurde die höchste IL-8-Konzentration in den Kulturüberständen beobachtet. Höhere Konzentrationen dieses Inhibitors bewirkten zwar ebenfalls eine Induktion der IL-8-Sekretion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, jedoch waren die Konzentrationen des IL-8 in den Überständen geringer als in Anwesenheit von 6,25 μM MG-132. Dieses Phänomen wurde in allen drei unabhängigen Experimenten beobachtet. Die Inkubation der A-549-Zellen mit β -Lacton führte mit steigender Konzentration zu einem 5fachen Anstieg der IL-8-Sekretion gegenüber dem Kontrollniveau (Abbildung 12 C). Abbildung 12 D zeigt, dass die Inhibierung der Cysteinproteinasen mit E-64d im getesteten Konzentrationsbereich bis 50 μM keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion hatte.

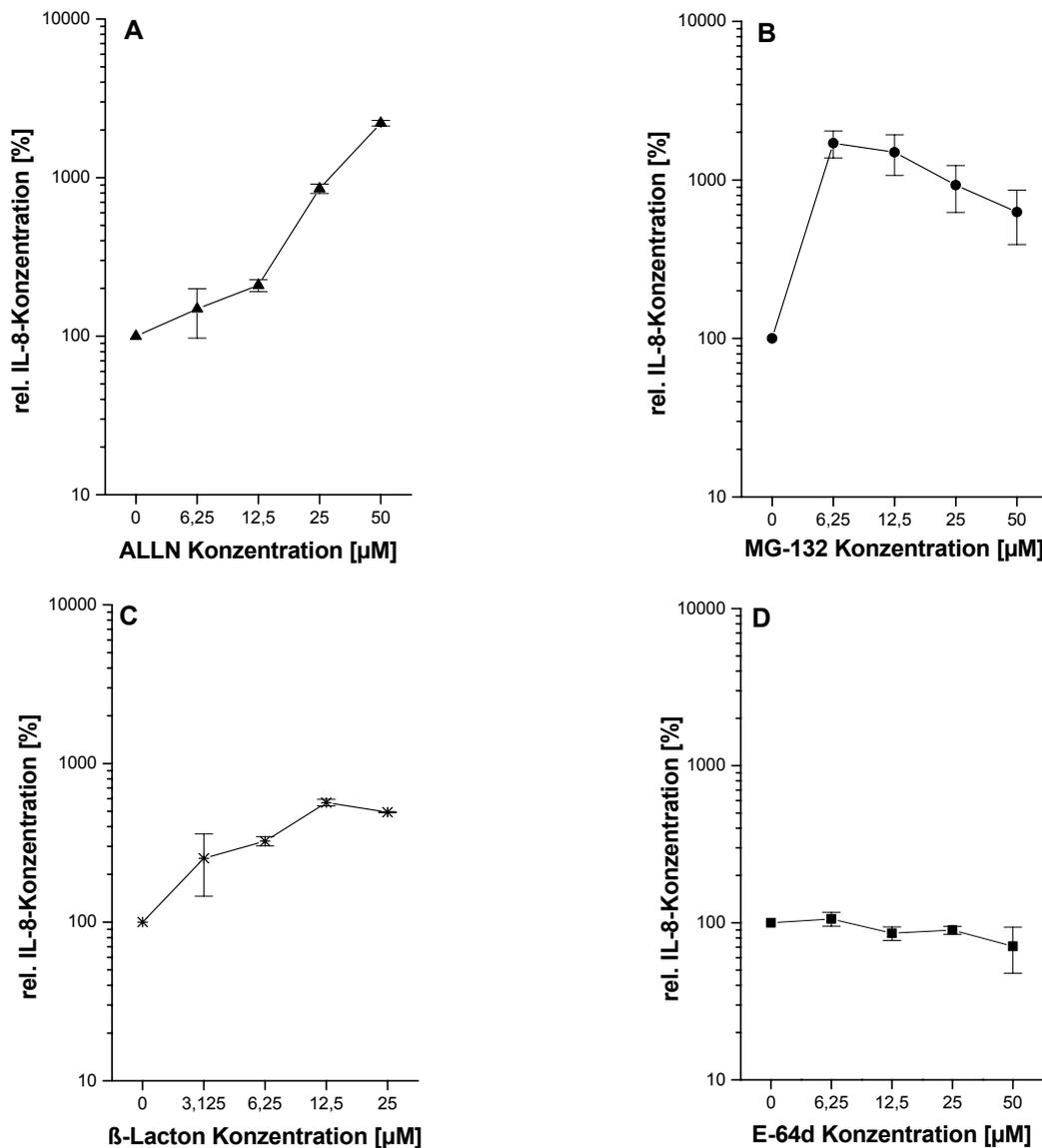


Abb. 12: IL-8-Sekretion der Zelllinie A-549 nach Inhibierung von Proteasom und Cysteinproteinasen.

A-549-Zellen wurden mit den Proteasominhibitoren ALLN [A], MG-132 [B] und β -Lacton [C] in verschiedenen Konzentrationen 24 h inkubiert. Cysteinproteinasen wurden mit E-64d [D] inhibiert. In den Zellkulturüberständen wurde mittels Enzymimmunoassay der Gehalt an IL-8 quantifiziert. Dargestellt sind 3 unabhängige Experimente (Mittelwerte \pm SEM). Die IL-8-Konzentration der unbehandelten Kontrolle wurde 100 % gesetzt und lag im Bereich von 40-100 pg/ml.

3.5.2 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den Zelllinien SK-MES, BEAS-2B, NCI-H727

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Erhöhungen der IL-8-Sekretion nach Inhibierung des Proteasoms ein spezifischer Effekt der Modellzelllinie A-549 sind, wurden die gleichen Untersuchungen an den Lungenepithelzelllinien SK-MES, BEAS-2B und NCI-H727 durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils 24 h nach der Aussaat vorinkubiert und nachfolgend die Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d in der Konzentration 50 μM und β -Lacton in der Konzentration 25 μM zugesetzt. Abbildung 13 zeigt, dass in den drei Epithelzelllinien, wie in den A-549-Zellen, nach Inhibierung des Proteasoms durch ALLN, MG-132 und β -Lacton ein starker Anstieg der IL-8-Sekretion gegenüber dem Kontrollniveau erfolgte. In der Zelllinie BEAS-2B wurde die maximale IL-8-Freisetzung (8000 %) nach Inkubation mit β -Lacton gemessen. NCI-H727-Zellen zeigten die höchste IL-8-Produktion (5000 %) nach β -Lacton-Behandlung. Nach ALLN-Inkubation betrug die IL-8-Freisetzung 4000 % für die BEAS-2B-Zellen und 3600 % für die NCI-H727-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. MG-132 induzierte einen Anstieg auf 1700 % (BEAS-2B) bzw. 850 % (NCI-H727).

Die Zelllinie SK-MES zeigte deutlich geringere IL-8-Konzentrationen nach Proteasominhibierung: 250 % nach ALLN-Behandlung, 130 % nach MG-132-Inkubation und 270 % nach Inkubation mit β -Lacton.

Durch die Behandlung mit E-64d in einer Konzentration von 50 μM konnte in den drei untersuchten Zelllinien SK-MES, Beas-2B und NCI-H727 kein Einfluss auf die IL-8-Sekretion aus den Zellen beobachtet werden.

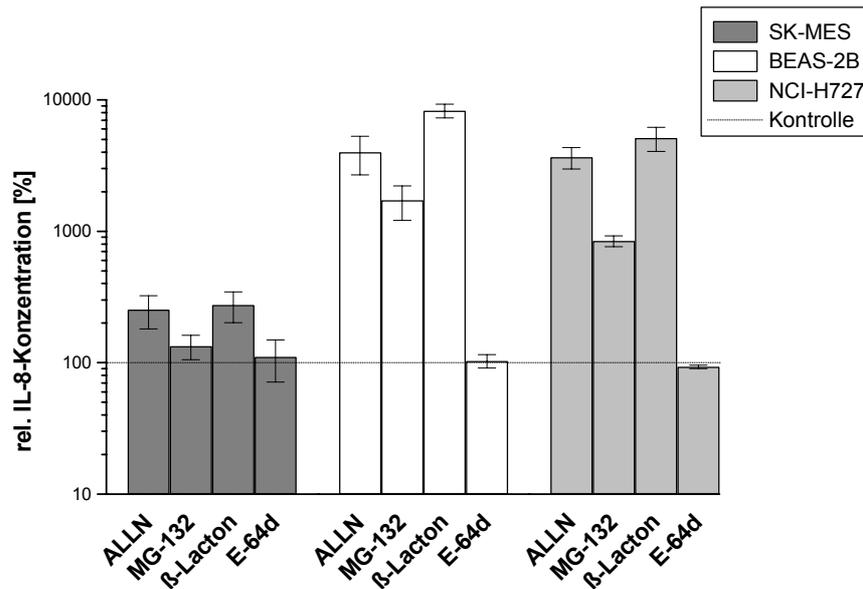


Abb. 13: IL-8-Sekretion in unterschiedlichen Epithelzelllinien nach Inhibierung von Proteasom und Cysteinproteinasen.

Nach 24 h Inkubation mit den Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), E-64d (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) wurde der IL-8-Gehalt mittels Enzymimmunoassay im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) bestimmt. In der Grafik sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Einzelversuchen dargestellt.

3.5.3 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den primären Lungenepithelzellen (NHBE und SAEC)

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse wurden an immortalisierten Lungenkarzinomzelllinien erzielt. Da durch die Immortalisierung der Zelllinien und die lange Kulturdauer *in-vitro* Veränderungen gegenüber dem physiologischen Zustand der Zellen möglich sind, sollten die Ergebnisse durch Untersuchungen an Primärzellen abgesichert werden. Dazu wurden NHBE-Zellen (Normal Human Bronchial/Tracheal Epithelial Cells) und SAEC-Zellen (Small Airway Epithelial Cells) aus der Lunge untersucht. Die Primärzellen wurden in speziellen Nährmedien bis zu einer Konfluenz von 80- 90 % kultiviert und dann nach dem gleichen Schema wie die Zelllinien mit Inhibitoren behandelt und für die Versuche eingesetzt.

In Abbildung 14 wird deutlich, dass auch bei den Primärzellen nach Inhibierung des Proteasoms ein deutlicher Anstieg der IL-8-Sekretion gegenüber dem Kontrollniveau zu beobachten war. Die höchste IL-8-Freisetzung zeigten die SAEC-Zellen nach Inkubation mit 25 μ M β -Lacton (2000 %). Die maximale IL-8-Produktion wurde in den Überständen

der NHBE-Zellen nach ALLN-Behandlung gemessen (4500 %). E-64d als Inhibitor der Cysteinproteinasen beeinflusst die IL-8-Sekretion nicht wesentlich.

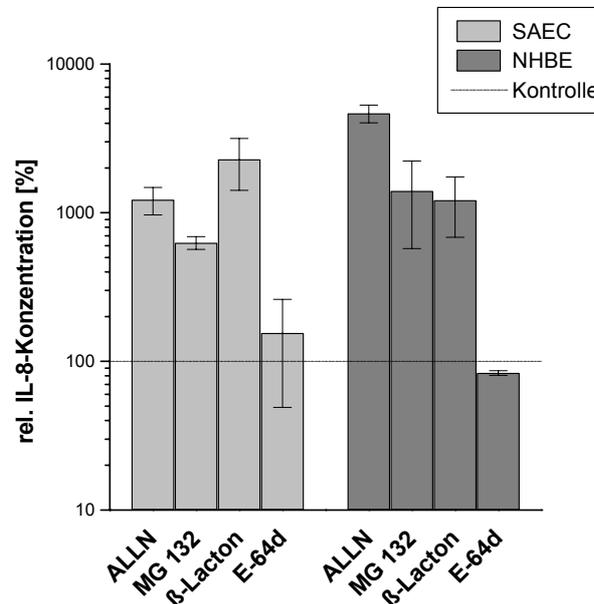


Abb. 14: IL-8-Sekretion in primären Lungeneithelzellen SAEC und NHBE nach Inhibierung von Proteasom und Cysteinproteinasen.

Verwendet wurden die Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M), E-64d (50 μ M) β -Lacton (25 μ M). Die Primärzellen wurden 24 h in Anwesenheit der Inhibitoren inkubiert. Mittels Enzymimmunoassay wurde der IL-8-Gehalt bestimmt und prozentual zur Kontrolle errechnet. Die IL-8-Freisetzung aus nicht mit Inhibitoren behandelten Zellen diente als Bezugsgröße (100 %). Für die dargestellten Mittelwerte (\pm SEM) wurden 3 unabhängige Einzelversuche zusammengefasst.

3.5.4 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die IL-8-Freisetzung aus den myeloischen Zelllinien MONO-MAC-6 und THP-1

Zusätzlich galt es zu untersuchen, ob die erhöhte IL-8-Sekretion nach Proteasominhibition ein spezifischer Effekt in Lungenzellen ist oder auch auf andere Zelllinien übertragen werden kann. In der Lunge gelten Alveolarmakrophagen als wesentliche Produzenten von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren. Deshalb wurden die myeloischen Zelllinien MONO-MAC-6 und THP-1 nach dem Schema der Lungeneithelzelllinien kultiviert und mit den Inhibitoren von Proteasom und Cysteinproteinasen behandelt. Der IL-8-Gehalt in den Kulturüberständen dieser Zellen wurde mittels Enzymimmunoassay quantitativ ermittelt.

