



UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF  
ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN  
III. MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK  
PROF. DR. MED. ROLF A. K. STAHL

**Einfluss der Hemmung des Proteasomen-Komplexes  
auf die proinflammatorischen Effekte der Cyclooxygenase-2  
in glomerulären Mesangiumzellen**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT HAMBURG

VORGELEGT VON:

KATHARINA GROSSER  
AUS HAMBURG

HAMBURG 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.05.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD R. K. Ruckdeschel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>12</b>
1.1 Cyclooxygenasen (COX) und ihre Funktionen	12
1.1.1 Bedeutung der Cyclooxygenase-2 (COX-2)	13
1.1.2 Rolle der COX-2 für Glomerulonephritiden (GN)	14
1.1.3 Überexpression der COX-2 in Mesangiumzellen	15
1.2 Regulation des Chemokin CCL2	15
1.2.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B	16
1.2.2 Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS)	19
1.2.3 Proteasomenhemmer zur Inhibition von NF- $\kappa$ B	20
1.2.4 Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP-1	20
1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung	21
<b>2 Material</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme	23
2.2 Verbrauchsmaterial	24
2.3 Kits	25
2.4 Antikörper	25
2.5 Vektoren	26
2.6 Geräte	26
<b>3 Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 Zelllinien	27
3.1.2 Zellkulturmedien	27
3.1.3 Etablierung der Zelllinien	27
3.1.4 Kultivieren und Passagieren der Zellen	28
3.1.5 Kontaminationsprophylaxe	28
3.1.6 Zellzahlbestimmung	29
3.1.7 Teilsynchronisation der Zellen	29
3.2 Vitalitätsanalyse	29
3.3 Proteinanalyse	30
3.3.1 Isolation von Gesamtprotein aus den Zellen	30

3.3.2	Isolation nukleärer Proteine . . . . .	30
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry . . . . .	31
3.3.4	Immunpräzipitation . . . . .	32
3.3.5	Gelelektrophorese und Immunoblot . . . . .	32
3.3.6	Immundetektion auf der PVDF-Membran . . . . .	33
3.4	Quantitative Real-Time-PCR . . . . .	34
3.4.1	RNA-Isolierung . . . . .	34
3.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration . . . . .	34
3.4.3	cDNA-Synthese . . . . .	34
3.4.4	Quantitative Real-Time-PCR . . . . .	35
3.5	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) . . . . .	35
3.5.1	Extraktion der nukleären Proteinfraction . . . . .	35
3.5.2	Markierung der DNA-Sonden mittels <sup>32</sup> P-Labeling . . . . .	36
3.5.3	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) . . . . .	37
3.5.4	Supershift für NF-κB p50 und NF-κB p65 . . . . .	38
3.6	Luciferase-Assay . . . . .	38
3.6.1	Verwendete NF-κB Reportervektor . . . . .	38
3.6.2	Transformation kompetenter DH5α-Bakterien . . . . .	39
3.6.3	Präparation der Plasmid-DNA . . . . .	39
3.6.4	Transiente Zelltransfektion von COX-2+ und VK . . . . .	40
3.6.5	Luciferase-Assay . . . . .	40
3.7	Immunzytochemie . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1	Vitalitätsanalyse der Zellen . . . . .	42
4.1.1	Inkubation mit den Proteasomenhemmern über 24 h . . . . .	42
4.1.2	Inkubation mit den Proteasomenhemmern und LPS über 6 h . . . . .	43
4.2	Ergebnisse auf Proteinebene: Immunoblot . . . . .	45
4.2.1	Untersuchung der Ubiquitinierung von Gesamtprotein . . . . .	45
4.2.2	Untersuchung des Proteins IκB-α . . . . .	46
4.2.3	Untersuchung der Ubiquitinierung von IκB-α . . . . .	47
4.2.4	Untersuchung des Proteins NF-κB p65 . . . . .	48
4.3	CCL2 Expression . . . . .	50
4.3.1	Zeitkinetik der CCL2 Expression bei Behandlung mit LPS . . . . .	50
4.3.2	Zeitkinetik der Proteasomenhemmer in Kombination mit LPS . . . . .	51
4.3.3	Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Proteasomenhemmer . . . . .	53
4.3.4	Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Proteasomenhemmer in Kombination mit LPS . . . . .	53

4.4	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) . . . . .	55
4.4.1	Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B an die DNA . . . . .	55
4.4.2	NF- $\kappa$ B p50 und p65 Supershift . . . . .	56
4.4.3	Bindungsfähigkeit von AP-1 an die DNA . . . . .	56
4.5	Luciferase-Assay . . . . .	58
4.5.1	Transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B . . . . .	58
4.5.2	Prüfung der Validität des Luciferase-Assay . . . . .	61
4.6	Immunzytochemie . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
	<b>Literatur</b>	<b>74</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>81</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-1	Activator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Activating Transcription Factors
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BP	Blocking Puffer
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Binding Protein
CCL2	CC-Chemokin 2 (MCP-1)
cDNA	Komplementäre DNA (Complementary DNA)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
COX-2+	COX-2-überexprimierende Zellen
Cpm	Counts per minute
CRE	cAMP Response Element
CREB	CRE-binding protein
Ct	Schwellenwert-Zyklus (Threshold Cycle)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
DUBs	Deubiquitylating enzymes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-5-Isothiocynat
g	Gramm; Vielfaches der Erdbeschleunigung (× g)

G	Guanin
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I $\kappa$ B	Inhibitor $\kappa$ B
Ig	Immunglobulin
IH	Immunhistologie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	Immünpräzipitation
k	Kilo
K	Lysin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
luc	Luciferase
m	Meter; Milli
M	Molar
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1; CCL2
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
MG	MG-132
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MLN	MLN-273
MOPS	Morpholinosulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MZ	Mesangiumzellen
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NF-IL6	Nukleärer Faktor-Interleukin 6
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<sup>32</sup> P	<sup>32</sup> Phosphor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RHD	Rel Homology Domain
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
PCAF	p300/CBP-associated factor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TAD	Transaktivierungsdomänen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR-4	Toll-like Rezeptor-4
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$
TPE	TPA-Responsive Element
TrisCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
UV	ultraviolett
V	Volt
VK	Vektorkontroll-Zellen

## Abbildungsverzeichnis

1	Vermittlung der proinflammatorischen COX-2 Effekte . . . . .	18
2	Versuch der Begrenzung proinflammatorischer COX-2 Effekte . . . . .	22
3	Vitalitätsanalyse für MG nach 24 h . . . . .	42
4	Vitalitätsanalyse für MLN nach 24 h . . . . .	43
5	Vitalität der Zellen bei Inkubation mit MG+LPS über 6 h . . . . .	44
6	Vitalität der Zellen bei Inkubation mit MLN+LPS über 6 h . . . . .	44
7	Untersuchung der Ubiquitinierung von Gesamtprotein . . . . .	45
8	Einfluss von MG und MLN auf die Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ . . . . .	46
9	Ubiquitinierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ . . . . .	47
10	Einfluss von MG und MG+LPS auf nukleäres NF- $\kappa$ B p65 . . . . .	48
11	Ubiquitinierung von nukleärem NF- $\kappa$ B p65 . . . . .	49
12	Zeitkinetik der CCL2 Expression für LPS . . . . .	50
13	Zeitkinetik der CCL2 Expression für MG+LPS . . . . .	51
14	Zeitkinetik der CCL2 Expression für MLN+LPS . . . . .	51
15	Wirkung der Konzentration von MG auf die CCL2 Expression . . . . .	52
16	Wirkung der Konzentration von MLN auf die CCL2 Expression . . . . .	52
17	Wirkung von MG+LPS auf die Expression von CCL2 . . . . .	54
18	Wirkung von MLN+LPS auf die Expression von CCL2 . . . . .	54
19	Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA . . . . .	55
20	Supershift für die NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65 . . . . .	57
21	Bindung von AP-1 an die DNA . . . . .	58
22	Induzierbarkeit der Aktivität von NF- $\kappa$ B durch LPS . . . . .	59
23	Einfluss von MG bzw. MLN auf die NF- $\kappa$ B Aktivität . . . . .	60
24	Einfluss von MG+LPS bzw. MLN+LPS auf die NF- $\kappa$ B Aktivität . . . . .	60
25	Einfluss der Zelltransfektion auf die basale CCL2 Expression . . . . .	61
26	Einfluss von LPS auf die CCL2 Expression transfizierter Zellen . . . . .	62
27	CCL2 Expression transfizierter Zellen für MG bzw. MLN . . . . .	62
28	CCL2 Expression transfizierter Zellen für MG bzw. MLN+LPS . . . . .	63
29	Intrazelluläre Verteilung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 in COX-2+ . . . . .	64
30	Begrenzung proinflammatorischer COX-2 Effekte . . . . .	66

## Tabellenverzeichnis

2	Verwendete Chemikalien und Enzyme . . . . .	23
2	Verwendete Chemikalien und Enzyme . . . . .	24
3	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	24
4	Verwendete Kits . . . . .	25
5	Verwendete Primär-Antikörper . . . . .	25
6	Verwendete Sekundär-Antikörper . . . . .	25
7	Verwendete Vektoren . . . . .	26
8	Verwendete Geräte . . . . .	26
9	Verwendete Zellkulturmedien . . . . .	27
10	Verwendetes Behältnis in Abhängigkeit von der Methode . . . . .	28
11	Puffer für die Zellkultur . . . . .	29
12	Puffer für die Vitalitätsanalyse . . . . .	30
13	Puffer für die Isolation von Gesamtprotein . . . . .	30
14	Puffer für die Isolation nukleärer Proteine . . . . .	31
15	Puffer für die Gelelektrophorese und den Immunoblot . . . . .	32
16	Verwendete Antikörper . . . . .	33
17	Puffer für die Immundetektion . . . . .	33
18	Puffer für die RNA-Isolierung . . . . .	34
19	Real-Time-PCR Stufenprotokoll . . . . .	35
20	Verwendete Primerpaare . . . . .	35
21	Puffer für die Extraktion nukleärer Proteine . . . . .	36
22	DNA-Sonden . . . . .	36
23	Puffer und Lösungen für den EMSA . . . . .	38
24	Puffer für die Präparation der Plasmid-DNA . . . . .	40
25	Puffer und Lösungen für den Luciferase-Assay . . . . .	41

# 1 Einführung

## 1.1 Cyclooxygenasen (COX) und ihre Funktionen

MEIST BELEHRT ERST DER VERLUST ÜBER DEN WERT DER DINGE.

Arthur Schopenhauer, 22.02.1788 - 21.09.1860 [42]

Die COX wurde im Jahre 1976 erstmals aus Samenbläschen von Rind und Widder isoliert [8, 24]. Seit der Entdeckung eines zweiten Genproduktes mit Cyclooxygenaseaktivität Anfang der 90er Jahre wird die konstitutiv-exprimierte COX-1 von der induzierbaren COX-2 unterschieden [4, 20, 43]. Zudem ist seit 2002 ein drittes Isoenzym Gegenstand aktueller Untersuchungen. Das Genprodukt der COX-3 wird im Menschen überwiegend kardial und zerebral exprimiert. Aktuelle Literaturempfehlungen zufolge sollte die COX-3 bevorzugt als COX-1b bzw. COX-1 Variante 1 (COX-1V1) bezeichnet werden [1, 54].

Cyclooxygenasen regulieren eine Vielzahl sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse im menschlichen Organismus. An Hand der Effekte, die aus dem Funktionsverlust der COX resultieren, lässt sich die Bedeutung derselben für den menschlichen Organismus abschätzen. Die COX entfaltet ihre Wirkungen über parakrin wirkende Gewebshormone, die sogenannten Prostaglandine. Unter dem Begriff Prostaglandine werden Prostaglandine (PG), Thromboxane sowie das als Prosta-zyklin bezeichnete  $\text{PGI}_2$  zusammengefasst. Als bifunktionelles Schrittmacherenzym der Prostanoidsynthese katalysiert die COX zunächst die oxidative Zyklisierung von freier Arachidonsäure zu dem Zwischenprodukt  $\text{PGG}_2$ . Durch die Peroxidaseaktivität der COX wird  $\text{PGG}_2$  in einem zweiten Schritt zu  $\text{PGH}_2$  überführt [51]. Im Anschluss katalysieren verschiedene Prostaglandin-Synthasen die Umwandlung des instabilen  $\text{PGH}_2$  in die biologisch aktiven Endmetabolite. Welche Prostaglandine produziert werden, variiert in Abhängigkeit von den im jeweiligen Kontext an die COX assoziierten Prostaglandin-Synthasen [3].

Die beiden Gene COX-1 und COX-2 liegen auf Chromosom 9 und 1. Während die Gene mit 22 kb für COX-1 und 8,3 kb für COX-2 in ihrer Größe erheblich voneinander abweichen, unterscheiden sich die Proteine mit einem Molekulargewicht von 70 kDa und einer zu 67% homologen Primärstruktur nur unwesentlich. Beide Isoenzyme sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum sowie im inneren und äußeren Blatt der Kernhülle lokalisiert [44] und katalysieren die gleiche Reaktion

[54]. Die COX-1 ist in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert. Über ihre Endprodukte hat die COX-1 wichtige physiologische Funktionen für die gastrointestinale Integrität der Mukosa, die Plättchenaggregation und die Regulation des renalen Blutflusses [10].

Für die Erkenntnis, dass der Wirkmechanismus von Aspirin und anderen NSAID auf einer Hemmung der COX beruht, wurde Sir John Vane im Jahre 1982 mit einem Nobelpreis ausgezeichnet. NSAID werden als nicht-selektive COX-Inhibitoren klinisch zur Analgesie, Fiebersenkung und Entzündungshemmung eingesetzt. Ferner wird die funktionelle Ausschaltung der COX auch zur Thrombozytenaggregationshemmung therapeutisch genutzt. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Publikationen eine antikanzerogene Wirkung von NSAID insbesondere bei kolorektalen Karzinomen diskutiert [58]. Andere Untersuchungen konnten eine neuroprotektive Wirkung von NSAID bei der Demenz vom Alzheimer-Typ aufzeigen [52].

Aus dem Spektrum unerwünschter Arzneimittelwirkungen von NSAID lassen sich weitere Funktionen der COX im menschlichen Körper ableiten. So kann die Inhibition der COX zur Schädigung der gastrointestinalen Mukosa führen, eine Nierenfunktionsstörung hervorrufen und durch Leukotrien-Shift das sogenannte Analgetika-Asthma auslösen.

Auch wenn das Auftreten kardiovaskulärer Zwischenfälle in Zusammenhang mit Rofecoxib [26, 63] nicht mehr als generelles Problem von COX-2-selektiven Inhibitoren angesehen wird, sondern sich vielmehr aus dem spezifischen Risikoprofil einzelner Substanzen ergibt [46], so liefern diese Beobachtungen doch weitere Evidenz für die umfassende Rolle, die die COX im menschlichen Organismus spielt.

### **1.1.1 Bedeutung der Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

Die COX-2 wurde zunächst als induzierbares Enzym mit rein pathophysiologischer Bedeutung von der ubiquitär exprimierten COX-1 abgegrenzt. Die antiinflammatorische, analgetische sowie antipyretische Wirkung von NSAID wird einer Inhibition der COX-2 zugeschrieben. Bei einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse und Erkrankungen wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis [3] sowie verschiedenen Glomerulonephritiden [19] wurde eine Induktion der COX-2 beobachtet. Weiter konnte auch eine pathophysiologische Rolle der COX-2 bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [52] und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen [58] herausgearbeitet werden.

Die Beobachtung, dass die Defizienz des COX-2 Gens in Mäusen renale Dysplasien, kardiale Fibrosen und Infertilität weiblicher Individuen hervorruft [2], lieferte wichtige Hinweise dafür, dass die COX-2 auch im menschlichen Organismus neben der krankheitsverursachenden Potenz noch physiologische Funktionen haben könnte. So wurde nachgewiesen, dass die COX-2 in verschiedenen humanen Geweben wie in Gehirn [51] und Niere [54] auch konstitutiv exprimiert wird. Die konstitutive Expression in der Niere scheint unter anderem für die Reninsekretion [10] und die Regulation des Salzhaushaltes [7] bedeutsam zu sein.

In der Frühphase inflammatorischer Prozesse wird die Expression der COX-2 in verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Monozyten und Mesangiumzellen massiv hochreguliert [41, 51]. Die COX-2 wird daher zu den sogenannten *Immediate-Early Genes* gezählt [10]. Definitionsgemäß umfasst die Gruppe der *Immediate-Early Genes* zelluläre Gene, deren Transkription innerhalb von Minuten durch extrazelluläre Signalstoffe transient induziert werden kann, ohne dass hierzu eine de novo Proteinsynthese zur Induktion des Genes nötig ist [45, 50]. Die COX-2 wird experimentell durch eine Vielzahl von Substanzen wie LPS, Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine induziert. Durch die Anwesenheit von Glukokortikoiden kann die Induktion der COX-2 durch extrazelluläre Stimuli verhindert werden [10]. Die experimentelle Induzierbarkeit der COX-2 wird durch verschiedene regulatorische Elemente wie eine TATA-Box, ein *cAMP Response Element* (CRE), zwei NF- $\kappa$ B Konsensussequenzen, eines NF-IL6 Motivs sowie einer E-Box vermittelt [25, 49].

### 1.1.2 Rolle der COX-2 für Glomerulonephritiden (GN)

Glomerulonephritiden gehören zu den weltweit häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz, die auch als *End-stage Renal Disease* bezeichnet wird [14]. Diese führt zu einer erheblichen Verminderung der Lebenserwartung, ruft bei betroffenen Patienten eine Vielzahl von Begleit- und Folgeerkrankungen hervor und beeinträchtigt die Lebensqualität gravierend. Zudem verursacht die bei der Gruppe der terminal niereninsuffizienten Patienten erforderliche Nierenersatztherapie erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem [56].