Abbildung 15 zeigt deutlich, dass sich beide Zelllinien ähnlich verhalten. Die verwendeten Inhibitoren ALLN (50 μ M), MG-132 (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) führten in den Zelllinien MONO-MAC-6 und THP-1 ähnlich wie in den Lungenepithelzelllinien zu einer stark erhöhten IL-8-Sekretion. Nach Inhibierung der proteasomalen Aktivität durch MG-132 war eine 10fach erhöhte IL-8-Produktion sowohl in MONO-MAC-6 als auch in THP-1 nachweisbar. Nach Inkubation mit ALLN und β -Lacton stieg der IL-8-Gehalt in den Zellkulturüberständen noch deutlicher an. Die Inhibierung der Cysteinproteinasen durch E-64d beeinflusste die IL-8-Sekretion in beiden untersuchten monozytären Zelllinien nicht.

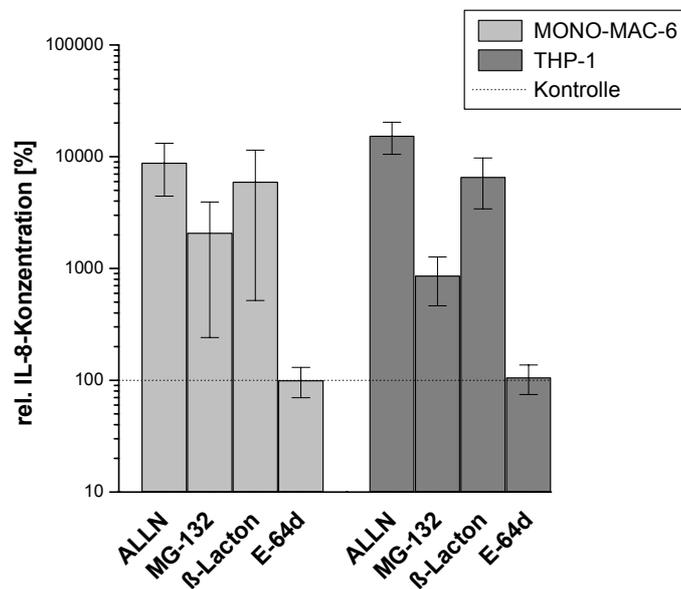


Abb. 15: IL-8-Sekretion in myeloischen Zelllinien MONO-MAC-6 und THP-1 nach Inhibierung von Proteasom und Cysteinproteinasen.

Die Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d wurden in einer Konzentration von 50 μ M, β -Lacton in einer Konzentration von 25 μ M verwendet. Nach 24 h Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren wurde die IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen. Die dargestellten Mittelwerte \pm SEM wurden aus 3 unabhängig ermittelten Einzelwerten errechnet.

3.6 Nachweis der biologischen Aktivität des freigesetzten IL-8

Da IL-8 ein wichtiger chemotaktischer und aktivierender Faktor für neutrophile Granulozyten ist, untersuchten wir diese funktionelle Aktivität des sekretierten IL-8. Konditionierte Überstände von A-549-Zellen, zuvor 24 h mit Proteasominhibitoren behandelt, wurden 10fach konzentriert. Die chemotaktische Aktivität dieser Überstände auf polymorphkernige neutrophile Granulozyten wurde in Agarose-Migrationsassays

bestimmt und war dem mikroskopisch ermittelten Durchmesser der Migrationsfront proportional. Der in Abbildung 16 dargestellte Stimulationsindex (SI) errechnet sich aus dem Verhältnis zwischen Spontanmigration der Granulozyten und der Migration nach Stimulation mit den konditionierten A-549-Überständen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation nach Inkubation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP in einer Konzentration von 0,4 μM . Rekombinantes IL-8 zeigte einen dosisabhängigen Stimulationseffekt auf die Granulozyten (Abbildung 16 B). Überstände von Zellen, die mit ALLN (SI 1,6) sowie mit β -Lacton (SI 1,65) inkubiert wurden, führten ebenfalls zu einer deutlichen Stimulation der Granulozytenmigration (Abbildung 16 A). Der IL-8-Gehalt der konditionierten Kulturüberstände betrug nach 10facher Konzentration bei den mit ALLN-behandelten Zellen 14,3 ng/ml bzw. nach Inkubation der Zellen mit β -Lacton 14,7 ng/ml.

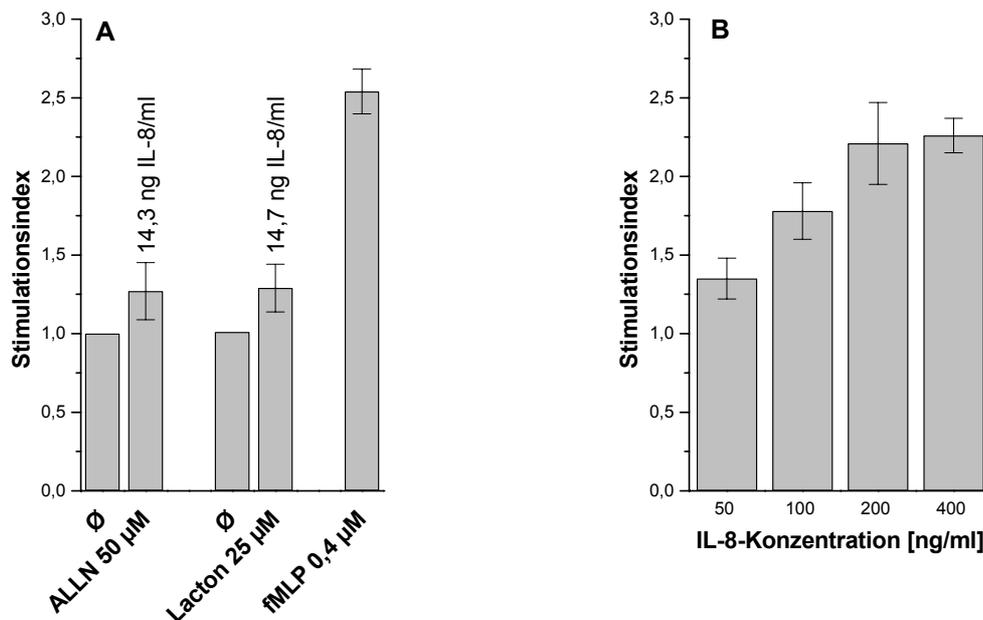


Abb. 16: Beeinflussung der Granulozytenmigration durch konditionierte Überstände.

Abb. A zeigt den Effekt der zehnfach-konzentrierten konditionierten A-549-Zellkulturüberstände, die als chemotaktischer Stimulus für neutrophile Granulozyten in einem Agarose-Migrationsassay eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte neutrophile Granulozyten (\emptyset) und als Positivkontrolle wurde das chemotaktische Peptid fMLP (0,4 μM) eingesetzt. Abb. B zeigt den dosisabhängigen Einfluss verschiedener Konzentrationen von rekombinantem humanen IL-8 auf die Migration der Granulozyten. Die abgelesene Wanderungsstrecke der Granulozyten gegen Medium (Spontanmigration) wurde gleich 1 gesetzt. Auswertet wurden je 3 unabhängige Einzelversuche (Mittelwerte \pm SEM).

Zum Nachweis der Spezifität der gemessenen chemotaktischen Aktivität wurden konditionierte Überstände mit anti-human-IL-8-Antikörpern (10 µg/ml) oder mit irrelevanten Isotyp-Kontrollantikörpern (10 µg/ml) inkubiert. Die für diese Untersuchungen verwendeten NCI-H727 Überstände zeichneten sich durch besonders hohe IL-8-Konzentrationen aus. In den Überständen unbehandelter Kontrollzellen wurde ca. 700-800 pg IL-8/ml gemessen, während die mit Proteasominhibitoren stimulierten Zellen bis 40.000 pg IL-8/ml in die Kulturüberstände sezernierten. Abbildung 17 zeigt, dass der stimulatorische Effekt der IL-8-haltigen Überstände durch den neutralisierenden anti-IL-8-Antikörper vollständig gehemmt wurde (SI 1,02). Der spezifische anti-IL-8-Antikörper blockierte ebenso die chemotaktische Wirkung des als Kontrolle eingesetzten rekombinanten IL-8 (SI 0,94).

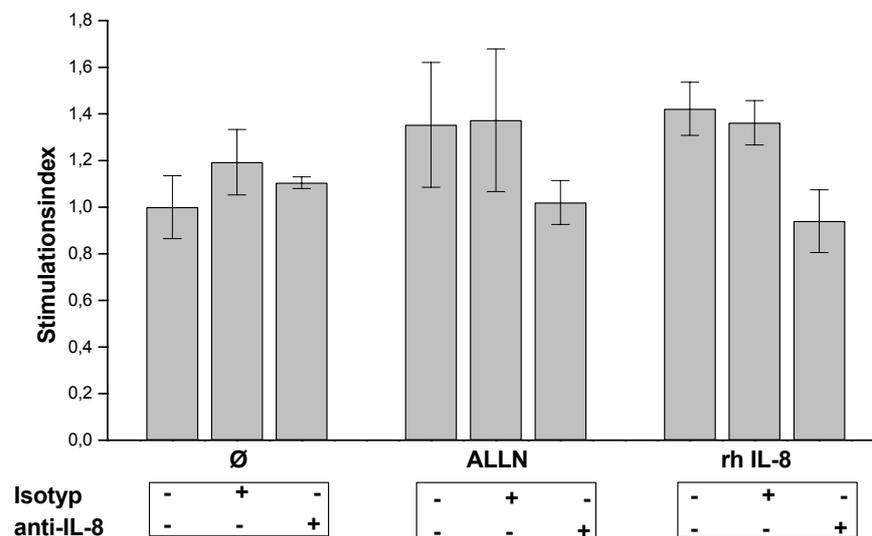


Abb. 17: Blockierung der chemotaktischen Wirkung konditionierter NCI-H727-Überstände durch anti-IL-8 Antikörper.

Überstände von NCI-H727 Zellen, mit 50 µM ALLN inkubiert, wurden mit einem anti-human-IL-8 Antikörper bzw. einem irrelevanten Isotyp-identischen Antikörper behandelt.

Als Negativkontrolle (Ø) diente die Migration unstimulierter Granulozyten (SI 1,0) und als Positivkontrolle die Migration nach Inkubation mit rekombinantem IL-8 in einer Konzentration von 100 ng/ml. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.7 Wirkung der Proteasominhibitoren auf IL-8-mRNA-Konzentration

Um die Regulation der IL-8-Expression näher zu charakterisieren, wurde die Expression von IL-8 auf mRNA-Ebene untersucht. A-549-Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) inkubiert. Die Konzentration der IL-8-spezifischen mRNA wurde am Light Cycler durch real-time-PCR bestimmt und mit Hilfe des parallel gemessenen House-Keeping-Gens β -Actin normiert. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Inhibierung der enzymatischen Aktivität des Proteasoms durch ALLN, MG-132 und β -Lacton hatte eine bis zu 10fach erhöhte Transkription des IL-8-Gens zur Folge, während der Cysteinproteinaseinhibitor E-64d die IL-8-mRNA tendenziell geringfügig verminderte .

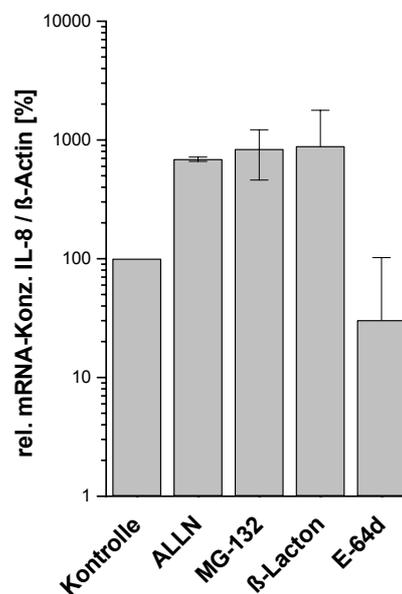


Abb. 18: Quantifizierung der IL-8-mRNA in A-549-Zellen.

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die relative IL-8-mRNA-Konzentration durch Messung von IL-8-mRNA und β -Actin-mRNA ermittelt. Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN, MG-132, E-64d (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) inkubiert. Die Menge an IL-8-mRNA / β -Actin-mRNA un behandelter Kontrollzellen wurde 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.8 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die RNA-Halbwertszeit

Die in den Experimenten mit A-549-Zellen nachgewiesene Erhöhung der IL-8-mRNA-Konzentration nach Inhibierung des Proteasoms kann durch eine Erhöhung der

Halbwertszeit der mRNA verursacht werden. Die Stabilität von mRNA ist normalerweise auf wenige Minuten begrenzt, wobei die schnelle Adenin- und Uracil-Degradierung der IL-8-mRNA durch das AU-reiche cis-Element ARE, das sich in der 3'-Region befindet, vermittelt wird. Stabilisierungen von mRNA können z.B. durch zelluläre Stressfaktoren, Hitzeschock, osmotischen Schock, Einwirkung von H₂O₂ und UV-Licht auftreten. Eine Stabilisierung der IL-8-mRNA wird über die Bindung des RNA-stabilisierenden Proteins HuR an das ARE-Element der mRNA erreicht.

Die Stabilität der IL-8-mRNA nach Proteasominhibierung wurde unter Verwendung des RNA-Synthesehemmers Actinomycin D untersucht. Dazu wurden A-549-Zellen 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 µM) und β-Lacton (25 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 bis 4 h mit Actinomycin D in einer Konzentration von 10 µg/ml behandelt, um die Neusynthese von RNA zu verhindern. Durch real-time-PCR wurde die Konzentration der IL-8-mRNA im Verhältnis zur β-Actin mRNA ermittelt. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, verringerte sich die IL-8-mRNA-Konzentration der Kontrolle innerhalb von 4 h auf 10 % des Ausgangsniveaus. Nach Inhibierung des Proteasoms durch ALLN war eine Stabilisierung der IL-8-mRNA zu beobachten; die Konzentration fiel im Vergleich zur Kontrolle auf ca. 40 % ab. Nach Inkubation mit β-Lacton war kein Abfall der IL-8-mRNA-Konzentration messbar.

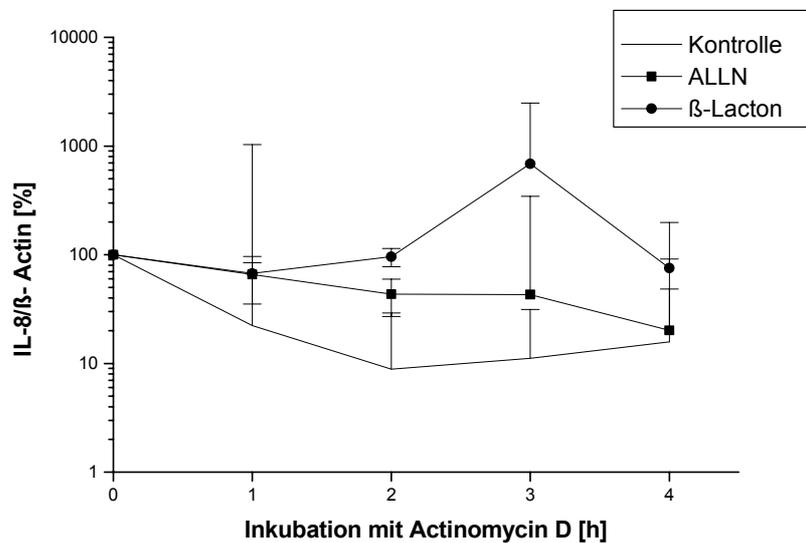


Abb. 19: Stabilisierung der IL-8-mRNA in A-549-Zellen.

Die Zellen wurden 24 h mit den Inhibitoren ALLN (50 µM) und β-Lacton (25 µM) behandelt und anschließend bis zu 4 h mit dem RNA-Synthesehemmer Actinomycin D (10 µg/ml) inkubiert. Die IL-8-mRNA-Konzentration wurde im Vergleich zur β-Actin mRNA-Konzentration mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente die IL-8-mRNA-Konzentration unstimulierter, Actinomycin D-behandelter Zellen, die 100 % gesetzt wurde. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen ± SEM.

3.9 Wirkung der Proteasominhibitoren auf die mRNA-Neusyntheserate

Neben der Stabilisierung der IL-8-mRNA ist deren erhöhte Neusynthese die zweite Möglichkeit den starken Anstieg der IL-8-mRNA nach Inhibierung des Proteasoms zu erklären. Um diese Möglichkeit zu prüfen, führten wir *Nuclear runoff*-Analysen mit A-549-Zellen durch. Dazu wurden Zellkerne der mit ALLN und β -Lacton vorbehandelten Zellen isoliert. Pro Test wurden 10×10^6 Zellkerne in einem Reaktionspuffer mit jeweils 1 mM ATP, CTP, GTP und UTP für 30 min bei 30 °C inkubiert, um die RNA-Synthese zu ermöglichen. Nach Isolierung der RNA aus Kernen wurde mittels quantitativer RT-PCR die Transkriptionsrate des IL-8-Gens ermittelt.

Abbildung 20 zeigt den Vergleich von unbehandelten Kontrollen mit Proben, die mit den Inhibitoren ALLN und β -Lacton behandelten wurden. Nach Inhibierung des Proteasoms durch ALLN war eine leichte Erhöhung der IL-8-mRNA-Neusynthese messbar. Die Hemmung der Aktivität des Proteasoms durch β -Lacton bewirkte einen 5fachen Anstieg der Transkriptionsrate des IL-8-Gens.

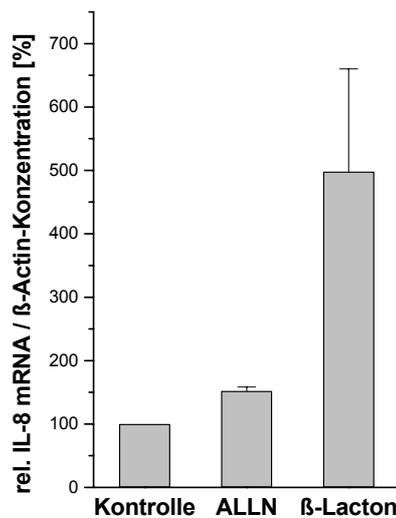


Abb. 20: Messung der IL-8-Neusynthese in A-549-Zellen nach Proteasominhibierung mittels *Nuclear runoff*-Assays.

Nach Vorinkubation mit 50 μ M ALLN und 25 μ M β -Lacton wurden Zellkerne isoliert und die IL-8-mRNA Konzentration 30 min nach Zugabe der Nucleotide ATP, CTP, GTP und UTP mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der IL-8-mRNA / β -Actin mRNA unbehandelter Kontrollzellen wurde 100 % gesetzt. Die dargestellten Messwerte stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Einzelwerten \pm SEM dar.

3.10 Einfluss von Proteasominhibitoren auf Transkriptionsfaktoren, die an IL-8-Neusynthese beteiligt sind

3.10.1 NF- κ B

Basierend auf den oben dargestellten Ergebnissen zur erhöhten IL-8-mRNA-Neusynthese in A-549-Zellen nach Proteasominhibierung wurden weiterführende Untersuchungen zur Regulation der IL-8-Expression durchgeführt. An der Regulation der IL-8-mRNA-Expression sind die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NF-IL-6 beteiligt, wobei NF-IL-6 eine untergeordnete Rolle in der IL-8-Transkription zu spielen scheint. NF- κ B wird als wesentlicher Transkriptionsfaktor angesehen. Mit dem Trans-AM-Assay-System der Firma Activ Motif besteht die Möglichkeit, aktivierte Transkriptionsfaktoren über einen primären anti-Transkriptionsfaktor- und einen sekundären Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten-Antikörper im Zellkernlysate quantitativ zu erfassen. Die spezifischen Antikörper erkennen die DNA-bindenden Molekülsequenzen und somit können Rückschlüsse auf die DNA-Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors gezogen werden. Für unseren Versuchsansatz wurden A-549-Zellen 2 h mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) inkubiert. In Vorversuchen war eine 2-stündige Inkubation als optimale Zeit für die Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern ermittelt worden. Die Untersuchungen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wurden an isolierten Zellkernextrakten vorgenommen.

Der aus zwei Untereinheiten bestehende Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt als Homodimer der Untereinheit p50 oder als Heterodimer der Untereinheiten p50 und p65 vor. Als Positivkontrolle für den Nachweis der Stimulation von NF- κ B diente TNF- α in einer Konzentration von 100 ng/ml.

Abbildung 21 A zeigt, dass nach Stimulation mit TNF- α die p50-Untereinheit von NF- κ B 2,5fach erhöht (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) nachgewiesen werden konnte. Die Untereinheit p65 ließ sich durch TNF- α nicht aktivieren (Abbildung 21 B). Die Inhibierung des Proteasoms durch ALLN und β -Lacton führte nicht zur erhöhten Expression der beiden Untereinheiten und somit nicht zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

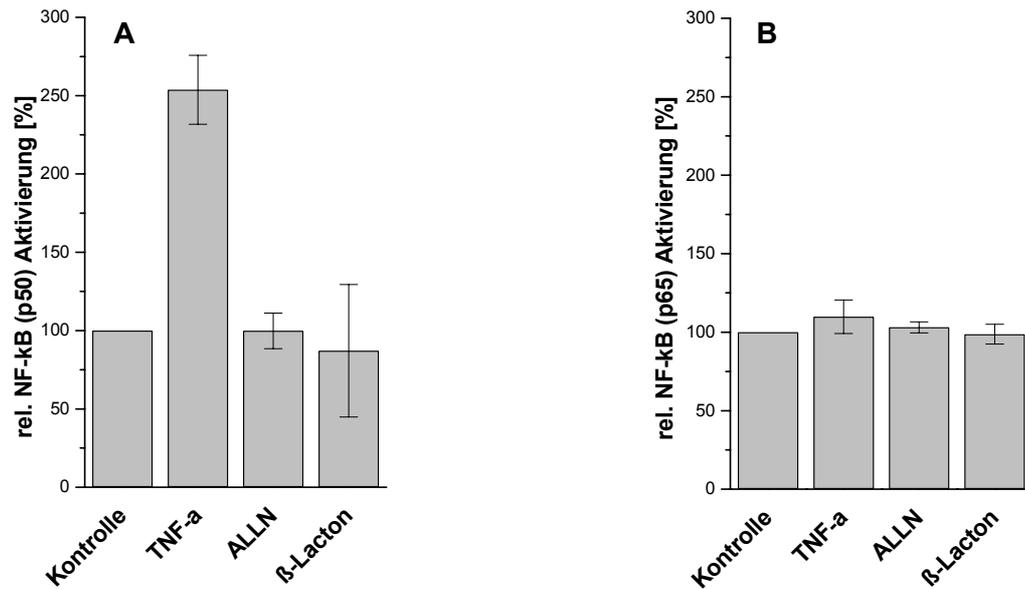


Abb. 21: Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B in isolierten Kernextrakten der Zelllinie A-549 nach Proteasominhibierung.

Die Zellen wurden für 2 h mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μ M) oder β -Lacton (25 μ M) bzw. mit TNF- α (100 ng/ml) behandelt. Nach Isolierung und Lyse der Zellkerne wurden 20 μ g Protein für den Trans-AM-Assay der Firma Active Motif genutzt. Abb. A zeigt die Aktivierung der p50-Untereinheit. Die Aktivierung der Untereinheit p65 ist in Abb. B dargestellt. Als Vergleichswert diente die unbehandelte Kontrolle, deren Werte 100 % gesetzt wurden. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Einzelversuchen.

3.10.2 AP-1

Die erhöhte IL-8-Transkription war nicht auf eine Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückzuführen. Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung des ebenfalls an der IL-8-Synthese beteiligten Transkriptionsfaktors AP-1 stattfindet, wurde für weiterführende Untersuchungen das bereits beschriebene Testsystem für die AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie eingesetzt. Der heterodimere AP-1-Komplex setzt sich aus Fos- und Jun-Proteinen zusammen. Als Untereinheiten von AP-1 wurden c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2, c-Jun, Jun B und Jun D untersucht. Dazu wurden 20 μ g Protein der für zwei Stunden mit den Proteasominhibitoren stimulierten und isolierten Zellkernextrakte eingesetzt. Als Positivkontrolle für die AP-1-Aktivierung diente der Phorbolster PMA in einer Konzentration von 100 ng/ml.

Abbildung 22 verdeutlicht, dass PMA eine Translokation der Untereinheiten Fos-B [B], Fra-1[C], Jun-B [E], Jun-D [F] und c-Jun [G] bewirkte. Bei den untersuchten Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 führten die Proteasominhibitoren

ALLN (50 μM) und β -Lacton (25 μM) nur zu einer Erhöhung der Bindungskapazität von c-Jun [G]. ALLN bewirkte einen Anstieg der c-Jun-Bindungsaktivität auf 125 %, während der selektive Proteasominhibitor β -Lacton einen Anstieg auf 166 % zeigte. Nach Stimulation mit E-64d als Inhibitor von Cysteinproteinasen war für keine der AP-1-Untereinheiten eine erhöhte Aktivität messbar.