Aus den genannten Gründen ist es von großer klinischer Relevanz, die pathophysiologischen Mechanismen, die Glomerulonephritiden zugrunde liegen, besser zu verstehen. Die Ätiologie von GN ist multifaktoriell und bisher nicht bis ins Detail

verstanden. Verschiedene Formen einer GN wie zum Beispiel die IgA-Nephropathie gehen mit einer starken Mesangiumproliferation einher [14].

Im Rahmen experimenteller und humaner GN wird die COX-2 transient hochreguliert [19]. In vitro kann eine COX-2 Expression in Ratten-Mesangiumzellen durch inflammatorische Mediatoren wie IL1, LPS und Serotonin induziert werden [41]. Die Rolle der COX-2 für die Pathogenese von GN ist jedoch komplex. So scheint die COX-2 nicht nur proinflammatorisch zu wirken, sondern auch resolutionsfördernde Effekte für glomeruläre Entzündungen zu haben. Als möglicher Mechanismus wird die Umschaltung von proinflammatorischen Prostanoiden zu antiinflammatorisch wirksamen COX-2 Metaboliten diskutiert [5].

### **1.1.3 Überexpression der COX-2 in Mesangiumzellen**

Durch Mesangiumzellen, die COX-2 konstitutiv überexprimieren (COX-2+), konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die COX-2 sowohl einen Effekt auf die Expression proinflammatorischer Gene als auch einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat. Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor PDGF führt in COX-2+ Zellen zu einer verminderten Proliferationsfähigkeit, welche auf einen reduzierten Gehalt an Reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt werden konnte [61, 62]. Neben dem Proliferationsverhalten von COX-2+ Zellen wurde in der Arbeitsgruppe der Einfluss einer COX-2 Überexpression auf proinflammatorische Gene wie CCL2 und CCL5 untersucht. Die Behandlung mit LPS bewirkt in den COX-2+ Zellen einen hyperinflammatorischen Effekt, der sich in einer starken Expressionssteigerung proinflammatorischer Gene wie CCL2 oder CCL5 äußert [60].

## **1.2 Regulation des Chemokin CCL2**

Das Chemokin CCL2 gehört zur Familie der CC-Chemokine und wird auch als Monozyten Chemoattraktives Protein-1 (MCP-1) bezeichnet.

CCL2 spielt in vivo bei verschiedenen inflammatorischen Prozessen eine Rolle wie bei der Rheumatoiden Arthritis, Arteriosklerose und GN [31]. Sezerniert wird CCL2 sowohl von leukozytären Zellen wie Monozyten als auch von nicht-leukozytären Zellen wie beispielsweise residenten Nierenzellen [53]. CCL2 entfaltet seine Wirkungen über die Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR11 [57].

Wie die COX-2 wird auch CCL2 zu den *Immediate-Early Genes* gezählt [45]. So wird die Expression von CCL2 durch LPS, PDGF, TNF- $\alpha$  und anderen Mediatoren in verschiedenen Zelltypen induziert [36].

Untersuchungen an Patienten mit entzündlichen Nierenerkrankungen haben ergeben, dass CCL2 im Rahmen inflammatorischer Prozesse glomerulär und tubulär hochreguliert wird. Die Schwere tubulärer Läsionen und das Ausmaß einer monozytären Infiltration der Glomeruli korreliert dabei mit der Konzentration von CCL2 im Urin [35].

Auch experimentell konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von CCL2 und dem Ausmaß einer renalen Schädigung hergestellt werden [53]. CCL2 wurde als entscheidender Faktor bei der Rekrutierung von Monozyten in Glomeruli und in das renale Interstitium identifiziert [40]. Durch Antikörperneutralisation von CCL2 wurde ein günstiger Effekt auf glomeruläre und interstitielle Schäden in experimentellen GN verzeichnet. Darüber hinaus war in einem Modell zur Anti-GBM GN an CCL2 Knockout-Mäusen die monozytäre Infiltration in die Niere vermindert und der renale Parenchymschaden deutlich schwächer ausgeprägt als in untersuchten Wildtyp-Mäusen [13]. In vitro wurde gezeigt, dass die Produktion von CCL2 in glomerulären Mesangiumzellen durch eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert wird [36, 38]. Der Promotor von CCL2 weist Bindungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf, von denen die Konsensussequenzen für NF- $\kappa$ B und AP-1 für die Regulation von CCL2 besonders wichtig sind [34]. Die Induktion von CCL2 in kultivierten Mesangiumzellen wird primär über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bewirkt [27, 60].

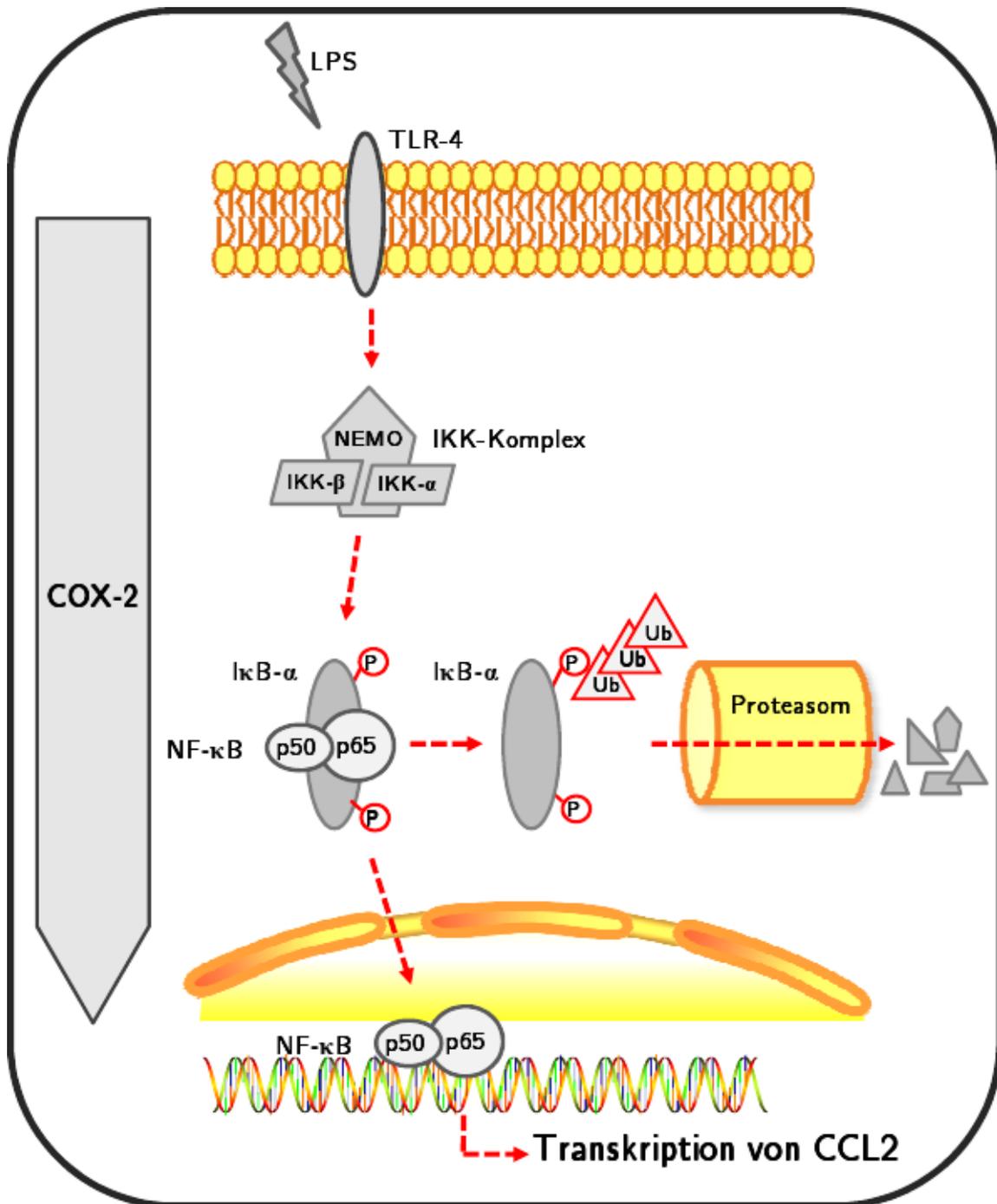
Während eine Vielzahl von Faktoren die Expression und Sekretion von CCL2 fördert, wurden auch Mediatoren identifiziert, die die Expression von CCL2 vermindern. An Modellen zur experimentellen GN konnte in der Ratte gezeigt werden, dass PGE1 und andere COX-Metaboliten als endogene Repressoren von CCL2 fungieren. Diese Beobachtungen stützen die Theorie, dass die COX bei glomerulären Entzündungen auch resolutionsfördernd wirken kann [15, 40].

### **1.2.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B**

Bei der Vermittlung der proinflammatorischen Effekte der COX-2 konnte NF- $\kappa$ B als wichtiger Transkriptionsfaktor identifiziert werden [60]. NF- $\kappa$ B stellt eine Sammelbezeichnung für verschiedene DNA-bindende Dimere aus Proteinen der Rel Familie

dar. Bei Säugetieren werden fünf verschiedene Proteine zur Rel Familie gezählt, die als p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB und c-Rel bezeichnet werden. Die Proteine dieser Familie weisen alle eine als *Rel Homology Domain* (RHD) bezeichnete Domäne auf, welche für die Dimerisation, die Translokation in den Zellkern und für die Bindung an die DNA von Bedeutung ist. Am C-Terminus der RHD liegt eine Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die durch Bindung an Inhibitorproteine der I $\kappa$ B Familie maskiert werden kann [17]. Die NF- $\kappa$ B Untereinheiten p65, RelB und c-Rel weisen zusätzlich Transaktivierungsdomänen auf. Je nachdem, ob ein Dimer eine Transaktivierungsdomäne enthält, kann NF- $\kappa$ B transaktivierend oder reprimierend auf die Expression eines Genes einwirken [21].

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde in zwei verschiedenen in vivo Modellen gezeigt, dass es im Rahmen experimenteller Nephritiden zu einer biphasischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt. Während in der Frühphase glomerulärer Entzündungen p65/p50 Heterodimere im Zellkern dominieren, sind in der Resolutionsphase vorwiegend p50/p50 Homodimere nachweisbar [30]. Im Ruhezustand verhindern p50/p50 Homodimere die Transkription proinflammatorischer Gene wie CCL2. Die Induktion von CCL2 nach Gabe von LPS beruht auf der transaktivierenden Wirkung der NF- $\kappa$ B p50/p65 Heterodimere [28, 48]. Im unstimulierten Zustand liegen p50/p65 Heterodimere überwiegend zytoplasmatisch an das Inhibitorprotein I $\kappa$ B- $\alpha$  gebunden vor [6]. I $\kappa$ B- $\alpha$  ist in der Lage freie NF- $\kappa$ B Dimere aus dem Zellkern ins Zytoplasma zu befördern, da es eine Nukleäre Exportsequenz (NES) besitzt. Die Bindung von LPS an den zellmembranständigen Rezeptor TLR-4 führt über eine intrazelluläre Signalkaskade schließlich zur Aktivierung eines I $\kappa$ B Kinasekomplexes (IKK), der I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphoryliert. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  zieht eine Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  nach sich. Durch den Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$  wird eine NLS von NF- $\kappa$ B demaskiert, so dass NF- $\kappa$ B p50/p65 in den Zellkern transloziert werden kann und durch Bindung an die entsprechenden Konsensussequenzen die Transkription verschiedener Zielgene reguliert (Abb. 1). Zu den Zielgenen von NF- $\kappa$ B gehören proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) sowie die COX-2 [21].



**Abb. 1: Vermittlung der proinflammatorischen COX-2 Effekte**

Die Bindung von LPS an den zellmembranständigen Rezeptor TLR-4 führt in glomerulären Mesangiumzellen zur Aktivierung des Kinasekomplexes IKK, der daraufhin IκB-α phosphoryliert. Die Phosphorylierung von IκB-α bewirkt eine Polyubiquitinierung und konsekutiven proteasomalen Degradation von IκB-α. Nach Dissoziation von seinem Inhibitorprotein kann NF-κB p50/p65 in den Zellkern translozieren und die Transkription proinflammatorischer Zielgenen wie CCL2 induzieren.

### 1.2.2 Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Für die Entdeckung und Charakterisierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) Anfang der 80er Jahre als ein Lysosomen-unabhängiger Abbauweg zellulärer Proteine wurden Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose im Jahre 2004 mit einem Nobelpreis ausgezeichnet. Mittlerweile gilt es als unstrittig, dass die Ubiquitinierung nicht nur den Zweck verfolgt, fehlgefaltete Proteine durch das 26S Proteasom abzubauen, sondern auch weitreichende Effekte auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse hat, ohne hierbei das Proteasom einzubeziehen. So ist die Ubiquitinierung an Protein-Protein-Wechselwirkungen, am intrazellulären Proteinverkehr und an der Genregulation beteiligt [22, 47]. Wie sich der Transfer des aus 76 Aminosäuren bestehenden Peptids Ubiquitin auf ein Zielprotein auswirkt, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Beispielsweise hat eine Monoubiquitinierung andere zelluläre Effekte als eine Polyubiquitinierung [9]. Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger Prozess, in dem Ubiquitin zunächst durch ein als E1 bezeichnetes Enzym aktiviert, und dann auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen wird. Im letzten Schritt der Ubiquitinierung binden das Ubiquitin-beladene Enzym E2 und das Substrat mit hoher Spezifität an eine Ubiquitin-Protein-Ligase E3, die den Ubiquitinrest durch eine Isopeptidbindung an einen Lysinrest des Substrates knüpft. Bei der Polyubiquitinierung wird zu transferierende Ubiquitinbaustein jeweils auf einen Lysinrest des letzten Ubiquitins der entstehenden Ubiquitinkette übertragen [55]. Hierbei ist es relevant, über welchen Lysinrest die einzelnen Ubiquitin-Bausteine miteinander verknüpft sind. Sind die Ubiquitinbausteine beispielsweise über den Lysinrest K63 des vorangehenden Ubiquitins verknüpft, so hat dies einen Einfluss auf Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sind die Ubiquitinbausteine jedoch über den Lysinrest K48 des vorangehenden Ubiquitins verknüpft, so zieht die Polyubiquitinierung eine proteasomale Degradation des markierten Proteins nach sich [22]. Bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist sowohl die Verknüpfung von Ubiquitinbausteinen über K63 als auch über K48 von Bedeutung. So führt die K63 Polyubiquitinierung von NEMO zur Aktivierung des Kinasekomplexes IKK. Die Ubiquitinbausteine bei der Polyubiquitinierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  sind hingegen über den Lysinrest K48 verknüpft und haben demnach eine proteasomale Degradation des Inhibitorproteins zur Konsequenz (Abb. 1) [22, 32].

### 1.2.3 Proteasomenhemmer zur Inhibition von NF- $\kappa$ B

Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation von NF- $\kappa$ B p50/p65 ist die bereits erwähnte proteasomale Degradation seines Inhibitorproteins I $\kappa$ B- $\alpha$ . Wird das Proteasom in seiner Funktion gehemmt, so unterbleibt die Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Hierdurch wird die Dissoziation von NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B- $\alpha$  verhindert und eine Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern limitiert. Durch Proteasomenhemmer kann somit indirekt auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eingewirkt werden [17, 29]. Da NF- $\kappa$ B durch Bindung an cis-Elemente im Promotor seiner Zielgene die Expression diverser proinflammatorischer Gene anregt, finden Proteasomenhemmer experimentell als eine antiinflammatorische Strategie Anwendung [21, 27].

### 1.2.4 Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP-1

Wie NF- $\kappa$ B wird auch AP-1 zu den induzierbaren Transkriptionsfaktoren gezählt, die für die Progression renaler Erkrankungen wichtige regulatorische Funktion übernehmen [23]. Multiple Konsensussequenzen für AP-1 im Promotor von CCL-2 weisen darauf hin, dass neben NF- $\kappa$ B auch der Transkriptionsfaktor AP-1 eine Rolle bei der Regulation von CCL2 spielt [27, 34].

AP-1 stellt eine Sammelbezeichnung für dimere Transkriptionsfaktoren dar, die aus Proteinen der Onkogenfamilien Jun, Fos oder ATF (*Activating Transcription Factors*) zusammengesetzt sind und in der Lage sind, an AP-1 Konsensussequenzen von Zielgenen zu binden. Während Jun-Jun Homodimere sowie Jun-Fos Heterodimere bevorzugt an das *TPA-Responsive Element* (TPE) binden, lagern sich ATF-enthaltende AP-1 Dimere in erster Linie an das CRE im Promotor von Zielgenen an [16].

Zu den durch AP-1 regulierten Genen gehören verschiedene Adhäsionsmoleküle und Chemokine wie beispielsweise IL6 und CCL2. Die Aktivität von AP-1 wird sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell reguliert. Im Rahmen einer entzündlichen Antwort wird das *Immediate-Early Gene* c-fos durch verschiedene Stimuli hochreguliert.

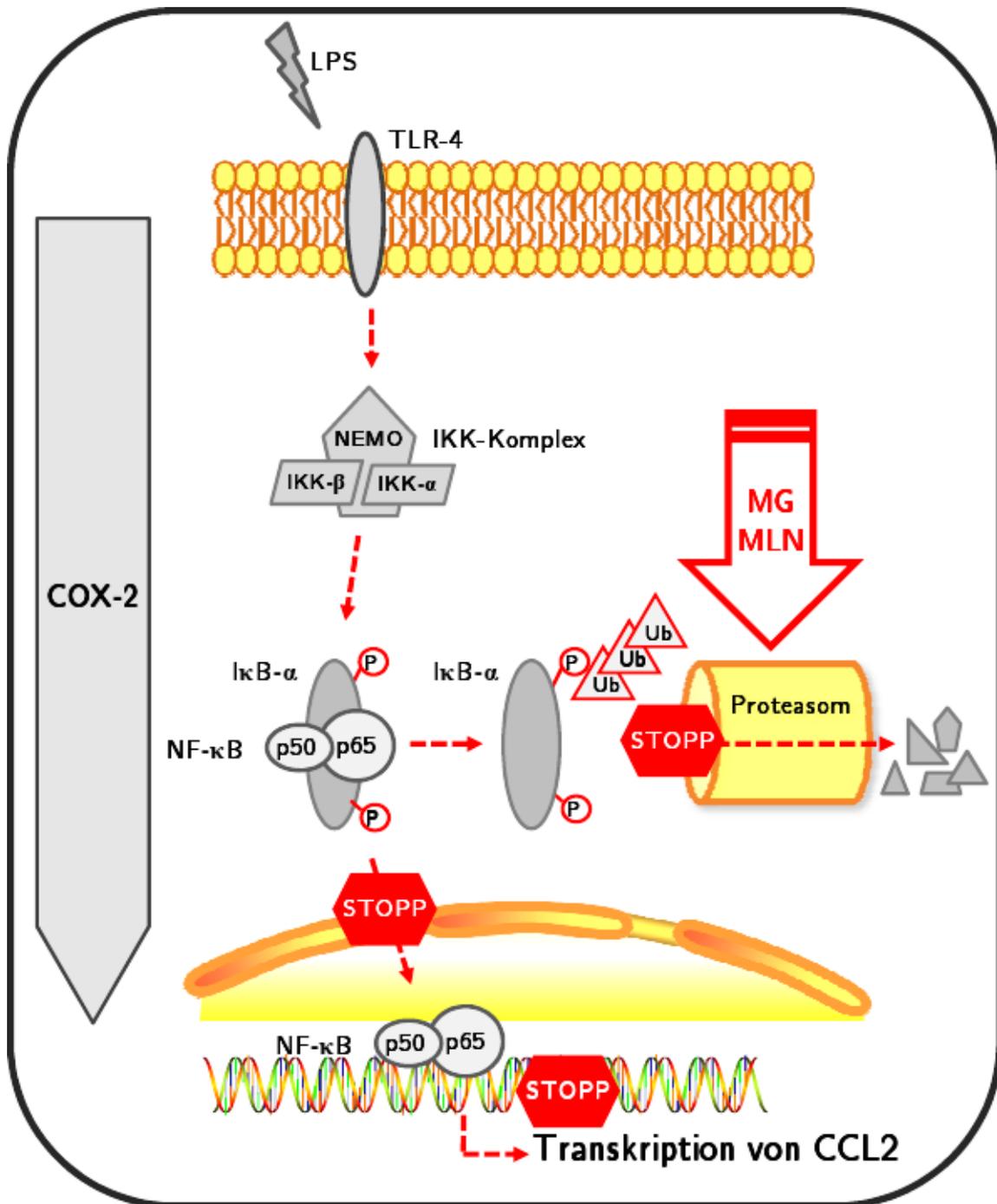
Auf der posttranskriptionellen Ebene wird die Regulation durch verschiedene Kinasen wie JNK und MAPK vermittelt. Die transaktivierende Potenz von AP-1 wird dabei durch Phosphorylierung von Serinresten in der Transaktivierungsdomäne des Proteins gesteuert. Im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B kommt also bei der Regulation von AP-1 der proteasomalen Degradierung keine besondere Rolle zu [34].

### 1.3 Arbeitshypothese und Fragestellung

Glomerulonephritiden gehören weltweit zu den häufigsten Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz [14]. Die Notwendigkeit zu Nierenersatzverfahren bei terminal niereninsuffizienten Patienten hat erhebliche Auswirkungen auf die Lebensqualität des Patienten und ist darüber hinaus auch für das Gesundheitssystem ökonomisch ungünstig [56].

Um langfristig gezielte neue therapeutische Ansätze für Glomerulonephritiden entwickeln zu können, muss zunächst die Pathogenese entzündliche Prozesse in den Glomeruli genauer verstanden werden. Durch die pathogenetische Komplexität und die Vielzahl von Unterformen von GN ist es klinisch hochrelevant, auch Zellkulturarbeiten zu experimentellen GN durchzuführen.

Da sich die COX-2 als pathogenetisch bedeutsames Enzym für die Entstehung von GN erwiesen hat [19], wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, proinflammatorische Effekte der COX-2 durch den Einsatz von Proteasomenhemmern in vitro zu begrenzen. Ziel der Arbeit war es hierbei, zu untersuchen, ob in glomerulären Mesangiumzellen durch den Einsatz von Proteasomenhemmern auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eingewirkt werden kann. Es galt herauszufinden, inwieweit der hyperinflammatorische Effekt, der nach Behandlung mit LPS in COX-2+ Mesangiumzellen zu beobachten ist, zu limitieren ist. Die antiinflammatorische Potenz der Proteasomenhemmer MG-132 (MG) und MLN-273 (MLN) auf COX-2+ Mesangiumzellen sollte hierbei unter besonderer Fokussierung auf die CCL2 Expression bewertet werden (Abb. 2).



**Abb. 2: Versuch der Begrenzung proinflammatorischer COX-2 Effekte**

In COX-2+ wurden die Proteasomenhemmer MG und MLN unter der Vorstellung eingesetzt, dass der hyperinflammatorische Effekt der COX-2 hierdurch begrenzt werden könne. Konkret sollte untersucht werden, inwieweit es unter Einfluss der Proteasomenhemmer durch einen gestörten Abbau des Inhibitorproteins IκB-α zu einer vermindernden Translokation von NF-κB p50/p65 in den Zellkern kommt und somit die CCL2 Expression limitiert wird.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien und Enzyme**

Chemikalie/ Enzym	Hersteller, Ort
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP	Amersham Biosciences, Freiburg
Acrylamid	SERVA, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CDP-Star	Tropix, Bedford, USA
D-Luciferin	SERVA, Heidelberg
D-PBS (CaCl <sub>2</sub> - und MgCl <sub>2</sub> -frei)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Sonden (EMSA)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Promega, Madison, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS (hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Karlsruhe
G418(Geneticin)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycylglycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES (1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB-Medium Kapseln	Q Bio Gene, Heidelberg
Lipofectamine LTX Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
MG-132	Biomol, Hamburg
MicroSpin G-50 Columns	Amersham Biosciences, Freiburg
MLN-273	Millenium, Cambridge, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
MOPS	SERVA, Heidelberg
Natrium Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Nitroblock II	Tropix, Bedford, USA
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien und Enzyme**

Chemikalie/ Enzym	Hersteller, Ort
NuPAGE Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmocin	Tebu, Frankfurt
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
PNK	Fermentas, St. Leon-Rot
PNK forward Puffer	Fermentas, St. Leon- Rot
Poly DI/DC	Amersham Biosciences, Freiburg
Proteaseinhibitormix M	SERVA, Heidelberg
Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
Random Primer (3 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-1640	Invitrogen, Karlsruhe
SOB-Medium Kapseln	Dionova, Hamburg
Sodium Pyruvat MEM	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	BIORAD, München
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
TrisCl	Invitrogen, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 %)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Ultra Cruz Mounting Medium	Santa Cruz, Heidelberg
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders vermerkt, wurde sämtliches Verbrauchsmaterial von dem Hersteller Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

**Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
PVDF-Membran	Amersham Biosciences, London, UK
Röntgenfilm	Fuji, Tokio, Japan
Gelbond PAG Trägerfolie	Biozym, Hessisch Oldendorf
Chamber Slide System	Nunc, Rochester, USA
Combitips	Eppendorf, Hamburg

## 2.3 Kits

**Tab. 4: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller, Ort
Catch and Release V2.0-System	Upstate, Dundee, UK
DC Protein Assay	Bio Rad, München
LIVE/DEAD Cell Vitality Assay	Invitrogen, Karlsruhe
Nucleo Spin RNA Kit II	Machery-Nagel, Düren
Nucleo Bond Plasmid Purification Kit	Machery-Nagel, Düren

## 2.4 Antikörper

**Tab. 5: Verwendete Primär-Antikörper**

Primär-Ak	Spezies	Hersteller	Methode
I $\kappa$ B- $\alpha$ (C-21)	Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg	Immunoblot, IP
I $\kappa$ B- $\alpha$ (H-4)	Mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz, Heidelberg	Immunoblot, Immunzytochemie
Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ (Ser32/36)	Mouse monoclonal IgG1	Cell Signaling, Frankfurt	Immunoblot
NF- $\kappa$ B p50 (C-19)	Goat polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg	EMSA
NF- $\kappa$ B p65 (C-20)	Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg	EMSA, IP, Immunzytochemie
NF- $\kappa$ B p65 (F-6)	Mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz, Heidelberg	Immunoblot
Ubiquitin (P4D1)	Mouse monoklonal IgG1	Santa Cruz, Heidelberg	Immunoblot

**Tab. 6: Verwendete Sekundär-Antikörper**

Sekundär-Ak	Hersteller	Methode
Goat Anti-Rabbit IgG-AP	Southern Biotech, Birmingham, USA	Immunoblot
Goat Anti-Mouse IgG-AP	Southern Biotech, Birmingham, USA	Immunoblot
CY-2 conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	Immunzytochemie
CY-3 conjugated Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	Immunzytochemie

## 2.5 Vektoren

**Tab. 7: Verwendete Vektoren**

Vektor	Beschreibung	Antibiotika-Resistenz	Größe	Referenz
<i>pcDNA 3.1 Neo</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor	Neomycin (G418)	5,4 kb	Invitrogen, Karlsruhe
<i>pcDNA 3.1 Zeo</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor	Zeocin	5,0 kb	Invitrogen, Karlsruhe
<i>pGE-2-hrGFPII</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor	Kanamycin, Neomycin (G418)	5,4 kb	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>pGL3 Basic</i>	Luciferase-Reportervektor	Ampicillin	4,8 kb	Promega, Mannheim
<i>pGL3 Promotor</i>	Luciferase-Reportervektor mit SV40-Promotor	Ampicillin	5,0 kb	Promega, Mannheim
<i>pNF-κB-Luc</i>	Luciferase-Reportervektor mit 5× NF-κB Enhancer	Ampicillin	5,7 kb	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

## 2.6 Geräte

**Tab. 8: Verwendete Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Referenz
Vakuumpzentrifuge	Savant Speed Vac DNA 110	GMI, Ramsey, USA
Entwicklungsmaschine	AGFA Curix 60 Röntgen	Bender, Muttentz, Schweiz
FACS	FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop	IM 35	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Luminometer/ Photometer	Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PCR-Gerät	Uno II	Biometra, Göttingen
Photometer	GeneQuant pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Realtime PCR	ABI Prism Sequence Detection System 7000	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterile Werkbank	NU 440-400E	Nuaire, Plymouth, USA
Szintillationszähler (β-Counter)	Tri-Carb 2900 TR	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zelllinien

Alle auf dieser Arbeit basierenden Experimente wurden an zwei verschiedenen Mesangiumzelllinien (MZ) durchgeführt. Untersucht wurden die Effekte zweier Proteasomeninhibitoren auf MZ, die die Cyclooxygenase-2 (COX-2) stabil überexprimieren (COX-2+). Als Kontrollzelllinie wurden Zellen verwendet, die ausschließlich den Expressionsvektor tragen (VK).

#### 3.1.2 Zellkulturmedien

**Tab. 9: Verwendete Zellkulturmedien**

Medium	Zusammensetzung
Grundmedium	RPMI 1640 15 µM HEPES 1 mM Natriumpyruvat 1 U/ml Penicillin 1 µg/ml Streptomycin
Nährmedium	Grundmedium 10 % FCS
Selektionsmedium für VK Zellen	Grundmedium 20 % FCS 200 µg/ml G418
Selektionsmedium für COX-2+ Zellen	Grundmedium 10 % FCS 200 µg/ml Zeocin
Medium zur Kontaminationsprophylaxe	Selektionsmedium 10 µg/ml Plasmocin
Transfektionsmedium	RPMI-1640 15 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat

#### 3.1.3 Etablierung der Zelllinien

Zur Generierung von COX-2+ Zellen wurden Wildtyp-MZ mit dem mammalen Expressionsvektor *pcDNA3.1 Zeo*, in den vorab ein Ratten-PCR-Konstrukt der COX-2 inkloniert wurde, transfiziert. Die VK Zellen wurden lediglich mit den mammalen

Expressionsvektor *pcDNA3.1* ohne das COX-2 PCR-Konstrukt transfiziert. Um eine Vermischung der Phänotypen beider Zelllinien zu vermeiden, wurde für die VK der Expressionsvektor *pcDNA3.1 Neo* gewählt, der anstelle der Zeocin-Resistenz ein Neomycin-Resistenzgen trägt [61]. Zur Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen, wurde das Medium der COX-2+ mit Zeocin (200 µg/ml) und das Medium der VK mit G418 (200 µg/ml) supplementiert.

### 3.1.4 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Die COX-2+ und VK Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2 – 3 Tage wurden die Zellen mit 7 – 8 ml Selektionsmedium versorgt, welches zur Aufrechterhaltung des COX-2+ und VK Phänotyps mit Zeocin bzw. G418 versetzt wurde. Sobald die Zellen zu etwa 90 – 100% konfluent waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> gewaschen und mit 4 ml einer 1× Trypsin-EDTA-Lösung (in PBS verdünnt) für 3 – 10 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen aus dem Zellverband und von der Kunststoffoberfläche der Zellkulturschale gelöst hatten. Die proteolytische Aktivität des Trypsins wurde sodann durch Zugabe von 6 ml Nährmedium gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert (1200 rpm; 7 min; 4°C), in Selektionsmedium resuspendiert, als Stammkultur weitergeführt und je nach den experimentellen Bedürfnissen ausplattiert (Tabelle 10).

**Tab. 10: Verwendetes Behältnis in Abhängigkeit von der Methode**

Behältnis	Methode	Zellzahl
6-Lochplatte	Vitalitätsanalyse	200 000
	RNA-Isolierung	
	Luciferase-Assay	200 000
Petrischale 6 cm	EMSA	
Petrischale 10 cm	Isolation von Gesamtprotein	
Zellkulturschale 175 cm <sup>2</sup>	Isolation nukleärer Proteine	
Chamber Slides	Immunzytochemie	

### 3.1.5 Kontaminationsprophylaxe

Um einer Infektion der Zelllinien mit Mykoplasmen vorzubeugen, wurden COX-2+ und VK in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche 25 cm<sup>2</sup> in einem Medium zur Kontaminationsprophylaxe kultiviert. In Abständen von etwa 14 Tagen wurde der

gesamte Zellpool durch VK und COX-2+ ersetzt, die in Medium zur Kontaminationsprophylaxe kultiviert wurden. Hierfür wurden die Zellen analog zu den großen Zellkulturschalen mit 3 ml PBS gewaschen, in 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.1.6 Zellzahlbestimmung

Sofern für ein Experiment eine bestimmte Zellzahl von Bedeutung war, wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt und dann entsprechend ausplattiert.

### 3.1.7 Teilsynchronisation der Zellen vor Beginn eines Experimentes

Für die Experimente wurden Mykoplasmen-freie Zellen in Selektionsmedium kultiviert bis sie etwa 80 – 90 % konfluent waren. In Experimenten, die eine spezielle Zellzahl erforderten, wurden die Zellen nach dem Ausplattieren für 24 h auf Selektionsmedium belassen. Zur Angleichung der Zellzyklusphasen wurden die Zellen für 24 h vor Beginn des eigentlichen Experimentes durch FCS-freies Grundmedium teilsynchronisiert. Nach der Teilsynchronisierung erfolgten eine Inkubation mit Proteasomenhemmern oder LPS in FCS-freiem Grundmedium.

**Tab. 11: Puffer für die Zellkultur**

1× PBS	0,2 g/l KCl
	0,2 g/l Kaliumhydrogenphosphat
	8 g/l NaCl
	2,16 g/l Natriumdihydrogenphosphat

## 3.2 Vitalitätsanalyse

Die Vitalitätsanalyse wurde FACS-basiert mit dem *LIVE/DEAD Cell Vitality Assay* durchgeführt. Hierzu wurden je 200 000 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und nach den experimentellen Erfordernissen mit Proteasomenhemmern und LPS behandelt. Nun wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Nun wurden 2 ml Nährmedium zum Stoppen der Trypsinaktivität addiert, die Suspension in 10 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm; 7 min; 4°C). Nun wurden die Zellen in 250 µl Fluoreszenzfarbstofflösung resuspendiert und für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität im *FACS Calibur* für beide Farbstoffe getrennt evaluiert.

**Tab. 12: Puffer für die Vitalitätsanalyse**

Fluoreszenzfarbstofflösung	1× PBS 500 nM C12-Resazurin 10 nM SYTOX Green Stain
1× PBS	siehe 3.1.4

### 3.3 Proteinanalyse

#### 3.3.1 Isolation von Gesamtprotein aus den Zellen

Für die Isolierung von Gesamtprotein wurden die in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm herangezüchteten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen in 150 µl des Zellysepuffers auf Eis aufgeschlossen. Zum Schutz zytoplasmatischer und nukleärer Proteine wurde dem Lysepuffer zusätzlich ein 1× Proteaseinhibitormix und der Proteasomeninhibitor MLN (10 µM) zugesetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurde das Zellysat in Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 4 °C rotiert. Im Anschluss wurden nicht gelöste Zellbestandteile abzentrifugiert (12 000 rpm; 5 min; 4 °C) und der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in neue Reaktionsgefäße überführt.