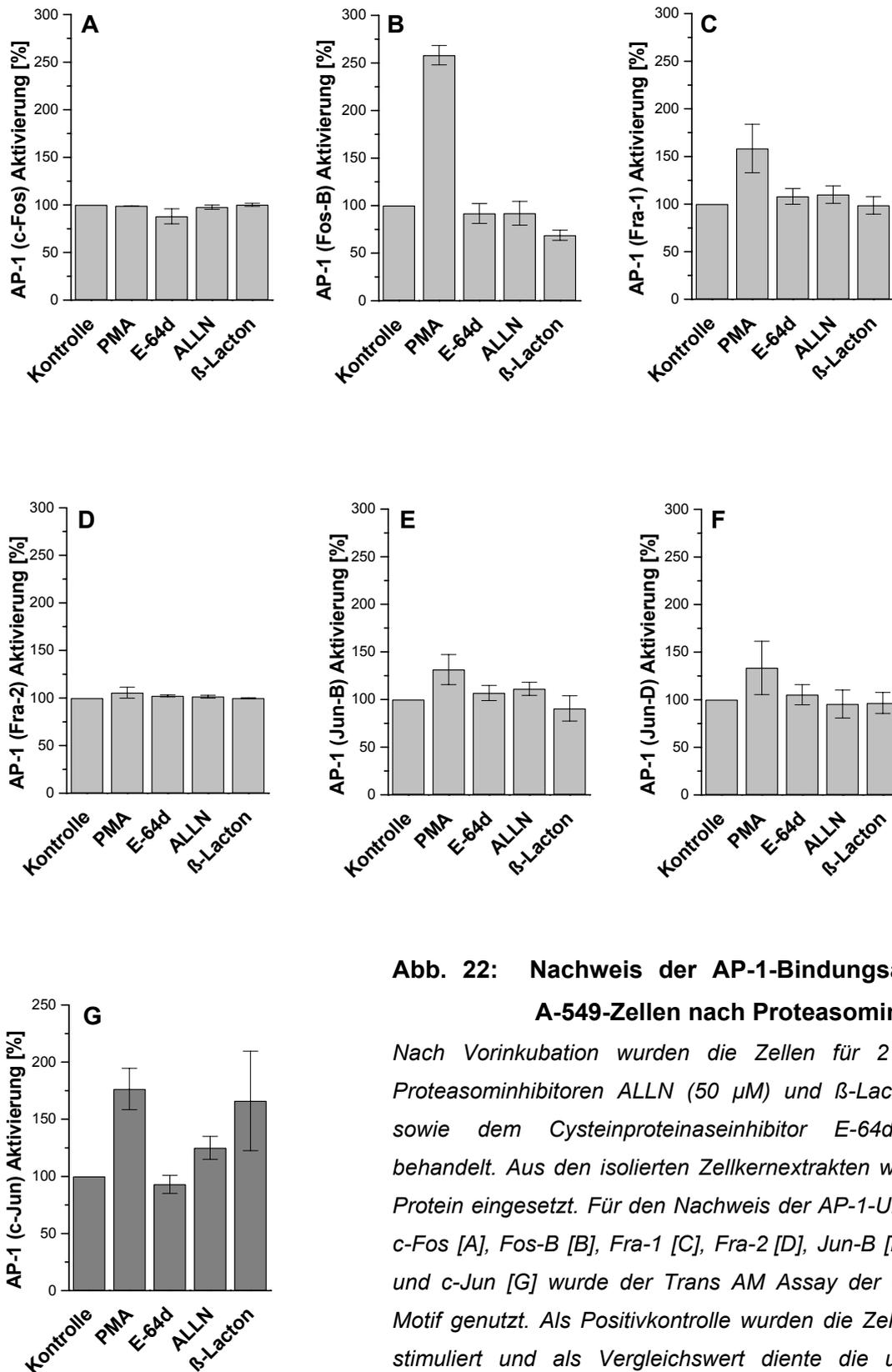


Abb. 22: Nachweis der AP-1-Bindungsaktivität in A-549-Zellen nach Proteasominhibierung.

Nach Vorinkubation wurden die Zellen für 2 h mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) sowie dem Cysteinproteinaseinhibitor E-64d (50 μ M) behandelt. Aus den isolierten Zellkernextrakten wurden 20 μ g Protein eingesetzt. Für den Nachweis der AP-1-Untereinheiten c-Fos [A], Fos-B [B], Fra-1 [C], Fra-2 [D], Jun-B [E], Jun-D [F] und c-Jun [G] wurde der Trans AM Assay der Firma Active Motif genutzt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA stimuliert und als Vergleichswert diente die unbehandelte Kontrolle, die 100 % gesetzt wurde. Die Darstellung zeigt den Mittelwert \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.

3.11 Einfluss der MAP-Kinase-Aktivierung auf die IL-8-Sekretion von A-549-Zellen

Da die Aufregulation des Transkriptionsfaktors AP-1 von der Aktivierung der MAP-Kinasen abhängig ist, wurde die Beteiligung von Erk, JNK und p38 an der Regulation der IL-8-Sekretion nach Inhibierung des Proteasoms in A-549-Zellen untersucht. Für diese Experimente wurden die MAP-Kinasen mit folgenden spezifischen Inhibitoren gehemmt:

U0129 (MEK1/2-Inhibitor)	10 μ M
SB203580 (p38-Inhibitor)	5 μ M
SP600125 (SAPK/JNK-Inhibitor)	10 μ M

In Vorversuchen wurde der Einfluss der eingesetzten Inhibitorkonzentration auf die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung untersucht und gezeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle (Zellkulturmedium und DMSO als Lösungsmittel der Inhibitoren) keine Beeinflussung der Vitalität der Zellen erfolgte (Vitalität 98-100 %).

Die A-549-Zellen wurden 90 min mit den MAP-Kinase-Inhibitoren und anschließend mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μ M) und β -Lacton (25 μ M) behandelt. Nach weiteren 24 h wurde der IL-8-Gehalt in den Zellkulturüberständen mittels Enzymimmunoassay bestimmt. Abbildung 23 zeigt, dass sämtliche verwendete MAP-Kinase-Inhibitoren eine Verringerung der ALLN- und β -Lacton-induzierten IL-8-Sekretion bewirkten. Nach Vorbehandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor und anschließender ALLN-Inkubation betrug die IL-8-Produktion der A-549-Zellen 54 % des Kontrollwertes und nach β -Lacton-Behandlung 83 %. Die Vorinkubation der Zellen mit dem JNK-Inhibitor zeigte eine Reduktion des IL-8-Gehaltes gegenüber dem Kontrollniveau auf 81 % nach ALLN-Inkubation und nach Behandlung mit β -Lacton auf 94 %. Der p38-Inhibitor zeigte keinen Effekt (92 % nach Inkubation mit ALLN und 117 % nach Behandlung mit β -Lacton).

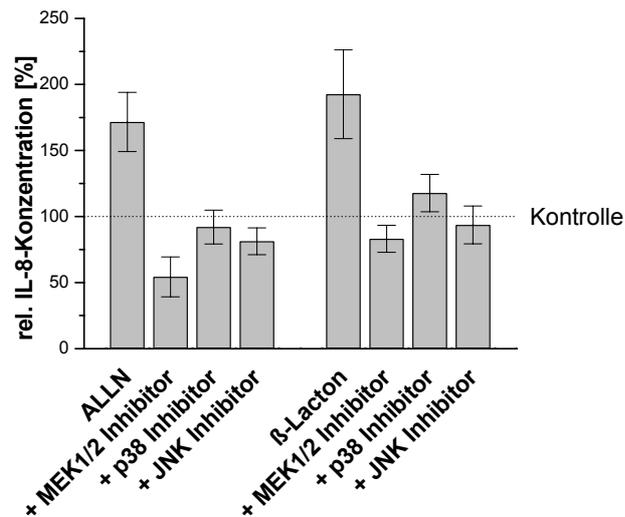


Abb. 23: Induktion von MAP-Kinasen nach Proteasominhibierung in A-549-Zellen.

A-549-Zellen wurden 90 min mit den MAP-Kinase-Inhibitoren U0129 (10 μM), SB203580 (5 μM) und SP600125 (10 μM) und anschließend mit den Proteasominhibitoren ALLN (50 μM) und β -Lacton (25 μM) inkubiert. Nach 24 h wurde die IL-8-Konzentration in den Überständen mittels Enzymimmunoassays quantifiziert. Der IL-8-Gehalt unbehandelter Kontrollzellen wurde 100 % gesetzt. Grafisch dargestellt wurde der Mittelwert \pm SEM von 4 unabhängigen Einzelversuchen.

4 Diskussion

4.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Proteasominhibitoren auf Lungenkarzinomzellen zu untersuchen, da die Entwicklung dieser Inhibitor-Klasse als Therapeutika bei Tumorerkrankungen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. In präklinischen Studien der letzten Jahre wurden wachstumshemmende Einflüsse auf multiple Myelome, Prostata-, Ovarial-, Pankreas- und Plattenepithelkarzinom-Zelllinien nach Inhibierung des Proteasoms nachgewiesen. Unter den Tumorerkrankungen nehmen Lungenkarzinome einen zunehmend hohen Stellenwert ein, da sie weltweit eine steigende Inzidenz aufweisen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit speziell die Effekte von Proteasominhibitoren auf epitheliale Lungenkarzinomzellen untersucht. Diese Zellen sind nachgewiesenermaßen durch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und inflammatorischen Mediatoren aktiv an der Regulation der Immunantwort beteiligt.

Im Ergebnis eigener Vorversuche zeigte sich eine Beeinflussung der IL-8-Sekretion der humanen Lungenepithelzelllinie A-549 durch Inkubation mit Proteasominhibitoren. Um zu untersuchen, ob dies als ein zellspezifischer Effekt anzusehen ist, wurden Experimente mit weiteren humanen Epithelzelllinien der Lunge (NCI-H727, SK-MES), einer virustransformierten Zelllinie (BEAS-2B), primären Lungenepithelzellen (SAEC, NHBE) und auch myeloischen Zelllinien (MONO-MAC-6, THP-1) durchgeführt. Außerdem galt es die Fragestellung zu beantworten, ob der Einsatz von Proteasominhibitoren die Sekretion von weiteren Chemokinen induziert und in welchem Maße Zellzyklus, Proteinexpression, mRNA-Gehalt und Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden.

4.2 Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Sekretion von Chemokinen

4.2.1 Proteasominhibitoren und ihre Wirkungsweise

In-vitro und *in-vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass Proteasominhibitoren in der Lage sind, das Wachstum von Tumoren unterschiedlichen Ursprungs zu beeinflussen⁵⁰. Als mögliche Mechanismen der Antitumorwirkung werden die Proliferationshemmung, Induktion von Apoptose in proliferierenden Zellen, aber auch die Fähigkeit von Proteasominhibitoren die Angiogenese zu hemmen, diskutiert^{64,65}. Eine Rolle spielt dabei auch die durch Proteasominhibierung verminderte NF- κ B-abhängige Expression

bestimmter Wachstumsfaktoren wie IL-4, IL-6, IL-8, die für das Wachstum verschiedener Karzinomzellen von Bedeutung ist ⁶⁶. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Proteasominhibitoren selektiv maligne Zellen beeinflussen und auch die Proliferation von Zelllinien inhibieren können, bei denen mit Standardmethoden der Tumorthherapie keine Wirkung erzielt wurde ^{67,68}.

Während der eigenen experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurde durch Wu et. al. ³⁵ eine erhöhte IL-8-Sekretion nach Proteasominhibierung in der Lungenepithelzelllinie A-549 beschrieben. Die Hemmung der proteolytischen Aktivität erfolgte durch den Einsatz der Inhibitoren β -Lacton und MG-132. Während für den Inhibitor MG-132 auch die Inhibierung von Serin- und Cysteinproteinasen beschrieben wurde, gilt β -Lacton als selektiver und potenter Inhibitor des 20S-Proteasoms und wird sehr häufig für Versuche zur Proteasominhibierung eingesetzt ^{69,70}. Neuartige, ebenfalls sehr selektive und potente Inhibitoren, z.B. Tyropeptin A ⁷¹ sowie natürlich vorkommende Inhibitoren wie EGCG (Polyphenole aus grünem Tee) ⁷², Gliotoxin (Fungalmetabolit) ⁷³ und TMC-95 (aus *Apiospora montagnei*) ⁷⁴ wurden in der Literatur beschrieben.

Zusätzlich zu den von Wu et. al. ³⁵ verwendeten Proteasominhibitoren setzten wir in unseren Versuchen ALLN, das wie MG-132 zur Gruppe der Peptidaldehyde gehört, ein. Es war nachzuweisen, dass die drastisch erhöhte IL-8-Sekretion in A-549-Zellen nach Inhibierung der proteasomalen Aktivität nicht als selektiver Effekt eines bestimmten Inhibitors anzusehen ist. ALLN und MG-132 beeinflussen außer den proteasomale Aktivitäten auch lysosmale Cysteinproteinasen, die ebenfalls am Prozess der Protein-degradation beteiligt sind ⁷⁵. Um in den Experimenten Hemmeffekte auf Calpaine und lysosmale Cathepsine auszuschließen, wurde E-64d als membranpermeabler, irreversibler Inhibitor von Cysteinproteinasen der Papain- und Calpainfamilie in die Versuche einbezogen ¹². Durch den Einsatz der unterschiedlichen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass auch die mit ALLN und MG-132 erzielten Effekte vorwiegend auf eine Hemmung des Proteasoms zurückzuführen sind, da mit dem selektiveren Inhibitor β -Lacton ähnliche Ergebnisse erzielt wurden und andererseits E-64d keinen Effekt hatte.