**Tab. 13: Puffer für die Isolation von Gesamtprotein**

Zellysepuffer	50 mM HEPES 140 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 10 % Glycerol
3× DTT-Probenpuffer	187,5 mM TrisCl pH 6,8 6 % SDS 30 % Glycerol 150 mM DTT 0,3 % Bromphenolblau
1× PBS	siehe 3.1.4

#### 3.3.2 Isolation nukleärer Proteine

Um genügend Ausgangsmaterial für die Analyse nukleärer Proteine zu erhalten, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 175 cm<sup>2</sup> ausplattiert. Zunächst wurden die Zellen mit 15 ml PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> gewaschen und mit 12 ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Durch Zugabe von 15 ml Nährmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Nun wurden die Zellen pellettiert (1200 rpm; 5 min;

4 °C), in 2 ml eines 0,5 M Sucrosepuffers resuspendiert und durch eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm mechanisch lysiert. Als nächstes wurden 2 ml eines 2 M Sucrosepuffers zu dem Zellysat gegeben und durch Invertieren vermischt. Um die Zellkerne aus dem Zellysat aufzureinigen wurde eine Zentrifugation über ein Sucrosekissen aus 2 M Sucrosepuffer durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 2 ml des Zellysates in Zentrifugationsröhrchen auf 4 ml 2 M Sucrosepuffer geschichtet und die Zellkerne durch das Sucrosekissen abzentrifugiert (30 000 × g; 45 min; 4 °C). Um aus den Zellkernen die nukleäre Proteinfraction zu extrahieren wurde das Pellet in 200 µl Kernextraktionspuffer resuspendiert.

**Tab. 14: Puffer für die Isolation nukleärer Proteine**

0,5 M Sucrosepuffer	0,32 M Sucrose 2 mM Mg <sub>2</sub> Acetat 3 mM CaCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 10 mM TrisCl pH 8,0 1 mM DTT 0,1 % Triton-X
2 M Sucrosepuffer	2 M Sucrose 5 mM Mg <sub>2</sub> Acetat 0,1 mM EDTA 10 mM TrisCl pH 8,0 1 mM DTT
Kernextraktionspuffer	20 mM HEPES 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA
1× PBS	siehe 3.1.4

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *DC Protein Assay*. Hierzu wurden zu 5 µl einer Probe unbekannter Proteinkonzentration jeweils 25 µl Lösung A (sofern in der Probe ein Detergenz enthalten war, wurde Lösung A im Verhältnis 1: 50 mit Lösung S versetzt) und 200 µl der Lösung B pipettiert. Zusätzlich wurde ein BSA-Proteinstandard (0,63 µg/µl; 1,25 µg/µl; 2,5 µg/µl; 5 µg/µl; 10 µg/µl) mitgeführt. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur, erfolgte die Bestimmung der Optischen Dichte bei 550 nm im *Mithras LB 940*.

### 3.3.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) von I $\kappa$ B- $\alpha$  und NF- $\kappa$ B p65 wurde mit dem *Catch and Release V2.0*-System nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Für die I $\kappa$ B- $\alpha$  IP wurden 500  $\mu$ g isolierten Gesamtproteins und 2  $\mu$ g I $\kappa$ B  $\alpha$  (C-21) Antikörper eingesetzt. Für die IP von p65 wurden 150  $\mu$ g isolierten nukleären Proteins und 10  $\mu$ g NF- $\kappa$ B p65 (C-20) Antikörper auf die vom Hersteller bereitgestellten Säulen aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 10  $\mu$ l Antibody Capture Affinity Ligand hinzugegeben. Um eine optimale Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die Matrix zu ermöglichen, wurden die Säulen über Nacht bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag, wurde das Immunpräzipitat mit 55  $\mu$ l Denaturing Elution Buffer, der direkt vor Gebrauch mit 5 %  $\beta$ -ME versetzt wurde, von der Matrix gelöst. Für die Gelelektrophorese wurden 25  $\mu$ l des Eluates eingesetzt, was einer Ausbeute von 250  $\mu$ g Gesamtprotein aus der I $\kappa$ B- $\alpha$  IP und einer Ausbeute von 75  $\mu$ g nukleären Proteins aus der NF- $\kappa$ B p65 IP entspricht.

### 3.3.5 Gelelektrophorese und Immunoblot

Für die Immunoblot-Analyse von Gesamtprotein wurden 50  $\mu$ g Gesamtprotein mit 1/3 des Gesamtvolumens an 3 x DTT-Probenpuffer versetzt. Dann wurden die Proteinproben für 10 min im Heizblock bei 95 °C denaturiert und auf ein Bis-Tris-Gel (4 – 12 %; 10 %; 12 %) aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde jeweils ein Molekulargewichtsmarker (14,3 – 220 kDa) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1 $\times$  Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200 V für die Dauer einer Stunde. Im Anschluss wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> in 90 min auf eine PVDF-Membran transferiert, die zuvor in Methanol aktiviert und mit Transferpuffer äquilibriert worden war.

**Tab. 15: Puffer für die Gelelektrophorese und den Immunoblot**

20 $\times$ Laufpuffer	121,2 g/l Tris
	220 g/l SDS
	209,6 g/l MOPS
	6 g/l EDTA
Immunoblot Transferpuffer	3,029 g/l Tris
	15,014 g/l Glycin
	20 % Methanol

### 3.3.6 Immundetektion auf der PVDF-Membran

Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und so den Hintergrund durch unselektive Antikörperbindung zu reduzieren, wurde die Membran zunächst für 4 – 6 h bei RT mit Blocking Puffer (BP) behandelt. Dann wurde der Primär-Antikörper (Primär-Ak) in BP über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. In Tabelle 16 sind die verwendeten Primär-Ak mit deren Verdünnungen in BP aufgeführt.

**Tab. 16: Verwendete Antikörper**

Primär-Ak	Spezies	Verdünnung	Sekundär-Ak
I $\kappa$ B- $\alpha$ (H-4)	Mouse	1 : 500	Goat Anti-Mouse IgG-AP
NF- $\kappa$ B p65 (F-6)	Mouse	1 : 500	Goat Anti-Mouse IgG-AP
Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$	Mouse	1 : 1 000	Goat Anti-Mouse IgG-AP
Ubiquitin	Mouse	1 : 500	Goat Anti-Mouse IgG-AP

Am nächsten Tag wurden Antikörper-Rückstände durch zweimaliges Waschen mit TBS-T über 10 min entfernt und die Membran für eine Stunde mit einem AP-konjugierten Sekundär-Ak (1 : 3 500 in BP) bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran mit TBS-T für 2  $\times$  30 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte mit einem Assay-Puffer eine Umpufferung auf alkalisches Milieu (2  $\times$  5 min). Als Chemolumineszenz-Substrat für die an den Sekundär-Ak gekoppelte AP wurde das Agens CDP Star verwendet. Hierzu wurden 500  $\mu$ l CDP Star mit 25  $\mu$ l Nitroblock II versetzt und zwischen zwei Folien für 5 min mit der Membran inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Exposition von 5 – 30 min mit einem Röntgenfilm.

**Tab. 17: Puffer für die Immundetektion**

Blocking Puffer (BP)	7,5 % Trockenmilch in TBS-T
Assay-Puffer (pH 9,6)	10 mM TrisCl
	150 mM NaCl
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1 $\times$ TBS-T (pH 7,6)	137 mM NaCl
	20 mM TrisCl
	0,1 % Tween 20

## 3.4 Quantitative Real-Time-PCR

### 3.4.1 RNA-Isolierung

Die Aufreinigung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mit dem *Nucleo Spin RNA Kit II* nach den Empfehlungen des Herstellers. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml 1× PBS gewaschen, in 350 µl RA1 Puffer (1 % β-ME) lysiert, auf die NucleoSpin-Filter aufgetragen und für 1 min bei 11 000 × g zentrifugiert. Nach Zugabe von 350 µl 70 % Ethanol, wurde das homogenisierte Lysat auf die Nucleo Spin Säulen geladen und für 30 s bei 11 000 × g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule mit 350 µl MDB Puffer entsalzt und für 1 min bei 11 000 × g zentrifugiert. Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurden nun 9,5 µl DNaseI (1 : 10 in DNase Puffer) direkt auf die Säulen gegeben. Nach 15 min wurde der DNase-Verdau durch Zugabe von 200 µl der Pufferkomponente RA2 und eine Zentrifugation über 30 s bei 11 000 × g gestoppt. Im Folgenden wurde die Säulen noch zweifach mit der Pufferkomponente RA3 gewaschen (600 µl bzw. 250 µl), bevor die RNA mit 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert wurde.

**Tab. 18: Puffer für die RNA-Isolierung**

1× PBS	siehe 3.1.4
--------	-------------

### 3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben 1 : 20 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV-photometrisch gegen dH<sub>2</sub>O bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm.

### 3.4.3 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der aufgereinigten Gesamt-RNA in cDNA wurden jeweils 200 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Hierzu wurden die Proben zunächst mit 1 µl Random Hexamer Primer (100 ng/µl) und 1 µl eines dNTP-Mix (10 mM) bei 65 °C für 5 min inkubiert. Nun wurden jedem Ansatz 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 0,5 µl RNase Out (40 U/µl) hinzugefügt und die cDNA in 50 min bei 37 °C und 15 min bei 70 °C synthetisiert.

### 3.4.4 Quantitative Real-Time-PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR wurden pro Ansatz 6,25 µl SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix mit 2,25 µl dH<sub>2</sub>O und mit 1,25 µl des Forward- und Reverse-Primers zusammenpipettiert und in ein Loch der PCR-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurden 1,5 µl der cDNA hinzugegeben. Auf Grund der mengenmäßigen Überlegenheit der ribosomalen RNA wurde die cDNA für das 18S-rRNA-Referenzgen vorab 1 : 500 verdünnt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die Quantitative Real-Time-PCR erfolgte nach einem dreistufigen Protokoll (Tabelle 19) mit einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Homogenität amplifizierter PCR-Produkte.

**Tab. 19: Real-Time-PCR Stufenprotokoll**

Stufe	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1	1	50 °C	2 min
2	1	95 °C	10 min
3	40	95 °C	15 s
		60 °C	1 min

Die Berechnung der CCL2 Expression erfolgte nach der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode mit 18S-rRNA als Referenzgen, um etwaige Schwankungen im RNA-Gehalt der Proben einzubeziehen. Die Sequenzen für die verwendeten Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die *P*-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt (exakter Wert nach Fisher).

**Tab. 20: Verwendete Primerpaare**

Primer	Orientierung	Sequenz
CCL2 (Ratte)	Forward	5' CTCAGCCAGATGCAGTTAATG 3'
	Reverse	5' TTCTCCAGCCGACTCATTGG 3'
18S rRNA (Ratte)	Forward	5' CACGGCCGGTACAGTGAAAC 3'
	Reverse	5' AGAGGAGCGAGCGACCAAA 3'

## 3.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

### 3.5.1 Extraktion der nukleären Proteinfraction

Für die Präparation von nukleären Extrakten wurden die Zellen zunächst mit 3 ml PBS gewaschen, 400 µl Lysepuffer addiert und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers

in Reaktionsgefäße überführt. Dem Lysepuffer wurden zum Schutz vor oxidativen Einflüssen und dem Abbau der Kernproteine DTT (1 mM) und ein 1× Proteaseinhibitormix zugesetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis, erfolgte der Aufschluss der Zellen durch Zugabe von 25 µl 10 % NP-40. Um die bei der Zellyse intakt gebliebenen Nuclei von den zytoplasmatischen Proteinen abzutrennen, wurden die Proben für 15 s gevortext und dann umgehend zentrifugiert (12 000 rpm; 30 s; 4 °C). Nachfolgend wurde das Pellet in 50 µl Kernextraktionspuffer resuspendiert und für 15 min unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zum Schutz der Proteine wurde auch dem Kernextraktionspuffer der 1× Proteaseinhibitormix und 1 mM DTT zugesetzt. Durch Zentrifugation bei 12 000 rpm (4 min; 4 °C) wurden die im Überstand gelösten Kernproteine von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Der Überstand mit wurde in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung auf –80 °C gelagert.

**Tab. 21: Puffer für die Extraktion nukleärer Proteine**

Lysepuffer	10 mM HEPES 7,5 pH 7,9
	10 mM KCl
	0,1 mM EDTA
	0,1 mM EGTA
Kernextraktionspuffer	siehe 3.3.2

### 3.5.2 Markierung der DNA-Sonden mittels <sup>32</sup>P-Labeling

Die Sequenzen der für den EMSA verwendeten DNA-Sonden sind in Tabelle 22 aufgeführt.

**Tab. 22: DNA-Sonden**

Protein	Orientierung	Sequenz
AP-1	Sense	5' GATCGAACTGACCGCCCGCGGCCCGT 3'
	Antisense	5' ACGGGCCGCGGGCGGTCAGTTCGATC 3'
NF-κB	Sense	5' GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3'
	Antisense	5' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3'

Zur Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide wurde die γ-Phosphatgruppe von [γ-<sup>32</sup>P] ATP mit Hilfe des Enzyms T4-Polynucleotid-Kinase (PNK) auf die DNA-Sonden transferiert. Hierzu wurden 1 µl PNK (10 U/µl), 2 µl eines 10× PNK Forward Puffers sowie 2,5 µl [γ-<sup>32</sup>P] ATP (Aktivität 25 µCi) zu 200 ng der anneal-ten Oligonukleotide addiert. Zur Übertragung der Phosphatgruppe des ATP auf das

5'-Hydroxyl-Ende wurden die Sonden zunächst für 30 min bei 37°C und dann für 10 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden die markierten Sonden über MicroSpin G-50 Säulen zentrifugiert (3000 rpm; 2 min), um überschüssiges [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP zu entfernen. Zur Bestimmung der Aktivität wurde 1  $\mu\text{l}$  des Eluates entnommen, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler ( $\beta$ -Counter) analysiert. Die Aktivität der markierten Sonden wurde mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 100 000 Counts/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 3.5.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für den EMSA wurden 5  $\mu\text{g}$  nukleären Extraktes mit 4  $\mu\text{l}$  5 $\times$  Shiftpuffer, sowie 2  $\mu\text{l}$  Poly-DI/DC zur Absättigung von unspezifisch an die DNA-bindenden Proteinen versetzt. Nun wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -markierter Sonde addiert. Als nächstes wurden zu allen Ansätzen 2  $\mu\text{l}$  eines 10 $\times$  DNA-Loading Puffer gegeben und das Gesamtvolumen mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 20  $\mu\text{l}$  eingestellt. Zur Ausbildung einer Bindung zwischen den Oligonukleotid-Sonden und im nukleären Extrakt vorhandenen NF- $\kappa\text{B}$  bzw. AP-1 wurden die Ansätze dann für 30 min bei RT inkubiert. Für die Gelelektrophorese wurde ein 17,5 cm  $\times$  21 cm großes 4% Acrylamid-Gel in einer Gelapparatur an eine Gelbond PAG Trägerfolie polymerisiert und für mindestens 30 min getrocknet. Zum Schutz des Probenlaufes vor Verunreinigungen und zur Temperierung des Gels wurde eine Präelektrophorese in 1 $\times$  TBE bei 200 V für 20 min durchgeführt. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation wurden die Proben auf das Polyacrylamid-Gel geladen. Der Elektrophoreselauf erfolgte zunächst über 30 min bei 200 V und dann nach Sicht bei 250 V, bis der Farbstoff Bromphenolblau das Gel zu 3/4 durchlaufen hatte. Im Anschluss wurde das Gel getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei  $-80^\circ\text{C}$  für 6 – 120 h exponiert.

**Tab. 23: Puffer und Lösungen für den EMSA**

5× Shiftpuffer	90 mM HEPES pH 7,9 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 200 mM NaCl 1 mM DTT 0,5 mM PMSF 15 % Glycerol
10× DNA Ladepuffer	0,05 % Bromphenolblau 100 mM EDTA 50 % Glycerol 0,05 % Xylencyanol FF
1× TBE	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0
4 % Polyacrylamid-Gel	31,6 mg/ml Glycerol 1× TBE 4 % Polyacrylamid 0,075 % APS 0,083 % TEMED

### 3.5.4 Supershift für NF- $\kappa$ B p50 und NF- $\kappa$ B p65

Sofern für ein NF- $\kappa$ B Supershift für NF- $\kappa$ B p50 oder NF- $\kappa$ B p65 durchgeführt werden sollte, wurde nach der 30-minütigen Inkubation der Proben mit den markierten Sonden 4  $\mu$ l des NF- $\kappa$ B p50 bzw. NF- $\kappa$ B p65 (C-20) Antikörpers zu den Ansätzen addiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das weitere Prozedere erfolgte analog zu dem klassischen Gelshift.

## 3.6 Luciferase-Assay

### 3.6.1 Verwendete NF- $\kappa$ B Reportervektor

Der verwendete NF- $\kappa$ B Reportervektor zeichnet sich durch fünf NF- $\kappa$ B Enhancer-Kassetten aus, die dem Luciferase-Gen vorgeschaltet sind. Um ein Maß für die Transfektionseffizienz der Ansätze zu erhalten, wurden die Zellen zusätzlich mit einem *hrGFP*II-Expressionsvektor transfiziert.

### 3.6.2 Transformation kompetenter DH5 $\alpha$ -Bakterien

Zunächst wurden kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien auf Eis aufgetaut. Dann wurden 20  $\mu\text{g}$  der Plasmid-DNA zu den Bakterien addiert und vorsichtig gemischt. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen wurde durch einen Hitzeschock über 90 s im Wasserbad bei 42°C provoziert. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium erfolgte eine Inkubation im Schüttelbrutschrank (37°C) für 1 h. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe eines Drigalskispatels auf Agarplatten ausplattiert, die in Abhängigkeit von dem verwendeten Plasmid entweder mit Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder mit Kanamycin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt worden waren. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden die Agarplatten über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert. Um genug Ausgangsmaterial für eine Plasmid-Midi-Präparation zu erhalten, wurden am Folgetag die Bakterien in Flüssigkultur überführt. Hierzu wurden 100 ml sterilen LB-Flüssigmediums mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Ampicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. Kanamycin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und mit einer Bakterienkolonie der Agarplatte angeimpft. Zum Heranzüchten wurden die Bakterienkulturen über Nacht im Schüttelbrutschrank (200 rpm; 37°C) inkubiert.

### 3.6.3 Präparation der Plasmid-DNA

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *NucleoBond Plasmid Purification* Kit. Für die Plasmid-Aufreinigung wurde nach den Angaben des Herstellers für High-Copy Plasmide verfahren. Für eine Midi-Präparation wurden 50 ml einer deutlich getrübbten Bakteriensuspension eingesetzt. Zunächst wurden die Bakterien bei 3500 rpm bei 4°C für 10 min pelletiert und in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 und S3, wurde die Suspension gefiltert und auf eine mit Puffer N1 äquilibrierte Säule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit 10 ml Puffer N3 gewaschen. Eluiert wurde in 5 ml des Puffers N5. Durch Zugabe von 4 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12 000 rpm und 4°C über 30 min. Das erhaltene Pellet wurde in 70 % Ethanol aufgenommen und erneut abzentrifugiert (12 000 rpm; 10 min). In einer Vakuumzentrifuge wurde die erhaltene Plasmid-DNA evaporiert und in 75  $\mu\text{l}$  1 $\times$  TE-Puffer gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 100 die Bestimmung der Optischen Dichte bei 230 nm, 260 nm, 280 nm sowie 320 nm. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

**Tab. 24: Puffer für die Präparation der Plasmid-DNA**

1× TE	10 mM TrisCl pH 8,0 1 mM EDTA
-------	----------------------------------

### 3.6.4 Transiente Zelltransfektion von COX-2+ und VK

Für die Transfektion wurden 200 000 Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Nun wurde eine Kotransfektion von 1,25 µg des NF-κB-Luciferaseplasmides mit 1,25 µg *pGE-2-hrGFPII*-Plasmid durchgeführt. Zur internen Kontrolle wurden außerdem Zellen mit 1,25 µg der Luciferase-Reporterplasmide *pGL3 Basic* und *pGL3 Prom* jeweils mit 1,25 µg des *pGE-2-hrGFPII*-Plasmids kotransfiziert. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl Opti-MEM mit 2,5 µg Plasmid-DNA und 6,25 µl Lipofectamine LTX Reagenz versetzt und zur Prä-Komplexierung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu etwa 60 % konfluenten Zellen mit Transfektionsmedium gewaschen. Nun wurden 1,5 ml Transfektionsmedium vorgelegt, 480 µl des Plasmid-Lipofectamine-Ansatzes hinzugegeben und mit den Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert.

### 3.6.5 Luciferase-Assay

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 55 µl Luciferase-Lysepuffer aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden über Nacht bei 4 °C gelagert oder für einige Tage auf -20 °C überführt. Für die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 25 µl des Zelllysates mit 90 µl ATP-Lösung versetzt. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität in Gegenwart von ATP wurde in weißen 96-Lochplatten vorgenommen. Hierzu wurden über einen im Luminometer integrierten Injektor 25 µl Luciferin-Lösung zu den Proben addiert und die Lumineszenz über 10 s gemessen. Als Maß für die Transfektionseffizienz, wurde in einer schwarzen 96-Lochplatte zusätzlich die Fluoreszenz der Proben mit einem FITC Anregungs- und Emissionsfilter bestimmt. Zur Bereinigung der erhobenen Lumineszenz-Daten um Schwankungen in der Transfektionseffizienz wurde in der Auswertung des Luciferase-Assay die Lumineszenz einer Probe jeweils auf die Fluoreszenz derselben Probe bezogen.

**Tab. 25: Puffer und Lösungen für den Luciferase-Assay**

ATP-Lösung (pH 7,8)	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EGTA 15 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM DTT 2 mM ATP
Luciferase-Lysepuffer	25 mM Glycylglycin pH 7,8 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EGTA 1 mM DTT 1 % Triton X-100
Luciferin-Lösung	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EGTA 2 mM DTT 0,4 mM D-Luciferin

### 3.7 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden die Zellen auf 2er-Chamber Slides ausgesät. Nach Behandlung mit LPS und MG wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Kammern vorsichtig abgelöst und die Zellen für 10 min in Methanol 20 °C fixiert. Dann wurden die Objektträger unter de Abzug für etwa 5 min getrocknet. In einer feuchten Kammer wurden im Anschluss für 10 min unspezifische Bindungsstellen in den fixierten Zellen mit 600 µl Blocking Puffer (1 % BSA in PBS) maskiert. Die Demaskierung der Antigen-Bindungsstelle erfolgte durch Inkubation mit 200 µl des verdünnten Primär-Ak über Nacht bei 4 °C. Für die Untersuchung der p65-Untereinheit wurde der NF-κB p65 Antikörper (C-20) in einer Verdünnung von 1 : 100 in Blocking Puffer eingesetzt. Am Folgetag wurden die Objektträger zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann für 35 min mit 200 µl des verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundär-Ak inkubiert. Als Sekundär-Ak wurde CY-2 Donkey Anti-Rabbit IgG in einer Verdünnung von 1 : 300 eingesetzt. Um Rückstände nicht-gebundenen Sekundär-Ak zu entfernen wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde ein Tropfen des Ultra Cruz Mounting Medium auf die fixierten Zellen gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Nun wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 200× und 400× Vergrößerung betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vitalitätsanalyse der Zellen

#### 4.1.1 Inkubation mit den Proteasomenhemmern über 24 h

Teilsynchronisierte COX-2+ und VK Zellen wurden über 24 h mit dem Proteasomenhemmer MG oder MLN (1  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) in serumfreiem Medium inkubiert. Nachfolgend wurde die Vitalität der Zellen mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen durchflusszytometrisch bestimmt.

Zum Zeitpunkt 24 h wurde bei allen eingesetzten Konzentrationen mikroskopisch keine Beeinträchtigung des intakten Monolayers beobachtet. In der FACS-Vitalitätsanalyse zeigten sich für den Hemmer MG über 90 % der analysierten Zellen ohne morphologische oder metabolische Auffälligkeiten. Für den Hemmer MLN betrug der Anteil an vital klassifizierten Zellen bei allen eingesetzten Konzentrationen über 80 %. Ferner wurde kein signifikanter Unterschied in der Vitalität von VK und den COX-2+ festgestellt (Abb. 3, Abb. 4).

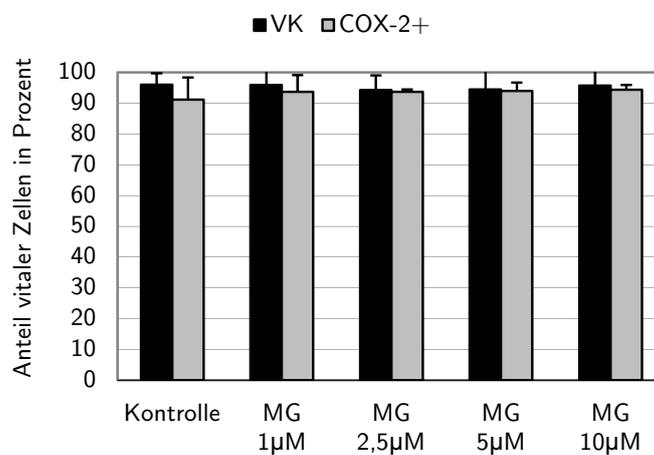
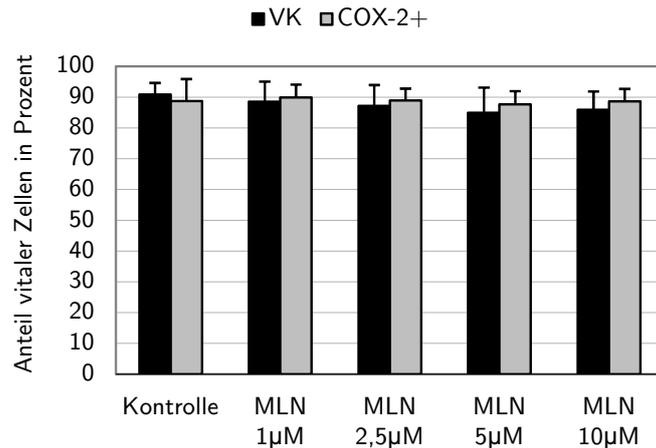


Abb. 3: Vitalitätsanalyse für MG nach 24 h



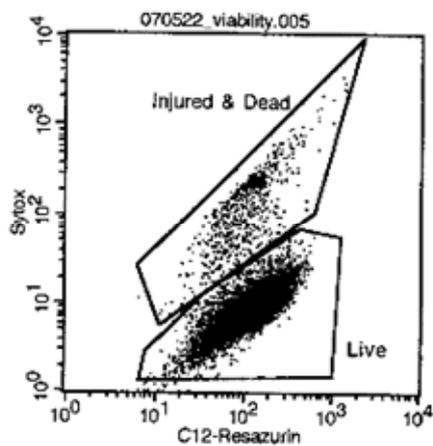
**Abb. 4: Vitalitätsanalyse für MLN nach 24 h**

**Abb. 3 und Abb. 4:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 24 h mit den Proteasomeninhibitoren MG (Abb. 3) bzw. MLN (Abb. 4) in Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM inkubiert. Im Anschluss wurde eine FACS-basierte Vitalitätsanalyse mit zwei getrennt evaluierten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt.

#### 4.1.2 Inkubation mit den Proteasomenhemmern und LPS über 6 h

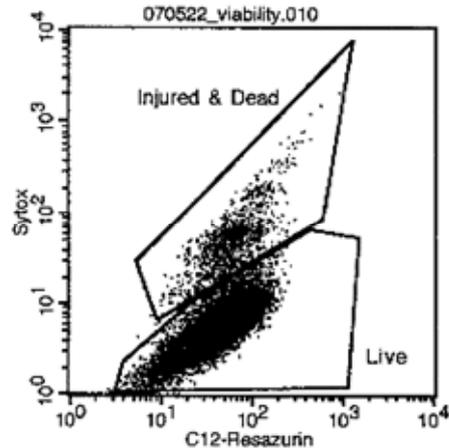
In der vorliegenden Arbeit waren primär die Effekte der Proteasomenhemmer in der Akutphase einer induzierten Entzündung von Interesse. Deshalb wurde auch die Vitalität von COX-2+ und VK Zellen analysiert, die lediglich für 6 h, dafür aber mit einer Kombination von MG bzw. MLN (10 µM) und LPS (1 µg/ml) behandelt wurden.

Bei Kombination der Proteasomenhemmer mit LPS über 6 h präsentierten sich über 90 % der COX-2+ und VK Zellen morphologisch und metabolisch unauffällig (Abb. 5 und Abb. 6). Der Anteil vitaler Zellen belief sich für MG+LPS bei den COX-2+ auf 92,0 % und bei VK auf 96,1 % (Abb. 5). Für MLN+LPS wurden 92,5 % der COX-2+ und 95,1 % der VK als vital eingestuft (Abb. 6).



**VK**

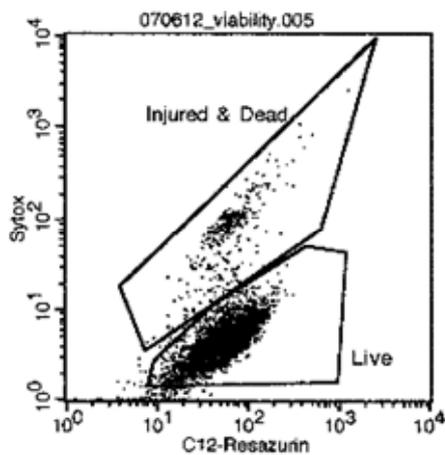
Region	Events	gesamt
Live	96 133	96,13 %
Injured & Dead	3 673	3,67 %



**COX-2+**

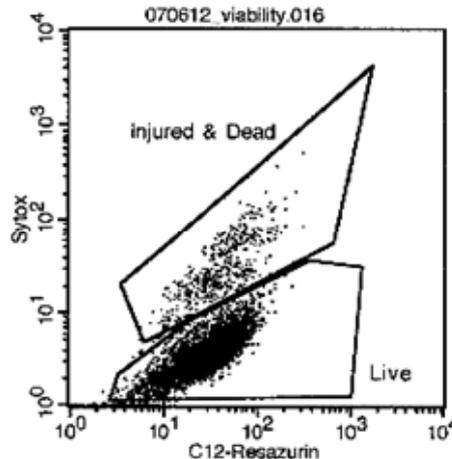
Region	Events	gesamt
Live	91 916	91,92 %
Injured & Dead	3 673	3,67 %

**Abb. 5: Vitalität der Zellen bei Inkubation mit MG+LPS über 6 h**



**VK**

Region	Events	gesamt
Live	47 553	95,11 %
Injured & Dead	1 816	3,63 %



**COX-2+**

Region	Events	gesamt
Live	46 235	92,47 %
Injured & Dead	2 611	5,22 %

**Abb. 6: Vitalität der Zellen bei Inkubation mit MLN+LPS über 6 h**

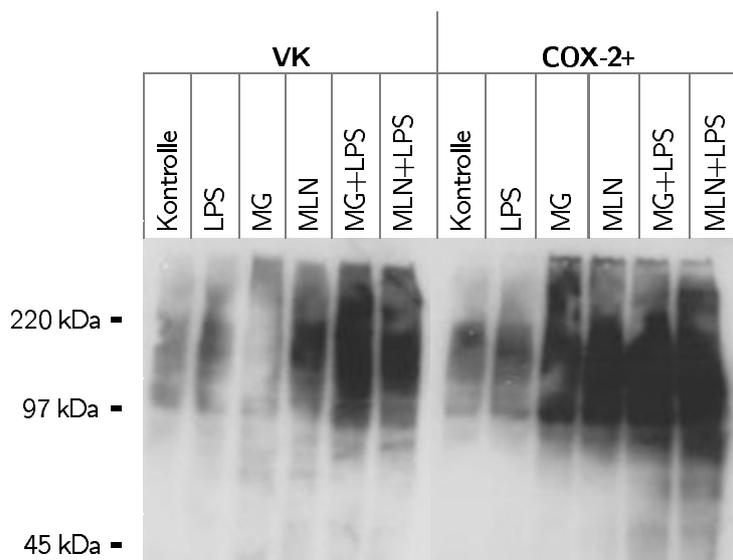
**Abb. 5 und Abb. 6:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit MG (10 µM) bzw. MLN (10 µM) und LPS (1 µg/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde eine FACS-basierte Vitalitätsanalyse mit zwei getrennt-evaluierten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Auf der Abszisse wurde die Fluoreszenz bei 575 nm aufgetragen, die ein Maß für die Metabolisierung von C12-Resazurin darstellt. Auf der Ordinate wurde die Fluoreszenz von SYTOX bei 530 nm aufgetragen, welche in nekrotisierenden Zellen mit einer geschädigten Zellmembran verstärkt nachweisbar ist.

## 4.2 Ergebnisse auf Proteinebene: Immunoblot

### 4.2.1 Untersuchung der Ubiquitinierung von Gesamtprotein

Für die Untersuchung der Ubiquitinierung von Gesamtprotein wurden VK und COX-2+ Zellen für 6 h mit LPS (1 µg/ml), MG (10 µM), MLN (10 µM), MG+LPS sowie MLN+LPS inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und 50 µg des isolierten Gesamtproteins im Immunoblot gegen Polyubiquitin analysiert.

Bei einer 6-stündigen Inkubation mit den Proteasomeninhibitoren MG bzw. MLN wurde in VK und COX-2+ Zellen im Vergleich zu den hemmerfreien Kontrollen eine deutlich verstärkte Ubiquitinierung von Gesamtprotein beobachtet. Auch die Kombination der Proteasomenhemmer mit LPS führte sowohl in COX-2+ als auch in VK Zellen zu einer signifikanten Akkumulation ubiquitiniertes Proteine.



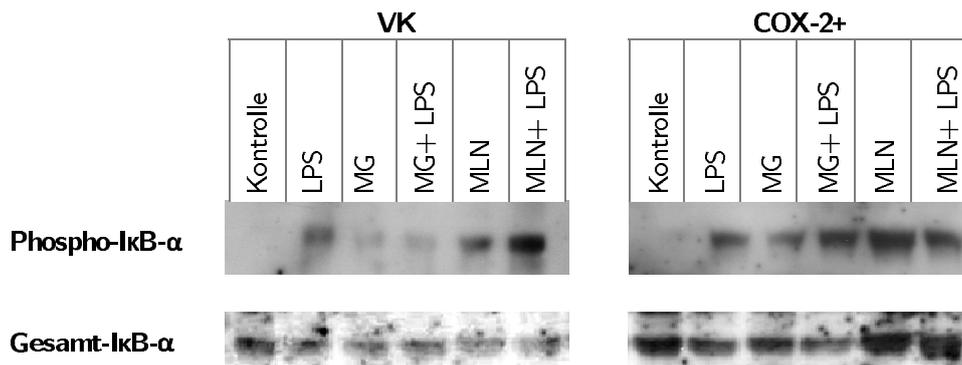
**Abb. 7: Untersuchung der Ubiquitinierung von Gesamtprotein**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1 µg/ml), MG (10 µM), MLN (10 µM), MG+LPS und MLN+LPS inkubiert. Anschließend wurde das zelluläre Gesamtprotein isoliert und eine Immunoblot-Analyse gegen Polyubiquitin vorgenommen.

#### 4.2.2 Untersuchung des Proteins I $\kappa$ B- $\alpha$

Für die Untersuchung von I $\kappa$ B- $\alpha$  wurden 50  $\mu$ g isolierten Gesamtproteins mit einem Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  Antikörper und zur Ladungskontrolle mit einem Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  Antikörper analysiert.

Erwartungsgemäß kam es in LPS-behandelten Zellen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle zu einer Akkumulation von I $\kappa$ B- $\alpha$ , das an den Serinresten 32 und 36 phosphoryliert war (Abb. 8). Die isolierter Behandlung mit dem Proteasomenhemmer MG bzw. MLN führte sowohl in VK als auch in COX-2+ Zellen zu einer Vermehrung von phosphoryliertem I $\kappa$ B- $\alpha$ . Gleichermäßen wurde auch bei Kombination von Proteasomenhemmer und LPS eine Akkumulation von phosphoryliertem I $\kappa$ B- $\alpha$  beobachtet. Die Effekte zeigten sich ähnlich wie schon bei isolierter Hemmergabe für MLN jeweils etwas stärker ausgeprägt als für MG. So wurde bei Kombination von MLN und LPS wurde mehr phosphoryliertes I $\kappa$ B- $\alpha$  quantifiziert als bei isolierter Behandlung mit LPS. Ferner war auffällig, dass die Inkubation von COX-2+ mit MLN allein oder MLN+LPS auch einen Effekt auf das Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  in der Ladungskontrolle hatte. Nach Behandlung von COX-2+ mit MLN wurde mehr Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  detektiert als in der dazugehörigen Kontrolle. Bei Inkubation von COX-2+ mit MLN+LPS war die Akkumulation von Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  sogar noch stärker ausgeprägt.