Das Proteasom umfasst drei unterschiedliche Enzymaktivitäten: die Trypsin-artigen, die Chymotrypsin-artigen und die Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden (Caspase-artigen) Aktivitäten. Um eine signifikante Reduktion des Proteinabbaus durch das Proteasom zu erreichen, ist es nicht notwendig, alle proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms zu inhibieren ¹². Es ist bekannt, dass die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms den größten Einfluss auf proteinabbauende Prozesse haben. Ihre Hemmung oder Inaktivierung (z.B. durch Mutationen) führt zur signifikanten Abnahme der Proteindegradation in der Zelle ^{47,76}. Im Gegensatz dazu hat die Inaktivierung der Trypsin-

artigen und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden Aktivitäten einen geringeren Einfluss auf die proteolytische Gesamtaktivität in der Zelle ⁷⁶⁻⁷⁸. Die meisten Inhibitoren der Chymotrypsin-artigen Aktivität des Proteasoms sind stark hydrophobe Verbindungen, die bessere Zellpermeabilitätseigenschaften als Inhibitoren der Trypsin-artigen und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierenden Aktivitäten besitzen. Deshalb werden die Chymotrypsin-artigen-Aktivitäten des Proteasoms bevorzugt inhibiert ¹². In unseren Versuchen wurden in vitalen A-549-Zellen die intrazellulären Restaktivitäten von Chymotrypsin und Trypsin nach Inhibierung des Proteasoms durch ALLN, MG-132, β -Lacton und E-64d mittels Rhodamin-gekoppelter Substrate durchflusszytometrisch bestimmt. Alle verwendeten Proteasominhibitoren führten zu einer deutlich stärkeren Hemmung der Chymotrypsin- im Vergleich zur Trypsin-artigen Aktivität. Durch den Cysteinproteinaseinhibitor E-64d wurde eine Inhibierung der beiden Aktivitäten um 25 % nachgewiesen.

Neben dem Proteasom findet vor allem im endosomal/ lysosomalen Kompartiment die Degradation von Proteinen statt. Diesem Kompartiment werden bestimmte Cysteinproteinasen zugeordnet, deren Restaktivität ebenfalls nach Inkubation mit bereits beschriebenen Inhibitoren gemessen wurde. Mit ALLN, MG-132 und E-64d wurde eine fast vollständige Hemmung der Cysteinproteinaseaktivität nachgewiesen, während mit dem selektiven Proteasominhibitor eine Reduktion auf 47 % erreicht wurde. So wie viele der bekannten Inhibitoren hemmt β -Lacton außer den proteasomalen Aktivitäten noch verschiedene andere Proteasen, wie z.B. Kathepsin A und Tripeptidyl-Peptidase II, eine zytosolische Oligopeptidase ⁷⁹, so dass eventuell Unspezifitäten in Bezug auf die Substrate auftreten können.

4.2.2 Beeinflussung der Zellproliferation und des Zellzyklus durch Proteasominhibitoren

Das Proteasom als wichtigste extralysosomale Protease der Zelle ist an der posttranskriptionellen Regulation einer großen Anzahl von Proteinen beteiligt, die u. a. für Zellzykluskontrolle und Zellproliferation von maßgeblicher Bedeutung sind.

Um toxische Einflüsse bei der Behandlung der Zellkulturen auszuschließen und von anti-proliferativen Effekten der Inhibitoren abzugrenzen, wurden den Experimenten Vitalitätsuntersuchungen an der Modellzelllinie A-549 vorangestellt. Die Zytotoxizität der Inhibitoren wurde in der jeweils eingesetzten Maximalkonzentration nach einer Inkubation über 24 h geprüft. Sowohl nach Färbung mit Trypanblau und anschließender mikroskopischer Auszählung als auch nach Propidiumiodidfärbung und durchflusszytometrischer Messung wurden A-549-Zellen nach Behandlung mit den

verwendeten Inhibitoren unter unseren Versuchsbedingungen nicht in ihrer Vitalität (95 %-98 %) beeinflusst.

In der Literatur werden antiproliferative Effekte von Proteasominhibitoren in Abhängigkeit von Zelllinie, Konzentrationsbereichen und Inkubationsdauer diskutiert. So konnten beispielsweise Drexler et.al.⁸⁰ zeigen, dass der in klinischen Studien eingesetzte Inhibitor PSI eine Inhibierung des Zellwachstums proliferierender Endothelzellen in Konzentrationsbereichen von 24 nM bewirkt. Für ösophageale Karzinomzellen wiesen Zhang et. al.⁸¹ eine konzentrations- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch MG-132 nach. Verschiedene Autoren zeigten, dass antiproliferative Effekte eine gemeinsame Eigenschaft von Proteasominhibitoren ist^{68,82-85}. Dabei hängen die effektivsten Hemmkonzentrationen von den chemischen Eigenschaften der Inhibitoren, den verwendeten Zelllinien und der Inkubationsdauer ab.

Für unsere Proliferationsuntersuchungen an A-549-Zellen wurde die Methode des [³H]-Thymidin-Einbaus in die DNA genutzt. Die Inkubation mit ALLN, MG-132 und β -Lacton bewirkte erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Reduktion der DNA-Synthese. E-64d als Cysteinproteinaseinhibitor beeinflusste die Proliferation nicht. Die dargestellten anti-proliferativen Effekte nach Einsatz von Proteasominhibitoren sind somit nicht auf einer Hemmung lysosomaler Cysteinproteinasen zurückzuführen. Nach Inkubation mit ALLN und MG-132 in einer Konzentration von 50 μ M war eine 80 %ige Proliferationshemmung gegenüber dem Kontrollniveau messbar. Mit β -Lacton als selektivem Proteasominhibitor wurde diese Proliferationshemmung schon bei einer Konzentration von 25 μ M erreicht. In weiterführenden Versuchen wurde β -Lacton deshalb 25 μ M eingesetzt, während ALLN, MG-132 und E-64d in einer Konzentration von jeweils 50 μ M verwendet wurden.

Der Einsatz von Proteasominhibitoren führt durch den fehlenden Abbau kurzlebiger Proteine zur Störung der Regulationsmechanismen im Zellzyklus. Die Ergebnisse zeigen, dass sich nach Einsatz von Proteasominhibitoren in A-549-Zellen mehr Zellen in der G2/M-Phase befinden. Ursachen dafür könnten in einer beschleunigten Proliferation bzw. in einer Verkürzung der Ruhephase der Zellen liegen. Da aber gleichzeitig eine DNA-Synthesehemmung nach Proteasominhibierung nachgewiesen wurde, kann von einer Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase ausgegangen werden. ALLN, MG-132 und β -Lacton beeinflussten die Zellzyklusregulation und führten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zur Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase. Dabei wurde die stärkste Beeinflussung durch die Inkubation mit β -Lacton erzielt. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Inkubation von

A-549-Zellen mit dem Proteasominhibitor Bortezomib zu einer Verschiebung des Zellanteils in der G2/M-Phase von 15,3 % auf 72,3 % führte⁸⁶. Unsere Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit den Daten von Ling et. al.⁸⁷, die in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor PS-341 eine Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase nachwiesen, die mit einer p21 Akkumulation verbunden war. Die Autoren zeigten einen Anstieg in der Cyclin B Expression, der durch unsere Ergebnisse bestätigt werden konnte. Durchflusszytometrische Untersuchungen von A-549-Zellen ergaben nach Behandlung mit ALLN, MG-132 und β -Lacton eine 1,5- bis 2,5fache Erhöhung von Cyclin B1, dass phasenspezifisch im Verlauf der G2/M-Phase synthetisiert und während der Mitose abgebaut wird. Die als Vergleich gemessene Cyclin D1 Expression unterlag keiner proteasomalen Regulation. Beide Cycline wurden durch E-64d nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu beschrieben Zhang et. al.⁸¹ nach Inkubation von ösophagialen Karzinomzellen mit MG-132 einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase, der mit einem Anstieg der p27 Konzentration verbunden war. Ähnliche Ergebnisse publizierten Fan et. al.⁸⁸ für Magenkarzinomzellen, wobei Unterschiede in den verwendeten Zelllinien AGS und MKN-28 hinsichtlich ihrer Reaktion auf den verwendeten Inhibitor MG-132 nachgewiesen wurden.

Die Hemmung der proteasomalen Aktivität führt bei einer Reihe von humanen Tumorzelllinien zur Proliferationshemmung und bei längeren Inkubationszeiten der Zellen mit Proteasominhibitoren werden in der Literatur für fast alle Zellen toxische Effekte beschrieben¹², wobei auch durchaus Adaptationsreaktionen zu beobachten waren. 0,3 % der Population der Maus-Thymom-Zelllinie EL-4 proliferierte nach einer gewissen Adaptationszeit weiter^{89,90}. Der genaue Mechanismus dieser „alternativen Proteolyse“ ist nicht völlig aufgeklärt, es gibt Beweise dafür, dass die Hemmung bzw. Blockierung der proteasomalen Aktivität durch andere Proteasen kompensiert werden kann. In Zellen, die an Proteasominhibitoren adaptiert waren, wiesen Wang et. al.⁹¹ die Induktion und Überexpression der Tripeptyl-Peptidase II (TPPII) nach. Im Gegensatz dazu wurden für nicht proliferierende Thymozyten und neuronale Zelllinien nach Behandlung mit Proteasominhibitoren zeitabhängige Resistenzen gegen Apoptoseinduktionen beschrieben⁹²⁻⁹⁴.

Es wurde beschrieben, dass die Beeinflussung des Zellzyklus und sein Arrest durch Proteasominhibitoren zu einer gesteigerten Sensitivität proliferierender Zellen für apoptotische Prozesse führt⁶⁹. Tumorzellen sind wahrscheinlich in der Lage Proteasominhibitoren effektiver aufzunehmen oder inaktivieren diese Substanzen wesentlich langsamer als nicht proliferierende Zellen¹². Nach Inhibierung des Proteasoms konnten wir in den von uns untersuchten Lungentumorzellen keine Aktivierung der p50-

und p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B nachweisen, der ein potenter Inhibitor der Apoptose⁹⁵ ist. Nach Inhibierung des Proteasoms in der Zelllinie A-549 konnte eine c-Jun abhängige Aufregulation des Transkriptionsfaktors AP-1 nachgewiesen werden. Die c-Jun N-terminal Kinase (JNK) ist in der Lage, stressinduziert Apoptose auszulösen⁹⁶.

4.2.3 Einfluss von Proteasominhibitoren auf IL-8-Sekretion in Zelllinien

- IL-8 in Lungenepithelzelllinie A-549

Das Chemokin IL-8 ist sowohl an der Proliferationskontrolle von Tumoren als auch dem Anstieg der proinflammatorischen Zellinfiltration und der Angiogenese beteiligt.

Durch Wang et. al.¹⁰¹ wurde an der Zelllinie A-549 nach erhöhter IL-8-Expression eine deutlich verringerte Proliferation nachgewiesen, für andere Lungenkarzinomzelllinien konnte nach Inkubation mit rekombinantem IL-8 ein verringertes Tumorwachstum erreicht werden. Für das ursprünglich ausschließlich als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten beschriebene IL-8, konnte *in-vivo* später nach Überexpression von IL-8 in Ovarialtumorzellen^{97,98} eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums nachgewiesen werden. Ursachen dafür sind in einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen in das Tumorgewebe zu sehen, die im Zusammenhang mit einer gleichzeitig induzierten Entzündung stehen. Dass IL-8 auch als autokriner Wachstumsfaktor fungieren kann, zeigten Singh et. al.⁹⁹ an einer Melanomzelllinie mit geringem Metastasierungspotenzial. Durch rekombinantes IL-8 wurde die Proliferation konzentrationsabhängig stimuliert und damit nachgewiesen, dass IL-8 in die Metastasierung von Melanomen involviert ist. Ähnliche Effekte wurden an Kathepsin L-defizienten Klonen der Lungenepithelzelllinie A-549 durch Wille et. al.¹⁰⁰ beschrieben. Durch den Anstieg der zellulären IL-8-Sekretion wurde die Proliferationshemmung durch das Kathepsin-Defizit partiell kompensiert.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zur IL-8-Sekretion nach Proteasominhibierung bestätigen Ergebnisse³⁵, dass in Lungenepithelzelllinien nach der Blockierung des Proteasoms ein drastischer Anstieg der IL-8-Sekretion nachweisbar war. Wir konnten in unseren Versuchen nach Inhibierung des Proteasoms mit ALLN, MG-132 und β -Lacton eine 4-11fach erhöhte IL-8-Sekretion in A-549-Zellkulturüberständen nachweisen.

Die Kinetiken der IL-8-Sekretion der untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit den einzelnen Inhibitoren verliefen unterschiedlich. Es wurde gezeigt, dass die Inhibitoren aufgrund ihrer voneinander abweichenden Hemmkonstanten ein unterschiedliches

Konzentrationsoptimum hinsichtlich der maximalen IL-8-Induktion besitzen. Mit ALLN wurde bei einer Konzentration von 50 μM die maximale IL-8-Freisetzung erreicht, während nach Inkubation mit 12,5 μM β -Lacton ein drastischer Anstieg der IL-8-Sekretion nachweisbar war. Die größte Hemmkapazität der verwendeten Inhibitoren hatte MG-132, der schon bei einer Konzentration von 6,25 μM zur maximalen IL-8-Sekretion führte. Vergleichbare Effekte für die IL-8-Sekretion in Endothelzellen wurden von Hipp et. al.¹⁰² beschrieben.