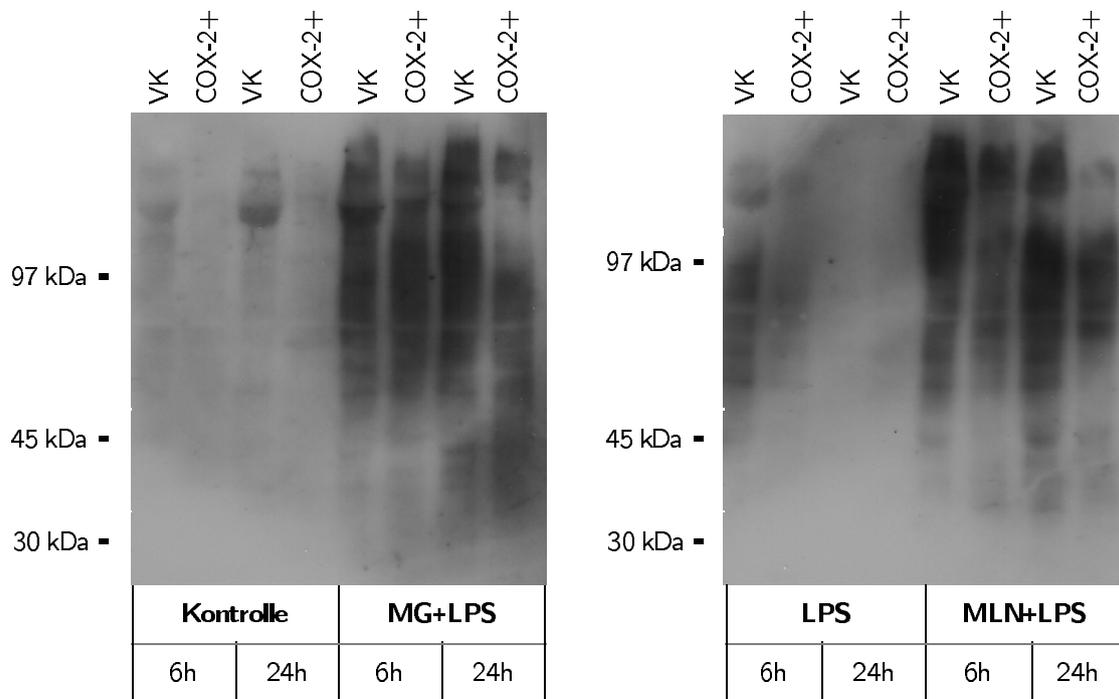
**Abb. 8: Einfluss von MG und MLN auf die Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M), MG+LPS, MLN (10  $\mu$ M) und MLN+LPS inkubiert. Anschließend wurde das zelluläre Gesamtprotein isoliert und eine Immunoblot-Analyse gegen Phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  und gegen Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  als Ladungskontrolle durchgeführt.

### 4.2.3 Untersuchung der Ubiquitinierung von I $\kappa$ B- $\alpha$

Eine mögliche Beteiligung von I $\kappa$ B- $\alpha$  an der beobachteten Akkumulation polyubiquitinerter Proteine, wurde mittels Immunpräzipitation von I $\kappa$ B- $\alpha$  aus 250  $\mu$ g Gesamtprotein mit anschließendem Immunoblot gegen Polyubiquitin untersucht.

Bei Gabe der Proteasomenhemmer MG und MLN zeigte sich ein massiver Anstieg von ubiquitiniertem I $\kappa$ B- $\alpha$  (Abb. 9). Analog zu der Ubiquitinierung von Gesamtprotein (vgl. Abb. 7), waren zwischen den beiden Proteasomenhemmern MG und MLN keine Unterschiede im Ausmaß der Akkumulation von ubiquitiniertem I $\kappa$ B- $\alpha$  festzustellen.



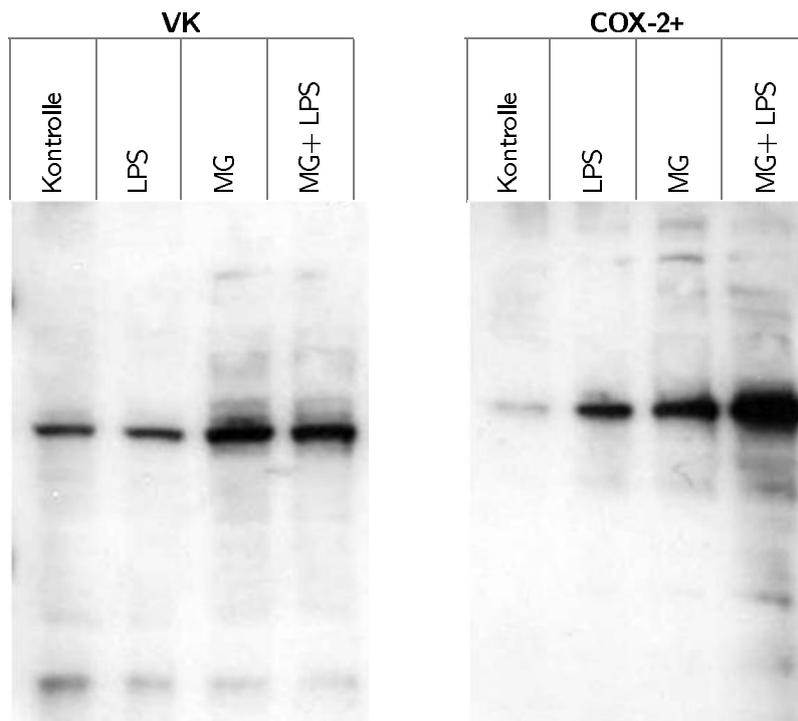
**Abb. 9: Ubiquitinierung von I $\kappa$ B- $\alpha$**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6h bzw. 24h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M), MLN (10  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurde das Gesamtprotein isoliert, eine Immunpräzipitation für I $\kappa$ B- $\alpha$  angeschlossen und eine Immunoblot gegen Polyubiquitin durchgeführt.

#### 4.2.4 Untersuchung des Proteins NF- $\kappa$ B p65

Zum besseren Verständnis des Einflusses der Proteasomenhemmer auf die Funktion von NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor wurden aus Zellkernen von VK und COX-2+ Zellen, die über 6 h mit MG (10  $\mu$ M) und LPS behandelt wurden, die nukleäre Proteinfraction isoliert. NF- $\kappa$ B p65 wurde sodann mit einem entsprechenden Antikörper immunpräzipitiert und nachfolgend im Immunoblot gegen NF- $\kappa$ B p65 und gegen Polyubiquitin analysiert. Der Immunoblot gegen NF- $\kappa$ B p65 diente hierbei gleichzeitig zur Verifizierung der Methode.

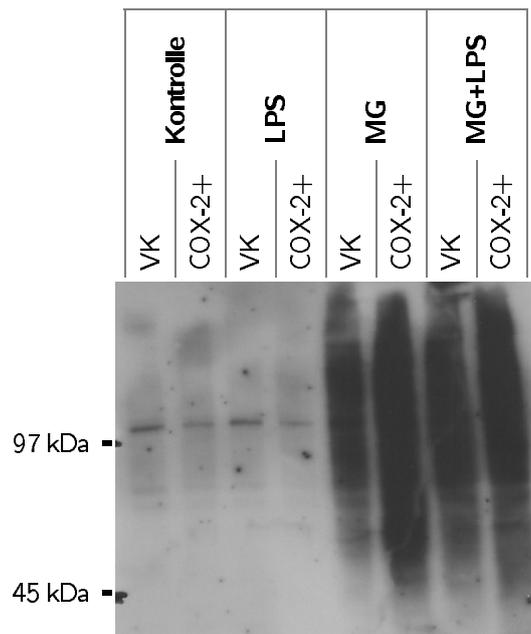
Hierbei wurde gezeigt, dass es unter Einfluss des Proteasomenhemmers MG zu einer deutlichen Erhöhung von nukleärem NF- $\kappa$ B p65 kommt. In COX-2+ Zellen war die nukleäre Anhäufung von NF- $\kappa$ B p65 bei Kombination von MG mit LPS maximal ausgeprägt (Abb. 10).



**Abb. 10: Einfluss von MG und MG+LPS auf nukleäres NF- $\kappa$ B p65**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M) oder MG+LPS inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellkerne über ein Sucrosekissen aufgereinigt und die nukleären Proteine aus den Zellkernen isoliert. Nachfolgend wurde eine IP mit einem NF- $\kappa$ B p65 Antikörper (C-20) vorgenommen und ein Immunoblot gegen NF- $\kappa$ B p65 mit einem NF- $\kappa$ B p65 Antikörper (F-6) durchgeführt.

Ferner wurde mittels Immunoblot gegen Polyubiquitin gezeigt, dass sowohl eine isolierte Behandlung der Zellen mit MG als auch eine Behandlung mit MG+LPS eine nukleäre Anhäufung von ubiquitiniertem NF- $\kappa$ B p65 zur Folge hat (Abb. 11). Diese Akkumulation von ubiquitiniertem NF- $\kappa$ B p65 war in COX-2+ etwas stärker ausgeprägt als in VK Zellen.



**Abb. 11: Ubiquitinierung von nukleärem NF- $\kappa$ B p65**

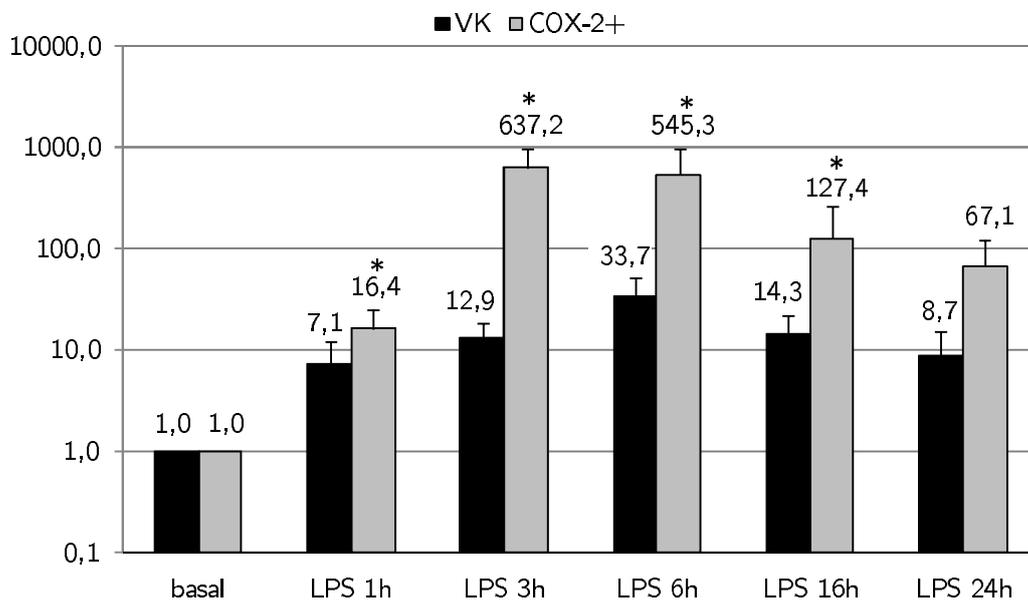
VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M) oder MG+LPS inkubiert. Als nächstes wurden die Zellkerne über ein Sucrosekissen aufgereinigt und nukleäre Proteine isoliert. Nun wurde mit einem NF- $\kappa$ B p65 Antikörper (C-20) immunpräzipitiert und ein Immunoblot gegen Polyubiquitin durchgeführt.

## 4.3 CCL2 Expression

### 4.3.1 Zeitkinetik der CCL2 Expression bei Behandlung mit LPS

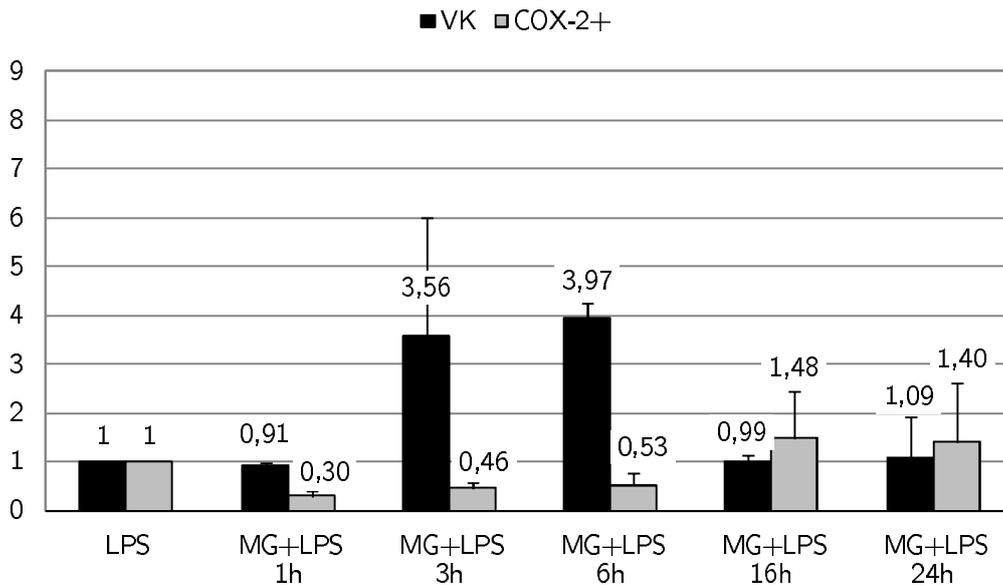
VK und COX-2+ Zellen wurden für 1 h, 3 h, 6 h, 6 h, 16 h und 24 h mit LPS (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die CCL2 RNA-Expression mittels Quantitativer Real-Time-PCR untersucht.

Wie erwartet zeigte sich in COX-2+ Zellen unter dem Einfluss von LPS eine signifikante Induktion der CCL2 Expression. Das Expressionsmaximum wurde zum Zeitpunkt 3 h mit einer Steigerung um das  $637,2 \pm 360,0$  fache erreicht (Abb. 12). In den VK Zellen fiel die Induzierbarkeit von CCL2 als Antwort auf LPS deutlich schwächer aus. So war die CCL2 Expression von VK nach 3 h lediglich um den Faktor  $12,9 \pm 5,9$  erhöht. Das CCL2 Expressionsmaximum in den VK Zellen wurde im Vergleich zu den COX-2+ nicht nach 3 h, sondern erst nach 6 h mit einer Erhöhung auf das  $33,7 \pm 18,3$  fache des Basalwertes erreicht.

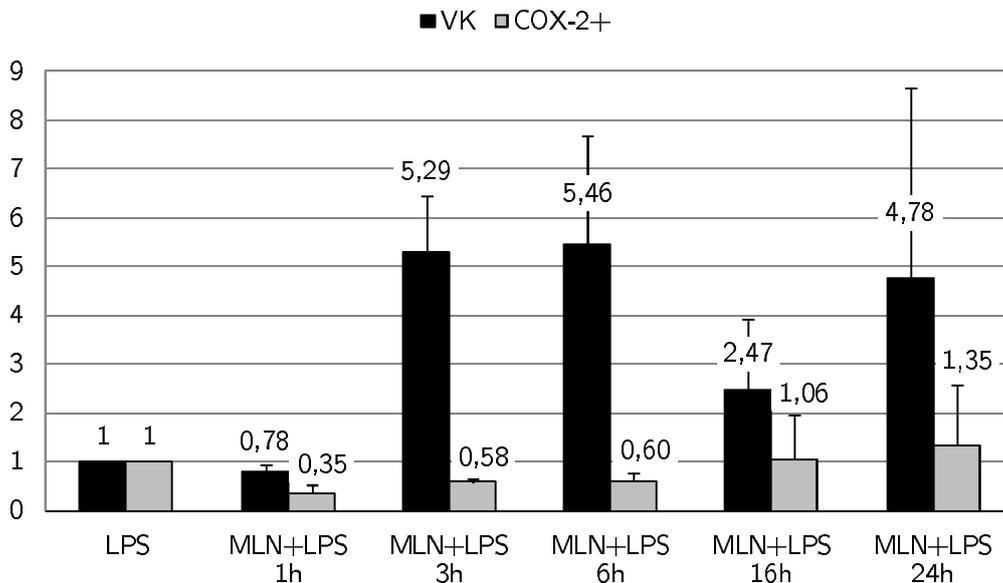


**Abb. 12: Zeitkinetik der CCL2 Expression für LPS**

VK und COX-2+ Zellen wurden zunächst für 1 h, 3 h, 6 h, 16 h und 24 h mit LPS (1 µg/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ); \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu LPS-behandelten VK-Zellen (Mann-Whitney-U-Test, exakter Wert nach Fisher).