Durch die Messung von MCP-1, ENA-78 und RANTES in A-549-Zellkulturüberständen wurde bewiesen, dass es sich bei den dargestellten Daten um IL-8 spezifische Effekte handelt. Nach Inhibierung des Proteasoms durch ALLN, MG-132 und β -Lacton war ein Abfall der ENA-78- und MCP-1 Sekretion nachweisbar. RANTES war in den A-549 Zellkulturüberständen nicht nachweisbar. In der Literatur wird die MCP-1 Sekretion nach Hemmung des Proteasoms unterschiedlich diskutiert. Während Nakayama et. al.¹⁰³ eine Induktion der MCP-1 Sekretion in Rattenmesangiumzellen zeigten, beschrieben Hipp et. al.¹⁰² und Smith et. al.¹⁰⁴ für humane arterielle Endothelzellen einen Abfall in der MCP-1 Expression nach Hemmung der proteasomalen Aktivität. Die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B regulierte MCP-1 Sekretion scheint zellabhängige Unterschiede aufzuweisen, die möglicherweise in der Genese der Epithel-, Endothel- und mesangialen Zellen begründet sind.

- IL-8 in SK-MES, BEAS-2B, NCI-H727

Zusätzlich zum Modell der A-549-Zellen wurde die IL-8-Sekretion der Lungenepithelzelllinien SK-MES, BEAS-2B, NCI-H727 nach Hemmung des Proteasoms untersucht. Diese Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihres Ursprungs. Die humane Bronchialepithelzelllinie SK-MES wurde aus einem kleinzelligen Bronchialkarzinom isoliert, während die BEAS-2B Zelllinie aus virustransfizierten Bronchialepithelzellen entstanden ist. Die SK-MES Linie wurde aus einem Plattenepithelzellkarzinom isoliert. Unsere Daten zeigen deutlich, dass in allen getesteten Zelllinien ein deutlicher Anstieg der IL-8-Sekretion nachweisbar war. Im Unterschied zu A-549-Zellen, bei denen nach Inkubation mit ALLN die maximale IL-8 Freisetzung induziert wurde, sekretierten SK-MES, BEAS-2B und NCI-H717-Zellen nach Inkubation mit 25 μM β -Lacton die höchsten Konzentrationen in die Zellkulturüberstände. Verglichen mit den anderen Zelllinien sekretierten SK-MES Zellen wesentlich geringere IL-8 Konzentrationen. Eine Ursache für die unterschiedlich hohe IL-8-Expression nach Proteasominhibierung könnte die Isolation der Zelllinien sein, die zwar alle epithelialen Ursprungs sind, aber aus verschiedenen Karzinomarten stammen.

- IL-8 in primären Lungenepithelzellen

Bei immortalisierten Zelllinien besteht die Möglichkeit, dass während der langen *in-vitro*-Kultivierungen Veränderungen zum physiologisch vorhandenen Zelltyp auftreten können. Deshalb wurde zusätzlich die IL-8-Sekretion nach Hemmung des Proteasoms in primären Lungenepithelzelllinien untersucht. Aus der Literatur waren in diesem Zusammenhang keine Daten bekannt. Als repräsentative Beispiele wurden in der vorliegenden Arbeit humane Alveolarepithelzellen (SAEC) und humane Bronchialepithelzellen (NHBE) verwendet. An beiden Zellarten konnte gezeigt werden, dass auch in primären Lungenepithelzellen nach Hemmung des Proteasoms ein 10facher Anstieg der IL-8-Sekretion nachweisbar war. Die nach Proteasominhibierung induzierte IL-8-Freisetzung ist damit kein spezieller Effekt immortalisierter Zelllinien, sondern ein allgemeines Phänomen von Lungenzellen epithelialen Ursprungs.

- IL-8 in myeloischen Zelllinien

Eine wichtige Rolle bei der Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und anderer Entzündungsmediatoren in der Lunge kommt den Alveolarmakrophagen zu. Deshalb wurden Experimente zur Sekretion des nach Proteasominhibition induzierten IL-8 mit myeloischen Zellen durchgeführt. Die verwendeten myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MONO-MAC-6 wurden aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie isoliert und repräsentieren unterschiedliche Differenzierungsstadien von myeloischen Zellen. Dabei sind THP-1-Zellen weniger differenziert als MONO-MAC-6-Zellen. Die Hemmung der proteasomalen Aktivität durch ALLN, MG-132 und β -Lacton führte ähnlich wie in den untersuchten Epithelzellen zum 10fachen Anstieg der IL-8-Sekretion in den Kulturüberständen. Die unterschiedlichen Differenzierungsstadien, in denen sich THP-1 und MONO-MAC-6-Zellen befinden, hatten keinen Einfluss auf die IL-8 Freisetzung und deren Konzentration nach Hemmung des Proteasoms. In beiden myeloischen Zelllinien bewirkte die Inhibierung der Cysteinproteinasen keine Zunahme der IL-8-Sekretion.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl bei verschiedenen Lungentumorzellen, primären Lungenepithelzellen als auch myeloischen Zellen ein drastischer Anstieg der IL-8-Sekretion nach Hemmung des Proteasoms durch die Inhibitoren ALLN, MG-132 und β -Lacton erfolgte. Die dargestellten IL-8 Effekte sind unabhängig vom Zelltyp. Durch Wu et. al.³⁵ wurde an embryonalen epithelialen Nierenzellen eine Zunahme der IL-8-Sekretion nach Proteasominhibierung gezeigt, und Hipp et. al.¹⁰² beschrieben den gleichen Effekt für drei Glioblastomzelllinien.

4.2.4 Biologische Aktivität des nach Proteasominhibierung sekretierten IL-8

Nach Inhibierung des Proteasoms mit ALLN und β -Lacton steigt die IL-8-Sekretion der Lungenepithelzelllinie A-549 stark an. IL-8 ist ein wichtiger chemotaktischer und aktivierender Faktor für neutrophile Granulozyten, die wesentlichen Einfluss auf den Verlauf einer Entzündungsantwort nehmen können. Durch parakrine und autokrine Mechanismen ist IL-8 außerdem in der Lage, Tumorwachstum nachhaltig zu beeinflussen. Die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit konditionierten A-549-Kulturüberständen (mit ALLN und β -Lacton inkubiert) wurde in einem Migrationsassay bestimmt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte das nach Proteasominhibierung sekretierte IL-8 zur Chemotaxis der Granulozyten. Ein dosisabhängiger Effekt der chemotaktischen Aktivität der Granulozyten war nach Inkubation mit rekombinantem humanen IL-8 messbar. Durch die Verwendung eines anti-IL-8 Antikörpers wurde der stimulatorische IL-8 Effekt auf neutrophile Granulozyten fast vollständig auf das Kontrollniveau zurückgedrängt. Das nach Inhibierung des Proteasoms sezernierte IL-8 ist also biologisch aktiv.

Hohe IL-8 Konzentrationen und die steigende Infiltration von neutrophilen Granulozyten beeinflussen das Tumorwachstum ¹¹⁹. Die Autoren fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten IL-8 Konzentrationen in Bronchiallavagen von Patienten mit Lungenkarzinom und einer erhöhten Sterblichkeitsrate. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten führt zur Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Proteasen und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen.

Die Rolle des IL-8 als autokriner Wachstumsfaktor wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert. Vorausgegangene Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass IL-8 für A-549-Zellen die Funktion eines wichtigen Wachstumsfaktors besitzt ¹⁰⁰. Diese Ergebnisse wurden durch Fujisawa et. al. ¹²⁰ bestätigt, der ein vermindertes Tumorwachstum der Adenokarzinomlinie A-549 nach Blockierung von IL-8 beschrieb. Im Gegensatz dazu publizierten Murdoch et. al. ¹²¹ Daten, die in A-549-Zellen eine Beeinflussung der Proliferation durch IL-8 ausschlossen.

4.2.5 Wirkung von Proteasominhibitoren auf IL-8-mRNA

In einer Reihe von Experimenten wurde der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Regulation der IL-8-Sekretion auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Nach Behandlung der Zellen mit ALLN, MG-132 und β -Lacton war eine bis zu 10fache Erhöhung der Konzentration der IL-8-mRNA nachweisbar. Die Inkubation der Zellen mit E-64d hatte keinen Einfluss auf die IL-8 mRNA in A-549-Zellen.

Ursache der erhöhten Konzentration an IL-8-mRNA nach Proteasominhibierung konnte sowohl ein Anstieg der Neusyntheserate als auch die erhöhte Stabilität der IL-8-mRNA sein. In den durchgeführten *Nuclear runoff*-Experimenten an A-549-Zellen zeigte sich eine leichte Erhöhung der Neusyntheserate der IL-8-mRNA nach Proteasominhibierung durch ALLN. Deutlicher wurde der Effekt mit dem selektiven Proteasominhibitor β -Lacton. Hier wurde mittels quantitativer RT-PCR ein 5facher Anstieg der Neusyntheserate der IL-8-mRNA gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen nachgewiesen.

Stabile mRNA-Moleküle haben eine Halbwertszeit von mehreren Stunden, mRNA's von Zytokinen jedoch nur von 5 - 30 min¹⁰⁵. Diese „kurzlebigen“ mRNA-Moleküle sind gekennzeichnet durch AU-reiche Elemente (Adenosin-Uridin-reich, ARE's), die sich in den nicht-kodierenden Bereichen am 3'Ende der mRNA befinden. Die AU-reichen Elemente sind für das Stabilitätsverhalten der entsprechenden mRNA von wesentlicher Bedeutung^{106,107} und die Beeinflussung der Degradation der mRNA spielt eine bedeutende Rolle im Expressionsverhalten der unterschiedliche Zytokine¹⁰⁸.

Versuche mit dem RNA-Synthesehemmer Actinomycin D auf quantitativer RT-PCR Basis zeigten mit ALLN und β -Lacton eine deutliche Stabilisierung der IL-8-mRNA. Die in diesen Experimenten verwendeten Inhibitoren stabilisierten die IL-8-mRNA unterschiedlich stark. Nach Inkubation mit ALLN war eine 40 %ige Erhöhung der IL-8-mRNA gegenüber der mit Actinomycin D behandelten Kontrolle messbar. Deutlich stärker war der Stabilisierungseffekt auf die IL-8-mRNA durch β -Lacton, dass einem Abfall der IL-8-mRNA-Konzentration nach Actinomycin D Behandlung komplett entgegenwirkte.

Für den Proteasominhibitor PSI wurden ähnliche Stabilisierungseffekte der IL-8-mRNA in THP-1-Zellen beschrieben¹⁰⁹. Im Gegensatz dazu wurde durch Hipp et. al.¹⁰² die verminderte Degradation der IL-8-mRNA nach Inkubation von humanen arteriellen Endothelzellen mit dem Proteasominhibitor MG-132 ausgeschlossen. Der Anstieg der IL-8-mRNA wurde von den Autoren ausschließlich auf eine Neusynthese zurückgeführt. Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der Zellspezifität der Degradation der IL-8-mRNA liegen¹⁰⁷.

Die Beeinflussung der IL-8-mRNA Stabilität durch Proteasominhibitoren kann zwei unterschiedliche Ursachen haben:

- Proteasominhibitoren beeinflussen die Ubiquitylierung
- Proteasominhibitoren beeinflussen die RNase Aktivität im Proteasom

Sowohl die Stimulation der Ubiquitylierungsaktivität als auch der proteasomalen Aktivität sehen Laroia et. al.¹⁰⁶ als notwendig an, um Bildung und Abbau von Zytokin-mRNA-Molekülen schnell zu gewährleisten. Bereits 1997 wurden durch Petit et. al.¹¹⁰ Untereinheiten des Proteasoms identifiziert, die für die Katalyse des Abbaus von RNA-

Molekülen zuständig sind. Außerdem wurde beschrieben, dass diese Proteasom-assoziierten RNase-Aktivitäten speziell für die Spaltung der AU-reichen mRNAs verantwortlich sind^{105,110,111}.

Der in unseren Experimenten erzielte Anstieg des IL-8-mRNA-Gehaltes nach Inhibierung des Proteasoms stellt sich als summarischer Effekt von Neusynthese und Stabilisierung der IL-8-mRNA dar.

4.2.6 Einfluss der Proteasominhibitoren auf Transkriptionsfaktoren

Der IL-8-Promotor enthält Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NF-IL-6 (C/EBP- β). Eine Beteiligung von NF-IL-6 an der IL-8-Regulation in A-549-Zellen wurde von verschiedenen Autoren ausgeschlossen bzw. als untergeordnet beschrieben^{33 35}.

NF- κ B wird in der Literatur als wichtigster Transkriptionsfaktor für die IL-8-Expression beschrieben. Rahman et. al.¹¹² wiesen für A-549-Zellen maximale IL-8-Expression durch Zusammenwirken von NF- κ B und AP-1 nach. Durch verschiedene Autoren⁵⁸ wurden NF- κ B-unabhängige Regulationsmechanismen der IL-8-Expression beschrieben³⁰. So wurde z.B. in A-549-Zellen ein durch H₂O₂ induzierter Anstieg der IL-8-Expression bei gleichzeitiger Blockierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nachgewiesen⁵⁸.

Die Aktivierung von NF- κ B ist abhängig von der proteasomalen Aktivität der Zelle. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt in einer inaktiven Form an den Inhibitor I- κ B gekoppelt im Cytosol vor. Durch extrazelluläre Signale wird der I- κ B Komplex phosphoryliert, ubiquitinyliert und dann proteasomal degradiert. Die beiden Untereinheiten von NF- κ B liegen mit ihren Kernlokalisierungssequenzen frei, gelangen in den Kern und binden an den IL-8-Promotor. Die Hemmung des Proteasoms durch ALLN und β -Lacton greift in diesen Translokationsprozess von NF- κ B ein. Durch die blockierte proteasomale Aktivität in der Zelle wird der Inhibitor I- κ B nicht degradiert und NF- κ B kann nicht in den Zellkern gelangen. In unseren Versuchen wiesen wir nach, dass nach Inhibierung des Proteasoms sowohl die p50- als auch die p65- Untereinheit in isolierten Kernextrakten von A-549-Zellen nicht aktiviert wurden. Diese Ergebnisse werden auch durch die Daten von Wu et. al.³⁵ bestätigt. Die drastisch erhöhte Sekretion von IL-8 nach Proteasominhibierung musste daher auf eine NF- κ B unabhängige Aktivierung zurückzuführen sein.

Als Vertreter der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie wurde deshalb die Aktivierung folgender Proteine untersucht: c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2, Jun-B, Jun-D und c-Jun. Die Daten zeigten deutlich, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 nach Inkubation der

A-549-Zellen mit ALLN und β -Lacton ausschließlich über die Aktivierung der c-Jun Untereinheit erfolgte.

Von Karin¹¹³ wurde die zentrale Bedeutung der MAP-Kinasen für die AP-1 gesteuerte IL-8-Expression nachgewiesen. Für A-549-Zellen zeigten Newton et. al.¹¹⁴ den Einfluss des p38-Inhibitors SB203580 und des MEK1/2 Inhibitors U0126 auf die IL-1 β induzierte Prostaglandin E₂ Ausschüttung. Dabei wurde für den p38-Inhibitor eine effektive Konzentration von 0,18 μ M und für den MEK1/2 von 0,8 μ M ermittelt. Diese Daten wurden durch *in-vitro* Kinase Assays von Cuenda et. al.¹¹⁵ und Favata et. al.¹¹⁶ bestätigt. Für die Modellzelllinie A-549 wurde der Einfluss der MAP-Kinasen p38, MEK1/2 und JNK auf die IL-8-Expression nach Proteasominhibierung untersucht.

Die dabei verwendeten Konzentrationen beziehen sich auf Literaturdaten, in denen mehrere Autoren die effektivsten Inhibitorkonzentrationen an A-549-Zellen beschrieben^{35,117,118}. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die IL-8-Sekretion nach Inhibierung von Proteasom und MAP-Kinasen bis auf das Kontrollniveau reduziert wurde. Der Effekt war für die Inhibitoren der MEK1/2 und JNK wesentlich stärker ausgeprägt, als für den Inhibitor der p38-Kinase. Dies korreliert mit den Daten von Wu et. al.³⁵, die in A-549-Zellen nach Inhibierung des Proteasoms mit ALLN und β -Lacton verstärkte AP-1 Aktivität nachwies, die mit der Aktivierung der MEK und JNK gekoppelt war.

Die vorliegenden experimentellen Daten zeigen, dass sich die Beeinflussung des proteasomalen Abbauweges drastisch auf Lungenkarzinomzellen epithelialen Ursprungs auswirkt. Abbildung 24 zeigt eine schematische Zusammenfassung.

Der Einsatz der verwendeten Proteasominhibitoren MG-132, ALLN und β -Lacton in der Lungenkarzinomzelllinie A-549 führt durch den blockierten Abbau von Cyclinen zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G2/M Phase, in dessen Folge eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung nachgewiesen werden konnte.

Die Inhibierung des Proteasoms bewirkt die Blockierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die erhöhte IL-8-Sekretion wird über eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors AP-1 erreicht.

Das sekretierte Chemokin IL-8 ist funktionell aktiv und fungiert sowohl als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten, die regulierend in den Inflammationsprozess eingreifen können, wirkt aber auch als parakriner und autokriner Wachstumsfaktor für Tumore.

Durch den Einsatz von Proteasominhibitoren wird eine erhöhte Sekretion des proinflammatorischen Chemokins IL-8 in Lungenepithelzelllinien und primären Lungenzellen epithelialen Ursprungs induziert. Beim potenziellen therapeutischen Einsatz

von Proteasominhibitoren zur Therapie von Lungenkarzinomen muss auf Grund der proinflammatorischen Wirkungen des verstärkt sekretierten IL-8 einer möglichen Induktion und Verstärkung inflammatorischer Prozesse besondere Beachtung beigemessen werden. Wenn es beispielsweise durch Kombination mit anderen Wirkstoffen gelingt, mögliche proinflammatorischen Wirkungen des Proteasom-Inhibitor-induzierten IL-8 zu minimieren und vor allem die tumorhemmenden Effekte zum Tragen kommen zu lassen, können diese Inhibitoren ein wichtiges Element der Tumorthherapie darstellen.

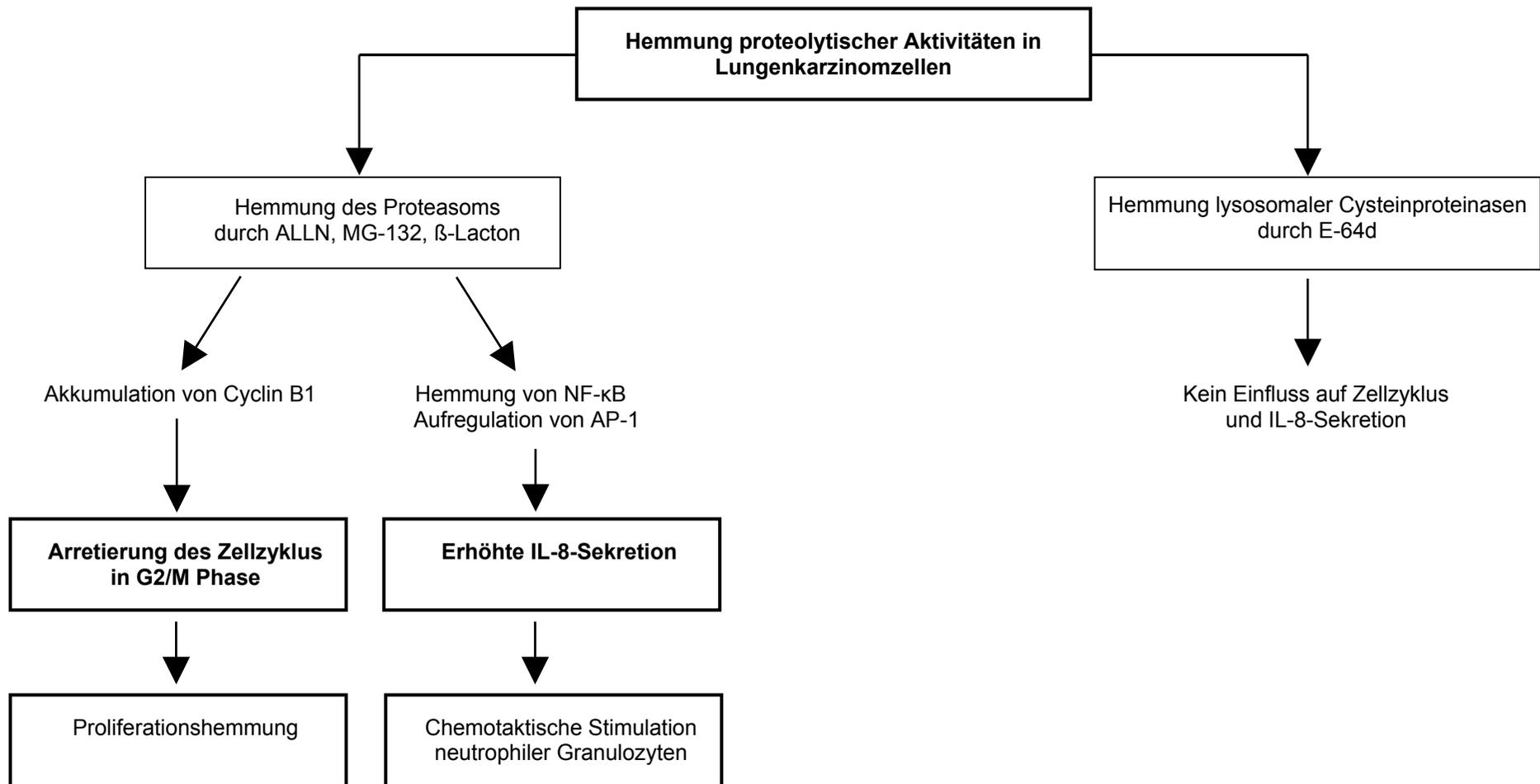


Abb. 24: Schematische Darstellung des Einflusses von Proteasominhibitoren auf Lungenkarzinomzellen.

5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Proteasominhibitoren die Zellproliferation zu inhibieren und selektiv in proliferierenden Zellen Apoptose zu induzieren, macht sie zu attraktiven Kandidaten in der Entwicklung neuer Medikamente in der Tumorthherapie. Von großem Interesse sind Untersuchungen an Lungenkarzinomen, da diese Tumore die häufigste krebs-assoziierte Todesursache in den westlichen Ländern darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Lungenepithelzelllinie A-549 durch die Proteasominhibitoren ALLN, MG-132 und β -Lacton konzentrationsabhängig beeinflusst wird. Die Blockierung des proteasomalen Abbauweges führt u.a. zur Akkumulation des Regulatorproteins Cyclin B, in deren Folge der Zellzyklus in der G2/M Phase arretiert wird. Durch Inhibierung von lysosomalen Cysteinproteinasen mit E-64d konnten diese Effekte nicht erreicht werden.

Die Beeinflussung der proteasomalen Aktivität bewirkte eine drastischen Erhöhung der IL-8-Sekretion in verschiedenen Lungenepithelzelllinien, primären Lungenepithelzellen und myeloischen Zelllinien. Der unterschiedlich hohe Anstieg der IL-8-Expression, der sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, variiert dabei zwischen den Zelllinien. Die erhöhte IL-8-mRNA-Konzentration ist als additiver Effekt aus erhöhter Stabilität der mRNA und gesteigerter Neusynthese von IL-8-mRNA anzusehen.

Die Transkription des IL-8-Gens wird durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NF-IL-6 gesteuert, wobei NF-IL-6 eine untergeordnete Rolle spielt. Durch den Einsatz von Proteasominhibitoren wird der NF- κ B abhängige Regulationsweg der IL-8-Expression blockiert, wobei beide Untereinheiten des Transkriptionsfaktors, p50 und p65, nicht aktiviert werden. Die erhöhte Transkriptionsrate des IL-8-Gens wird ausschließlich durch die Aufregulation des Transkriptionsfaktors AP-1 gesteuert. Dabei verläuft die Aktivierung von AP-1 nach Inhibierung durch Proteasominhibitoren über die c-Jun-Untereinheit.

Durch funktionelle Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach Proteasominhibierung sekretiertes IL-8 biologisch aktiv ist. IL-8 aus den konditionierten Zellkulturüberständen war in der Lage, neutrophile Granulozyten chemotaktisch zu stimulieren.

Der nachgewiesene Einfluss von Proteasominhibitoren auf das Proliferationsverhalten maligner Lungenepithelzellen, die Möglichkeit regulierend in deren Zellzyklus eingreifen zu können sowie die Regulation inflammatorischer Prozesse durch das sekretierte Chemokin IL-8 bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Entwicklung neuartiger Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von Lungentumorerkrankungen.

6 Literatur

1. Berg,T., Gjoen,T. & Bakke,O. Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem. J.* **307**, 313-326 (1995).
2. Nakagawa,T.Y. & Rudensky,A.Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **172**: 121-129 (1999).
3. Reidlinger,J., Pike,A.M., Savory,P.J., Murray,R.Z. & Rivett,A.J. Catalytic properties of 26 S and 20 S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 24899-24905 (1997).
4. Tanahashi,N. *et al.* Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 14336-14345 (2000).
5. Rechsteiner,M., Realini,C. & Ustrell,V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.* **345**, 1-15 (2000).
6. Baumeister,W., Walz,J., Zuhl,F. & Seemuller,E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380 (1998).
7. Groll,M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
8. Voges,D., Zwickl,P. & Baumeister,W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 1015-1068 (1999).
9. Kohler,A. *et al.* The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* **7**, 1143-1152 (2001).
10. Nussbaum,A.K. *et al.* Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 12504-12509 (1998).
11. Groll,M., Koguchi,Y., Huber,R. & Kohno,J. Crystal structure of the 20 S proteasome:TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J. Mol. Biol.* **311**, 543-548 (2001).
12. Kisselev,A.F. & Goldberg,A.L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.* **8**, 739-758 (2001).
13. Koegl,M. *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-644 (1999).
14. Pickart,C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 503-533 (2001).
15. Adams,J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* **29** 3-9 (2003).
16. Connell,P. *et al.* The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* **3**, 93-96 (2001).