**Abb. 13: Zeitkinetik der CCL2 Expression für MG+LPS**



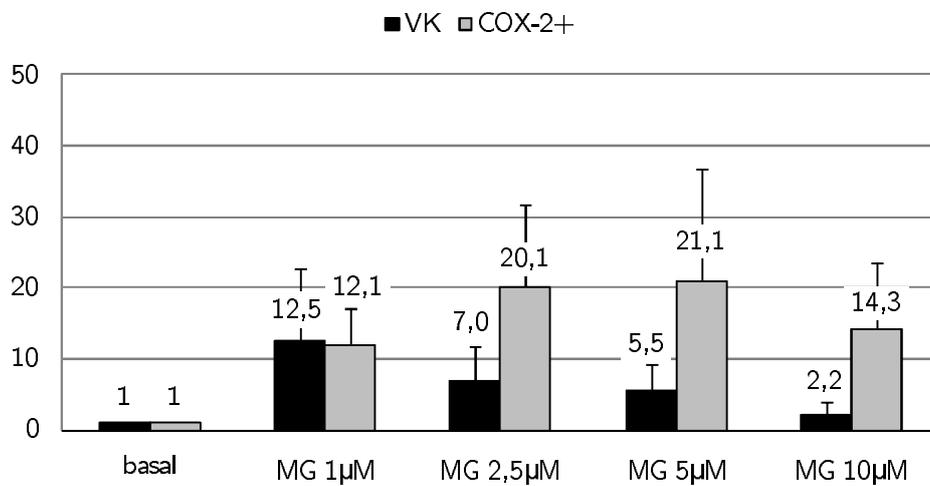
**Abb. 14: Zeitkinetik der CCL2 Expression für MLN+LPS**

**Abb. 13 und Abb. 14:** VK und COX-2+ wurden für 1 h, 3 h, 6 h, 16 h und 24 h mit MG (10  $\mu$ M)+LPS bzw. MLN (10  $\mu$ M)+LPS inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR untersucht.

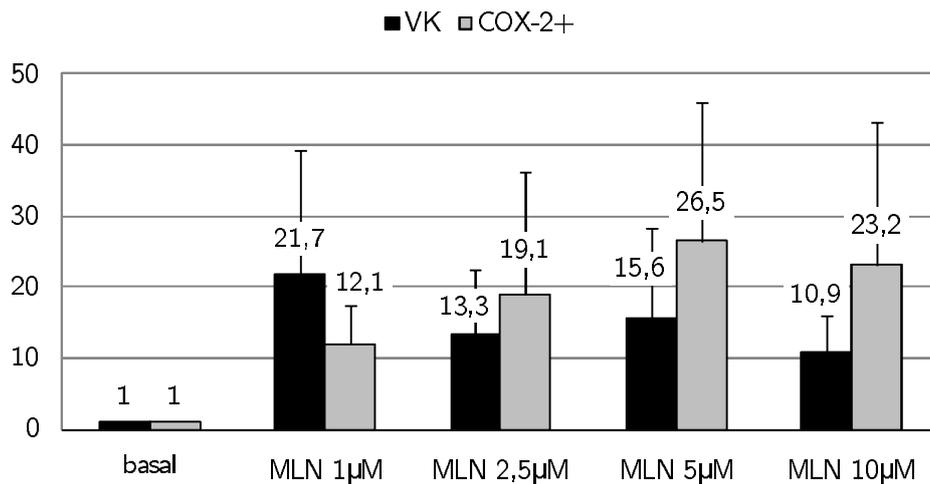
#### 4.3.2 Zeitkinetik der CCL2 Expression bei Kombination der Proteasomenhemmer mit LPS

VK und COX-2+ Zellen wurden für 1 h, 3 h, 6 h, 16 h und 24 h mit MG bzw. MLN (10  $\mu$ M) in Kombination mit LPS inkubiert und die CCL2 Expression mittels Quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Der durch LPS-Gabe in COX-2+ induzierte hyperinflammatorische Effekt wurde durch die Zugabe eines Proteasomenhemmers

signifikant gemindert. So war die CCL2 Expression nach 3 h durch MG+LPS auf das  $0,46 \pm 0,1$  fache (Abb. 13) und durch MLN+LPS auf  $0,58 \pm 0,8$  fache der LPS-Kontrolle reduziert (Abb. 14). Nach 6 h war die CCL2 Expression durch MG+LPS auf das  $0,53 \pm 0,25$  fache und durch MLN+LPS auf das  $0,6 \pm 0,18$  fache vermindert. Interessanterweise zeigte sich in VK Zellen unter dem Einfluss der Proteasomenhemmer keine Hemmung der CCL2 Expression. Im Gegenteil schienen sich die Hemmer sogar leicht stimulierend auf die Expression von CCL2 auszuwirken. So war zum Zeitpunkt der stärksten Hemmung in COX-2+ die Expression von CCL2 in VK Zellen für MG um den Faktor  $3,6 \pm 2,5$  und für MLN um  $5,3 \pm 1,2$  erhöht.



**Abb. 15: Wirkung der Konzentration von MG auf die CCL2 Expression**



**Abb. 16: Wirkung der Konzentration von MLN auf die CCL2 Expression**

**Abb. 15 und Abb. 16:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit MG bzw. MLN in Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR ermittelt.

### **4.3.3 Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Proteasomenhemmer zum Zeitpunkt 6 h**

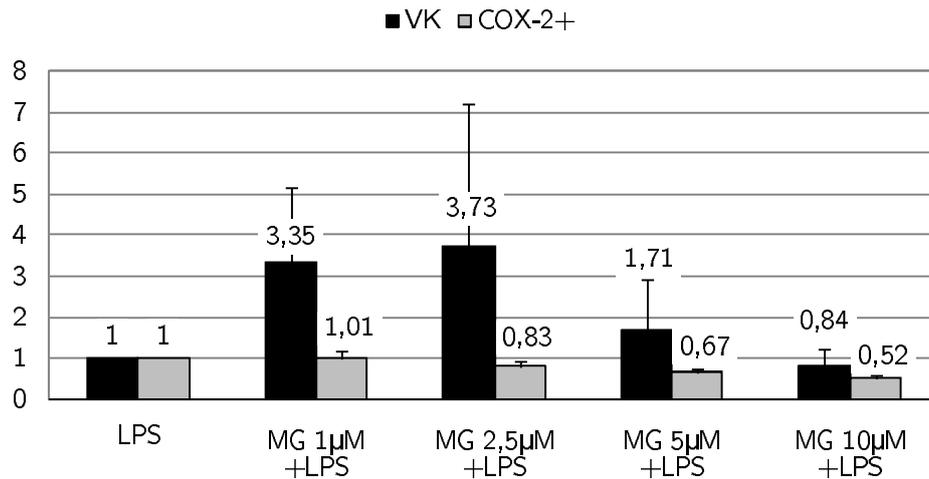
Nach der Untersuchung der CCL2 Expression im Zeitverlauf wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Analyse für die Proteasomenhemmer durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen über 6 h mit MG bzw. MLN (1  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) inkubiert.

Die isolierte Behandlung der Zellen mit den Proteasomenhemmern bewirkte sowohl in VK als auch in COX-2+ Zellen eine deutliche Expressionssteigerung von CCL2 (Abb. 15, Abb. 16). Für die eingesetzten Hemmerkonzentrationen größer als 1  $\mu$ M war der Anstieg der CCL2 Expression in COX-2+ jeweils stärker ausgeprägt als in VK Zellen.

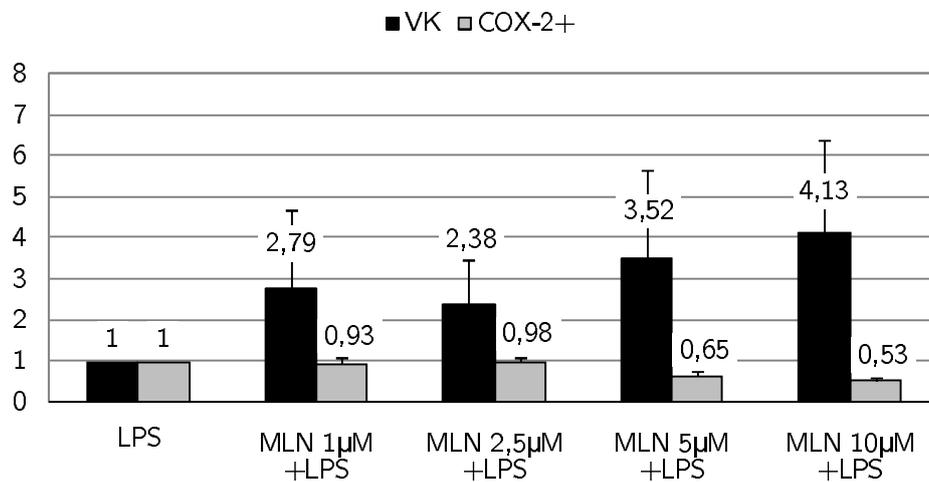
### **4.3.4 Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Proteasomenhemmer bei Kombination mit LPS zum Zeitpunkt 6 h**

Als nächstes wurden VK und COX-2+ Zellen über 6 h mit verschiedenen Konzentrationen von MG bzw. MLN in Kombination mit LPS inkubiert und die CCL2 Expression mittels Quantitativer Real-Time-PCR bestimmt.

Analog zu den Vorergebnissen der zeitkinetischen Untersuchungen (vgl. 4.3.2) war in COX-2+ Zellen eine signifikante Reduktion der CCL2 Expression zu beobachten (Abb. 17, Abb. 18). Bei einer MG bzw. MLN Konzentration von 10  $\mu$ M war die Expression von CCL2 am stärksten vermindert. In Bezug auf die isolierte Inkubation mit LPS betrug die Expression von CCL2 für MG+LPS noch das  $0,52 \pm 0,9$  fache und für MLN+LPS noch  $0,53 \pm 0,1$  fache des Vergleichswertes. Mit abnehmender Konzentration von MG bzw. MLN verringerte sich der negative Effekt auf die CCL2 Expression in COX-2+ Zellen. In Konzentrationen kleiner als 5  $\mu$ M war schließlich gegenüber der LPS-Kontrolle keine stabile Minderung der CCL2 Expression mehr zu verzeichnen. In VK Zellen hingegen führte die Kombination von Proteasomenhemmer und LPS zu keiner signifikanten Minderung der CCL2 Expression. Analog zu den zeitkinetischen Daten (vgl. 4.3.2) schienen sich die Hemmer sogar geringfügig expressionssteigernd auf CCL2 auszuwirken, diese Expressionssteigerung von CCL2 erwies sich jedoch als statistisch nicht-signifikant. Auch die im Mittel hemmende Wirkung von MG bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M um den Faktor  $0,8 \pm 0,4$  war statistisch nicht signifikant.



**Abb. 17: Wirkung von MG+LPS auf die Expression von CCL2**



**Abb. 18: Wirkung von MLN+LPS auf die Expression von CCL2**

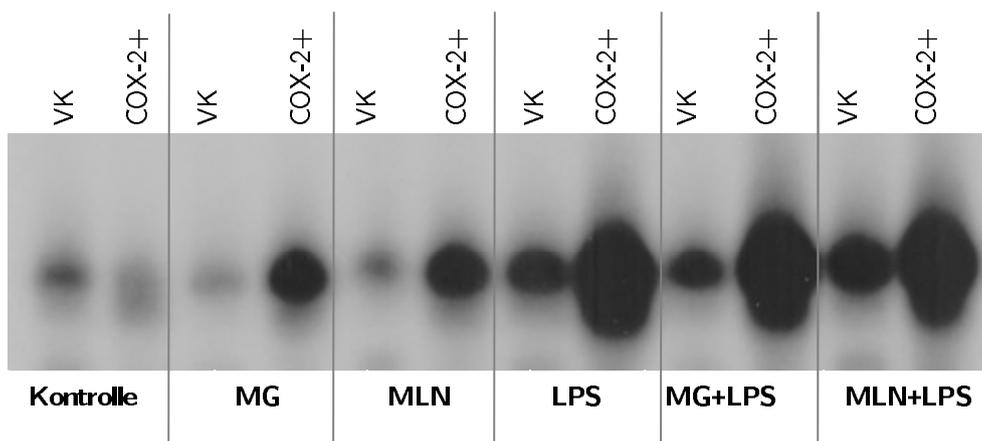
**Abb. 17 und Abb. 18:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit MG bzw. MLN in Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM und LPS (1 µM/ml) inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR ermittelt.

## 4.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

VK und COX-2+ wurden sowohl mit MG oder MLN (10  $\mu$ M) allein als auch in Kombination mit LPS inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die nukleäre Proteinfraction isoliert. Mit  $^{32}$ P-markierten Sonden wurde im Anschluss die Bindungskapazität von nukleärem NF- $\kappa$ B und AP-1 an die entsprechende DNA-Konsensussequenz untersucht.

### 4.4.1 Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B an die DNA

In Abb. 19 ist das Ergebnis eines typischen NF- $\kappa$ B EMSA dargestellt. Nach einer 6-stündigen Inkubation mit LPS war sowohl in VK als auch in COX-2+ Zellen eine deutlich erhöhte Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA-Konsensussequenz aufzuzeigen. Diese LPS-induzierte erhöhte Bindung von nukleär lokalisiertem NF- $\kappa$ B an die DNA war in den COX-2+ Zellen erwartungsgemäß deutlich stärker ausgeprägt als in den VK Zellen. Interessanterweise wurde durch die alleinige Gabe eines Proteasomenhemmers die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA in COX-2+ gegenüber dem Basalwert deutlich gesteigert. Auch bei Kombination von MG bzw. MLN mit LPS wurde in COX-2+ kein negativer Effekt auf die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA beobachtet. In VK Zellen wurde durch Kombination eines Proteasomenhemmers mit LPS die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B gegenüber der LPS-Kontrolle sogar geringfügig gesteigert.



**Abb. 19: Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml und MG (10  $\mu$ M) bzw. MLN (10  $\mu$ M) inkubiert. Nun wurden die nukleären Proteine isoliert und die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA-Konsensussequenz untersucht ( $n = 3$ ).

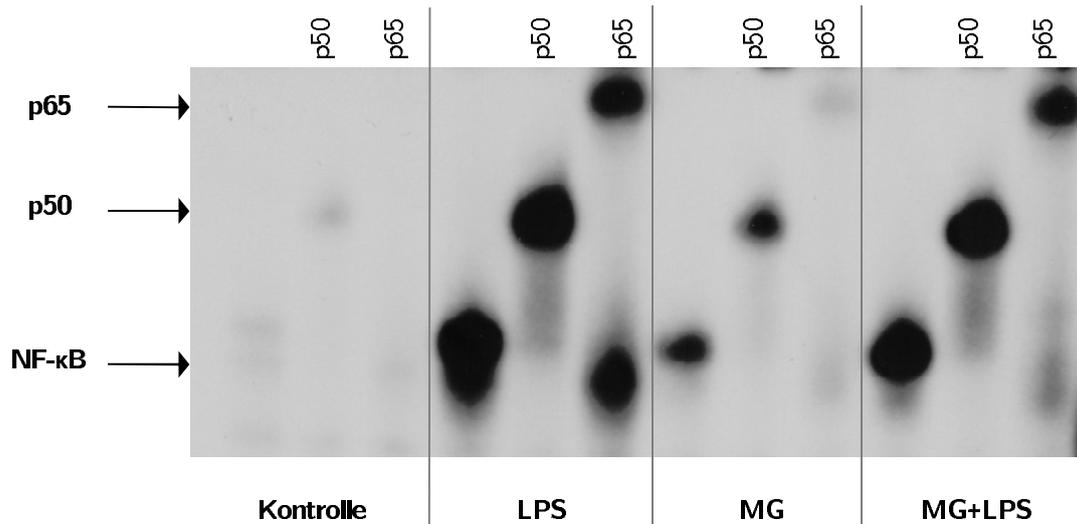
#### 4.4.2 NF- $\kappa$ B p50 und p65 Supershift

Mit Hilfe von Supershifts wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit es unter dem Einfluss der Proteasomenhemmer zu Verschiebungen zwischen den NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65 kommt. Es wurden hierbei lediglich COX-2+ Zellen untersucht, da die Behandlung mit Proteasomenhemmern in Kombination mit LPS in COX-2+ eine Hemmung der CCL2 Expression bewirkt hatte.

In COX-2+ war unter Kontrollbedingungen eine klare Dominanz der NF- $\kappa$ B p50 Untereinheit gegenüber der NF- $\kappa$ B p65 Untereinheit zu beobachten. Durch Stimulation mit LPS wurde die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA in COX-2+ massiv gesteigert (Abb. 19). Diese erhöhte DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B wurde im Supershift durch eine Zunahme von sowohl NF  $\kappa$ B p50 als auch NF- $\kappa$ B p65 erklärt (Abb. 20). Hierbei war auffällig, dass die Behandlung von COX-2+ mit LPS nur einen unvollständigen Shift von NF- $\kappa$ B p65 bewirkte. So verblieb eine nicht-retardierte Bande auf der Höhe, auf welcher NF- $\kappa$ B im klassischen Shift ohne p65 Antikörper detektiert wurde. Wie bereits in Abb. 19 gezeigt wurde die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA durch die isolierte Gabe von MG erhöht. Durch Supershifts wurde gezeigt, dass diese erhöhte Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA durch eine Vermehrung der NF- $\kappa$ B p50 Untereinheit zu Stande kommt (Abb. 20). Weiter bewirkte auch die kombinierte Gabe von MG und LPS eine signifikant gesteigerte Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA (Abb. 19). Interessanterweise wurde bei Addition des Proteasomenhemmers MG zu LPS das Verhältnis der NF- $\kappa$ B p50 und p65 Untereinheiten nicht wesentlich verschoben. So war die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B p50 und NF- $\kappa$ B p65 ähnlich stark ausgeprägt wie bei LPS-Induktion (Abb. 20). Im Gegenteil zur isolierten Behandlung mit LPS wurde jedoch bei Kombination von MG mit LPS ein weitgehend vollständiger Supershift von NF- $\kappa$ B p65 ohne das Auftreten einer nicht-retardierten NF- $\kappa$ B Bande erreicht.