17. Sommer,T. & Jentsch,S. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* **365**, 176-179 (1993).
18. Rolfe,M., Chiu,M.I. & Pagano,M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J. Mol. Med.* **75**, 5-17 (1997).
19. Peters,J.M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**, 931-943 (2002).
20. Baeuerle,P.A. & Baichwal,V.R. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* **65**: 111-137 (1997).
21. Yamamoto,Y. & Gaynor,R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest* **107**, 135-142 (2001).
22. Ghosh,S., May,M.J. & Kopp,E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260 (1998).
23. Verma,I.M., Stevenson,J.K., Schwarz,E.M., Van Antwerp,D. & Miyamoto,S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**, 2723-2735 (1995).
24. Renard,P. *et al.* Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res.* **29**, E21 (2001).
25. Sunwoo,J.B. *et al.* Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1419-1428 (2001).
26. Li,Q. & Verma,I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725-734 (2002).
27. Kretz-Remy,C., Munsch,B. & Arrigo,A.P. NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 43723-43733 (2001).
28. Pahl,H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999).
29. Fiedler,M.A., Wernke-Dollries,K. & Stark,J.M. Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 259-268 (1998).
30. Roebuck,K.A. *et al.* Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 291-298 (1999).
31. Kelner,G.S. *et al.* Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-1399 (1994).
32. Bazan,J.F. *et al.* A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640-644 (1997).
33. Li,L.F. *et al.* Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappaB-inducing kinases. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **285**, L464-L475 (2003).

34. Mastronarde, J.G., Monick, M.M., Mukaida, N., Matsushima, K. & Hunninghake, G.W. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J. Infect. Dis.* **177**, 1275-1281 (1998).
35. Wu, H.M., Wen, H.C. & Lin, W.W. Proteasome inhibitors stimulate interleukin-8 expression via Ras and apoptosis signal-regulating kinase-dependent extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 234-243 (2002).
36. Chang, M.M., Juarez, M., Hyde, D.M. & Wu, R. Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **280**, L107-L115 (2001).
37. Adler, K.B., Fischer, B.M., Wright, D.T., Cohn, L.A. & Becker, S. Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **725**: 128-145 (1994).
38. Koyama, S. *et al.* Procaterol inhibits IL-1beta- and TNF-alpha-mediated epithelial cell eosinophil chemotactic activity. *Eur. Respir. J.* **14**, 767-775 (1999).
39. Lin, Y., Zhang, M. & Barnes, P.F. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* **66**, 1121-1126 (1998).
40. Olszewska-Pazdrak, B. *et al.* Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **72**, 4756-4764 (1998).
41. Roux, P., Alfieri, C., Hrimech, M., Cohen, E.A. & Tanner, J.E. Activation of transcription factors NF-kappaB and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *J. Virol.* **74**, 4658-4665 (2000).
42. Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. & Mattoli, S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1001-1009 (1992).
43. Chanez, P., Enander, I., Jones, I., Godard, P. & Bousquet, J. Interleukin 8 in bronchoalveolar lavage of asthmatic and chronic bronchitis patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **111**, 83-88 (1996).
44. Colasante, A. *et al.* Transforming growth factor beta 1, interleukin-8 and interleukin-1, in non-small-cell lung tumors. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **156**, 968-973 (1997).
45. Yuan, A. *et al.* Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **162**, 1957-1963 (2000).
46. Arenberg, D.A. *et al.* Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest* **97**, 2792-2802 (1996).
47. Rock, K.L. *et al.* 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 (1994).

48. Vinitzky,A., Michaud,C., Powers,J.C. & Orlowski,M. Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry* **31**, 9421-9428 (1992).
49. Adams,J. *et al.* Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 333-338 (1998).
50. Adams,J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **8**, S49-S54 (2002).
51. Kondagunta,G.V. *et al.* Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3720-3725 (2004).
52. Dick,L.R. *et al.* Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J. Biol. Chem.* **271**, 7273-7276 (1996).
53. Ostrowska,H., Wojcik,C., Omura,S. & Worowski,K. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 729-732 (1997).
54. Bogyo,M. *et al.* Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6629-6634 (1997).
55. Loidl,G., Groll,M., Musiol,H.J., Huber,R. & Moroder,L. Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5418-5422 (1999).
56. Greenberg MEaTPB. Identification of newly transcribed RNA. In: F M Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman J A Smith and K Struhl (ed), Current protocols in molecular biology John Wiley&Sons, Inc, New York, 4.10.1-4.10.11., N Y 1997.
57. Jimenez,L.A. *et al.* PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **282**, L237-L248 (2002).
58. Lakshminarayanan,V., Drab-Weiss,E.A. & Roebuck,K.A. H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 32670-32678 (1998).
59. Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M. & Schaffner,W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419 (1989).
60. Oudin,S. & Pugin,J. Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 107-114 (2002).
61. Gerber,A. *et al.* Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo neutrophil functions in nonneutropenic surgical intensive care patients. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 1083-1090 (2000).
62. Rothe,G. *et al.* Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 547-554 (1992).

63. Assfalg-Machleidt, I. *et al.* Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 433-440 (1992).
64. Drexler, H.C., Risau, W. & Konecny, M.A. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J.* **14**, 65-77 (2000).
65. Oikawa, T. *et al.* The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 243-248 (1998).
66. Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. & Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773-785 (1994).
67. Adams, J., Palombella, V.J. & Elliott, P.J. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs* **18**, 109-121 (2000).
68. An, B., Goldfarb, R.H., Siman, R. & Dou, Q.P. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death. Differ.* **5**, 1062-1075 (1998).
69. Adams, J. *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**, 2615-2622 (1999).
70. Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. & Kawashima, S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**, 572-576 (1996).
71. Momose, I. *et al.* Synthesis and activity of tyropeptin A derivatives as potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1733-1742 (2005).
72. Kuhn, D. *et al.* Synthetic peracetate tea polyphenols as potent proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Front Biosci.* **10**, 1010-1023 (2005).
73. Kroll, M. *et al.* The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem. Biol.* **6**, 689-698 (1999).
74. Koguchi, Y. *et al.* TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 105-109 (2000).
75. Schaschke, N., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W. & Moroder, L. Substrate/propeptide-derived endo-epoxysuccinyl peptides as highly potent and selective cathepsin B inhibitors. *FEBS Lett.* **421**, 80-82 (1998).
76. Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. & Wolf, D.H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* **272**, 25200-25209 (1997).
77. Arendt, C.S. & Hochstrasser, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7156-7161 (1997).

78. Kisselev,A.F., Akopian,T.N. & Goldberg,A.L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 1982-1989 (1998).
79. Meng,L. *et al.* Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10403-10408 (1999).
80. Drexler,H.C. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 855-860 (1997).
81. Zhang,W.G. *et al.* Inhibitory effect of ubiquitin-proteasome pathway on proliferation of esophageal carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2779-2784 (2004).
82. An,W.G., Hwang,S.G., Trepel,J.B. & Blagosklonny,M.V. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia* **14** , 1276-1283 (2000).
83. Kumeda,S.I., Deguchi,A., Toi,M., Omura,S. & Umezawa,K. Induction of G1 arrest and selective growth inhibition by lactacystin in human umbilical vein endothelial cells. *Anticancer Res.* **19**, 3961-3968 (1999).
84. Masdehors,P. *et al.* Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br. J. Haematol.* **105**, 752-757 (1999).
85. Orlowski,R.Z. *et al.* Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* **58**, 4342-4348 (1998).
86. Mortenson,M.M., Schlieman,M.G., Virudachalam,S. & Bold,R.J. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib alone and in combination with chemotherapy in the A549 non-small-cell lung cancer cell line. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54**, 343-353 (2004).
87. Ling,Y.H. *et al.* Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1145-1154 (2003).
88. Fan,X.M. *et al.* Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **93**, 481-488 (2001).
89. Geier,E. *et al.* A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**, 978-981 (1999).
90. Glas,R., Bogyo,M., McMaster,J.S., Gaczynska,M. & Ploegh,H.L. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* **392**, 618-622 (1998).
91. Wang,E.W. *et al.* Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 9990-9995 (2000).
92. Grimm,L.M., Goldberg,A.L., Poirier,G.G., Schwartz,L.M. & Osborne,B.A. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **15**, 3835-3844 (1996).
93. Sadoul,R. *et al.* Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J.* **15**, 3845-3852 (1996).
94. Stefanelli,C. *et al.* Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome. *Biochem. J.* **332** (Pt 3), 661-665 (1998).

95. Van Antwerp,D.J., Martin,S.J., Verma,I.M. & Green,D.R. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* **8**, 107-111 (1998).
96. Meriin,A.B., Gabai,V.L., Yaglom,J., Shifrin,V.I. & Sherman,M.Y. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 6373-6379 (1998).
97. Hirose,K. *et al.* Chemokine gene transfection into tumour cells reduced tumorigenicity in nude mice in association with neutrophilic infiltration. *Br. J. Cancer* **72**, 708-714 (1995).
98. Lee,L.F. *et al.* IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J. Immunol.* **164**, 2769-2775 (2000).
99. Singh,R.K., Gutman,M., Radinsky,R., Bucana,C.D. & Fidler,I.J. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* **54**, 3242-3247 (1994).
100. Wille,A. *et al.* Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol. Chem.* **383**, 1291-1296 (2002).
101. Wang,C.Y., Mayo,M.W. & Baldwin,A.S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* **274**, 784-787 (1996).
102. Hipp,M.S. *et al.* Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2208-2217 (2002).
103. Nakayama,K., Furusu,A., Xu,Q., Konta,T. & Kitamura,M. Unexpected transcriptional induction of monocyte chemoattractant protein 1 by proteasome inhibition: involvement of the c-Jun N-terminal kinase-activator protein 1 pathway. *J. Immunol.* **167**, 1145-1150 (2001).
104. Smith,R.S. *et al.* IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* **167**, 366-374 (2001).
105. Laroia,G., Cuesta,R., Brewer,G. & Schneider,R.J. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**, 499-502 (1999).
106. Laroia,G., Sarkar,B. & Schneider,R.J. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1842-1846 (2002).
107. Tebo,J. *et al.* Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 12085-12093 (2003).
108. Holtmann,H. *et al.* Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6742-6753 (1999).
109. Haas,M. *et al.* Effect of proteasome inhibitors on monocytic I kappa B-alpha and -beta depletion, NF-kappaB activation, and cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 395-404 (1998).
110. Petit,F. *et al.* Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. *Biochem. J.* **326**, 93-98 (1997).

111. Curatola,A.M., Nadal,M.S. & Schneider,R.J. Rapid degradation of AU-rich element (ARE) mRNAs is activated by ribosome transit and blocked by secondary structure at any position 5' to the ARE. *Mol. Cell Biol.* **15**, 6331-6340 (1995).
112. Rahman,I., Gilmour,P.S., Jimenez,L.A. & MacNee,W. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol. Cell Biochem.* 239-248 (2002).
113. Karin,M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486 (1995).
114. Newton,R. *et al.* The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1beta-dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1353-1361 (2000).
115. Cuenda,A. *et al.* SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**, 229-233 (1995).
116. Favata,M.F. *et al.* Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18623-18632 (1998).
117. Alcorn,M.J., Booth,J.L., Coggeshall,K.M. & Metcalf,J.P. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J. Virol.* **75**, 6450-6459 (2001).
118. Watanabe,N., Iwamoto,T., Dickinson,D.A., Iles,K.E. & Forman,H.J. Activation of the mitochondrial caspase cascade in the absence of protein synthesis does not require c-Jun N-terminal kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 231-240 (2002).
119. Bellocq,A. *et al.* Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am. J. Pathol.* **152**, 83-92 (1998).
120. Fujisawa,N. *et al.* alpha-Chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 19-26 (2000).
121. Murdoch,C., Monk,P.N. & Finn,A. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* **98**, 36-41 (1999).

Persönliche Daten

Dipl.-Biol. Anke Heimburg

geboren am 17.01.1964

in Magdeburg

verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1970 – 1978 Allgemeinbildende Oberschule

1978 – 1982 Erweiterte Oberschule

1982 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1983 – 1988 **Biologiestudium** an der Humboldt-Universität Berlin

Schwerpunkte: Pflanzenphysiologie

Biochemie

Mikrobiologie

1987 – 1988 **Diplomarbeit** am Institut für PflanzenphysiologieThema: „Untersuchungen zum Einsatz von Medienstabilisatoren auf die Adventivwurzelbildung verschiedener *in-vitro*-Kulturen“

Berufliche Tätigkeit

1982 – 1983 studienvorbereitendes Praktikum; Chemische und Pharmazeutische Werke Fahlberg-List Magdeburg

1988 – 1991 wissenschaftliche Mitarbeiterin; Bereich Mikrobiologie der Chemischen und Pharmazeutischen Fabriken Fahlberg-List Magdeburg

1991 – 1993 wissenschaftliche Mitarbeiterin; Biologisches Labor der Gesellschaft für Arbeitsbeschaffung und Bildung e.V.

1993 – 1995 wissenschaftliche Mitarbeiterin; Landschaftsplanungsbüro Dr. Reichhoff GmbH Dessau

1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin; Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt Sachsen-Anhalt

1999 – 2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin; Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Seit 01.01.2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin; IMTM GmbH Magdeburg

Magdeburg, 12.03.2006