#### 4.4.3 Bindungsfähigkeit von AP-1 an die DNA

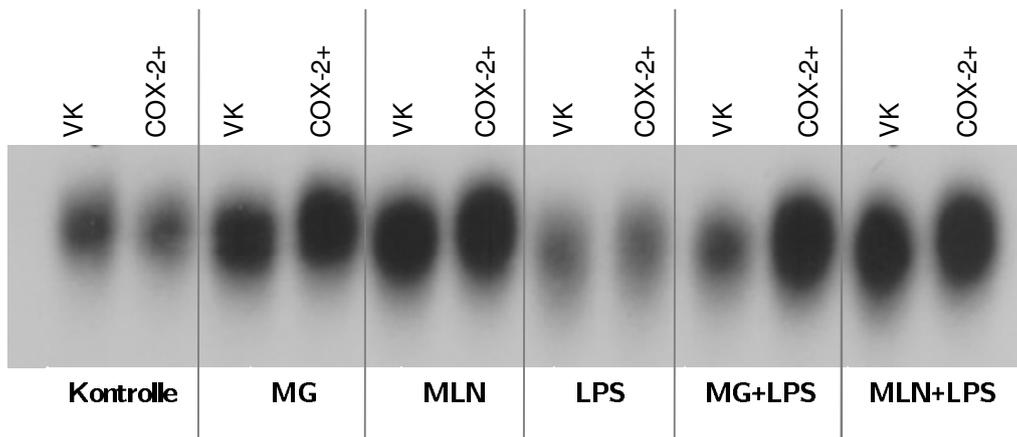
Neben NF- $\kappa$ B wird auch dem Transkriptionsfaktor AP-1 eine wichtige Rolle in der Regulation von CCL2 zugesprochen [27, 34]. Durch Untersuchung der Bindung von AP-1 an die DNA, sollte die Wirkung der Proteasomeninhibitoren MG und MLN auf einen weiteren proinflammatorischen Signaltransduktionsweg abgeschätzt werden.



**Abb. 20: Supershift für die NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M) sowie MG+LPS inkubiert. Im Anschluss wurden die nukleären Proteine isoliert, über Nacht mit einem p50 bzw. p65 Antikörper inkubiert und die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA-Konsensussequenz untersucht. Auf dem Gel wurde neben den beiden Supershifts als Kontrolle jeweils der klassische NF- $\kappa$ B Shift ohne Antikörper aufgetragen.

Im Gegensatz zu der enormen Steigerung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B bei LPS-Stimulation, wurde die Bindung von AP-1 an die DNA durch LPS nicht wesentlich beeinflusst. Hingegen wurde durch die Behandlung mit einem Proteasomeninhibitor in COX-2+ Zellen die Bindung von AP-1 an die DNA erhöht. Dieser positive Effekt auf die DNA-Bindung von AP-1 war sowohl bei alleiniger Hemmergabe als auch bei Kombination eines Proteasomenhemmers mit LPS zu beobachten. In dem Bindungsverhalten von AP-1 an die DNA waren grundsätzlich keine wesentlichen Unterschiede zwischen VK und COX-2+ Zellen festzustellen. Wie bereits im NF- $\kappa$ B EMSA (vgl. Abb. 19) zeigten sich die Veränderungen in VK jedoch weniger stark ausgeprägt als in COX-2+ Zellen (Abb. 21). Wie bereits für die COX-2+ beschrieben, wurde auch in VK Zellen durch MG bzw. MLN eine erhöhte Bindung von AP-1 an die DNA-Konsensussequenz festgestellt. Ferner führte ebenfalls MG+LPS bzw. MLN+LPS zu einem Anstieg der DNA-Bindung von AP-1, wobei dieser Effekt für den Hemmer MLN etwas stärker ausgeprägt war.



**Abb. 21: Bindung von AP-1 an die DNA**

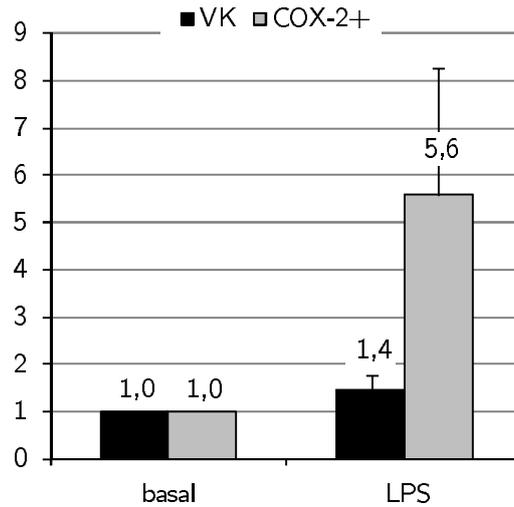
VK und COX-2+ Zellen wurden für 6 h mit LPS (1 µg/ml) und MG (10 µM) bzw. MLN (10 µM) inkubiert. Nun wurden die nukleären Proteine isoliert und die Bindung von AP-1 an die DNA-Konsensussequenz untersucht.

## 4.5 Luciferase-Assay

### 4.5.1 Transkriptionelle Aktivität von NF-κB

Mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde untersucht, wie sich die durch Proteasomenhemmer im EMSA erhöhte DNA-Bindung von NF-κB auf dessen genregulierende Aktivität auswirkt. Hierzu wurden VK und COX-2+ Zellen zunächst mit einem NF-κB Luciferase-Reportervektor und einem *hrGFPII*-Expressionsvektor kotransfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für 6 h mit LPS, mit MG bzw. MLN allein sowie mit der Kombination von MG bzw. MLN und LPS inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen wurde nun die Luciferaseaktivität sowie die GFP-Fluoreszenz im Zelllysat bestimmt. Der Quotient aus Lumineszenz und Fluoreszenz einer Probe wurde als Surrogatparameter für die transaktivierende Fähigkeit von NF-κB gewählt.

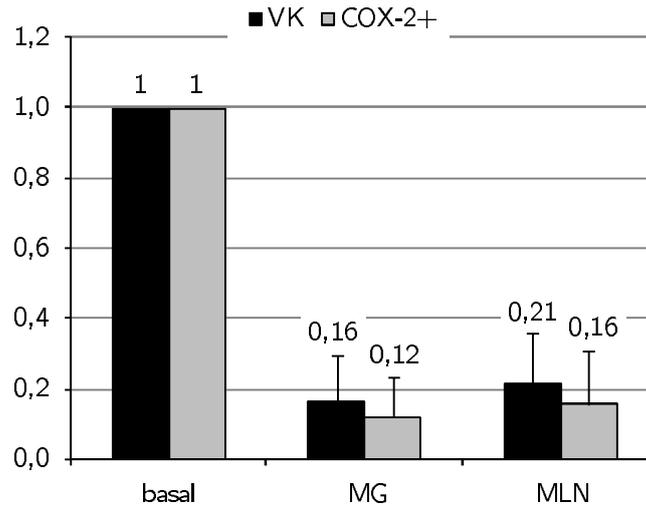
Durch die Gabe von LPS wurde sowohl in VK als auch in COX-2+ Zellen eine Zunahme der NF-κB Aktivität bewirkt (Abb. 22). Während die NF-κB Aktivität in VK Zellen nur mäßig um den Faktor  $1,4 \pm 0,3$  anstieg, wurde in COX-2+ die Aktivität von NF-κB durch LPS um den Faktor  $5,6 \pm 2,7$  gesteigert.



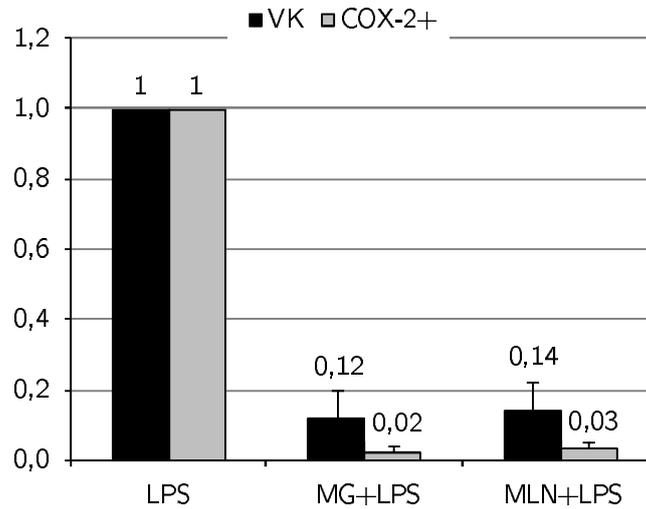
**Abb. 22: Induzierbarkeit der Aktivität von NF-κB durch LPS**

Die Behandlung der Zellen mit den Proteasomenhemmern MG und MLN führte zu einer starken Hemmung der NF-κB Aktivität (Abb. 23). Durch die Gabe von MG wurde die Aktivität von NF-κB in COX-2+ Zellen auf das  $0,12 \pm 0,07$  fache und durch MLN um  $0,16 \pm 0,08$  fache der Kontrolle herabgesetzt. Überraschenderweise war die Hemmung der Aktivität von NF-κB in VK Zellen ähnlich stark ausgeprägt wie in COX-2+ Zellen. So wurde die Aktivität von NF-κB durch MG auf das  $0,16 \pm 0,13$  fache und durch MLN um das  $0,21 \pm 0,14$  fache der unbehandelten Kontrolle reduziert.

Auch die Kombination von Proteasomenhemmer und LPS führte sowohl in VK als auch in COX-2+ Zellen zu einer deutlich erniedrigten NF-κB Aktivität (Abb. 24). Während in VK die Hemmung auf das  $0,12 \pm 0,08$  fache für MG+LPS bzw. auf das  $0,14 \pm 0,08$  fache für MLN+LPS jedoch ähnlich stark ausgeprägt war, wie bei isolierter Behandlung mit den Proteasomenhemmern, wurde die Aktivität von NF-κB in COX-2+ Zellen durch die Kombination eines Proteasomenhemmers mit LPS nochmals deutlich reduziert. So wurde durch eine 6-stündige Inkubation mit MG+LPS bzw. MLN+LPS eine Reduktion der NF-κB Aktivität auf das  $0,02 \pm 0,02$  fache bzw. auf das  $0,03 \pm 0,02$  fache der LPS-Kontrolle erwirkt.



**Abb. 23: Einfluss von MG bzw. MLN auf die NF-κB Aktivität**

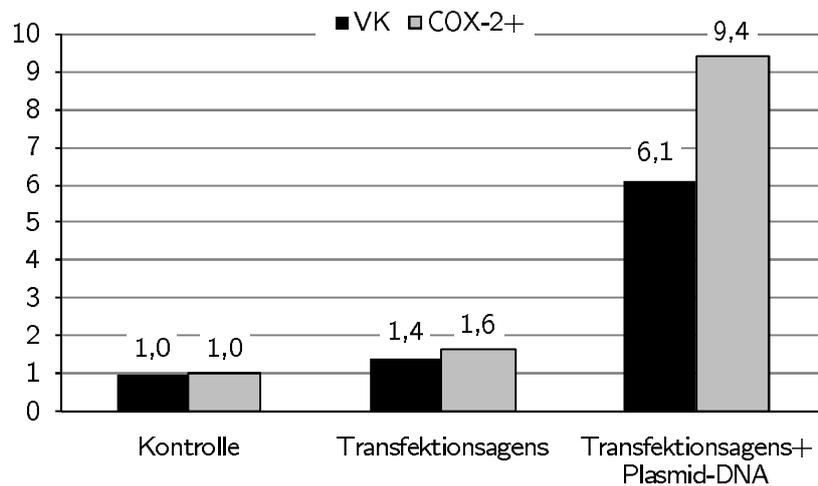


**Abb. 24: Einfluss von MG+LPS bzw. MLN+LPS auf die NF-κB Aktivität**

**Abb. 22 bis Abb. 24:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 4 h mit einem NF-κB-Luciferasevektor und einem *hrGFPII*-Expressionsvektor kotransfiziert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit LPS (1 µg/ml), MG (10 µM) bzw. MLN (10 µM) für weitere 6 h. Nach Aufschluss der Zellen wurde die Luciferaseaktivität und Fluoreszenz im Zelllysat bestimmt und der Quotient aus Lumineszenz und Fluoreszenz errechnet.

#### 4.5.2 Prüfung der Validität des Luciferase-Assay

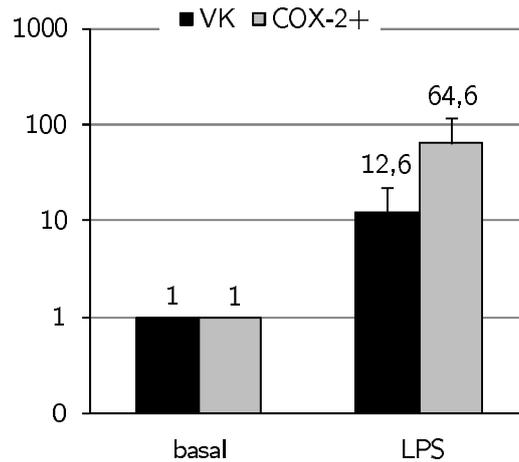
Zur Überprüfung der Validität der überraschenden Ergebnisse im Luciferase-Assay wurden Zellen analog zu dem Luciferase-Versuchsdesign zunächst transfiziert und für 6 h mit MG bzw. MLN und LPS inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR untersucht. In diesem kombinierten Luciferase-RNA-Experiment wurde sowohl in COX-2+ als auch in VK Zellen bereits nur durch eine Inkubation mit dem Transfektionsagens und der Plasmid-DNA die basale Expression von CCL2 gesteigert. So war die CCL2 Expression in COX-2+ Zellen um den Faktor 9,4 und in VK Zellen um den Faktor 6,1 höher als Zellen, die lediglich mit Transfektionsmedium (d.h. ohne Transfektionsagens und Plasmid-DNA) inkubiert wurden (Abb. 25).



**Abb. 25: Einfluss der Zelltransfektion auf die basale CCL2 Expression**

VK und COX-2+ Zellen wurden für 4 h entweder nur mit Transfektionsmedium (Kontrolle), mit Transfektionsmedium einschließlich Transfektionsagens, oder mit Transfektionsmedium einschließlich Transfektionsagens und Plasmid-DNA behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 6 h in FCS-freiem Grundmedium inkubiert. Nun wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR ermittelt ( $n = 1$ ).

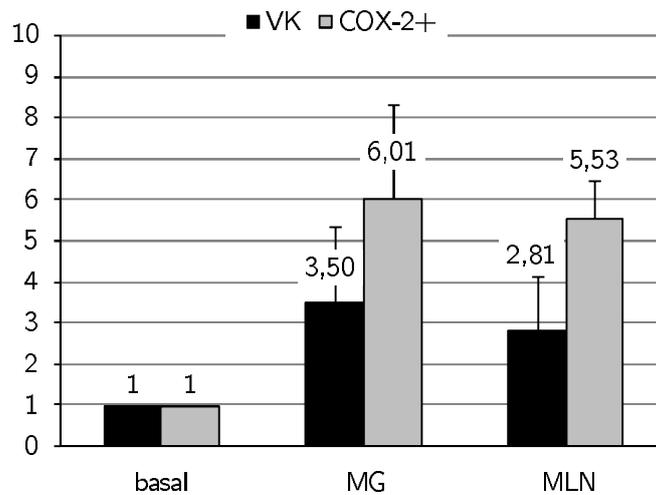
Bei der Untersuchung von Zellen, die mit dem NF- $\kappa$ B-Reportervektor transfiziert worden waren, zeigte sich weiter, dass auch die LPS-Stimulierbarkeit deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei nicht-transfizierten Zellen (Abb. 26). So wurde in COX-2+ die Expression von CCL2 durch LPS lediglich um den Faktor  $64,6 \pm 57,3$  gesteigert während in VK die Expression von CCL2 im Mittel um den Faktor  $12,6 \pm 10,5$  erhöht war (vgl. Abb. 12).



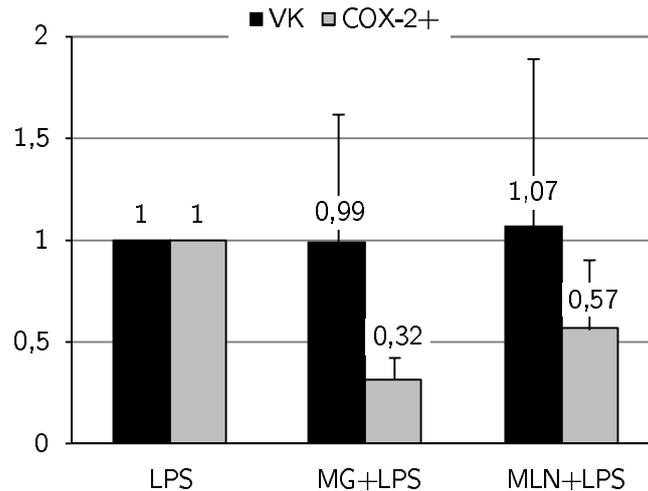
**Abb. 26: Einfluss von LPS auf die CCL2 Expression transfizierter Zellen**

Die isolierte Gabe der Proteasomenhemmer führte analog zu den Ergebnissen der Konzentrations-Wirkungs-Analyse (siehe 4.3.3) zu einer gemäßigten Steigerung der CCL2 Expression (Abb. 27).

Auch die kombinierte Gabe der Proteasomenhemmer mit LPS lieferte Ergebnisse, die zu den Vorergebnissen im einfachen RNA-Experiment passten (siehe 4.3.4). So wurde in COX-2+ durch MG+LPS eine partielle Hemmung der CCL2 Expression auf das  $0,32 \pm 0,11$  fache und durch MLN+LPS auf das  $0,57 \pm 0,34$  fache der LPS-Kontrolle beobachtet, während in VK keine signifikante Verminderung der Expression von CCL2 nachzuweisen war (Abb. 28).



**Abb. 27: CCL2 Expression transfizierter Zellen für MG bzw. MLN**



**Abb. 28: CCL2 Expression transfizierter Zellen für MG bzw. MLN+LPS**

**Abb. 26 bis Abb. 28:** VK und COX-2+ Zellen wurden für 4 h mit einem NF- $\kappa$ B-Luciferasevektor und einem *hrGFP11*-Expressionsvektor kotransfiziert, im Anschluss mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M), MLN (10  $\mu$ M), MG+LPS und MLN+LPS für weitere 6 h inkubiert. Nun wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert, in komplementäre DNA umgeschrieben und die Expression von CCL2 mittels Quantitativer Real-Time-PCR ermittelt.

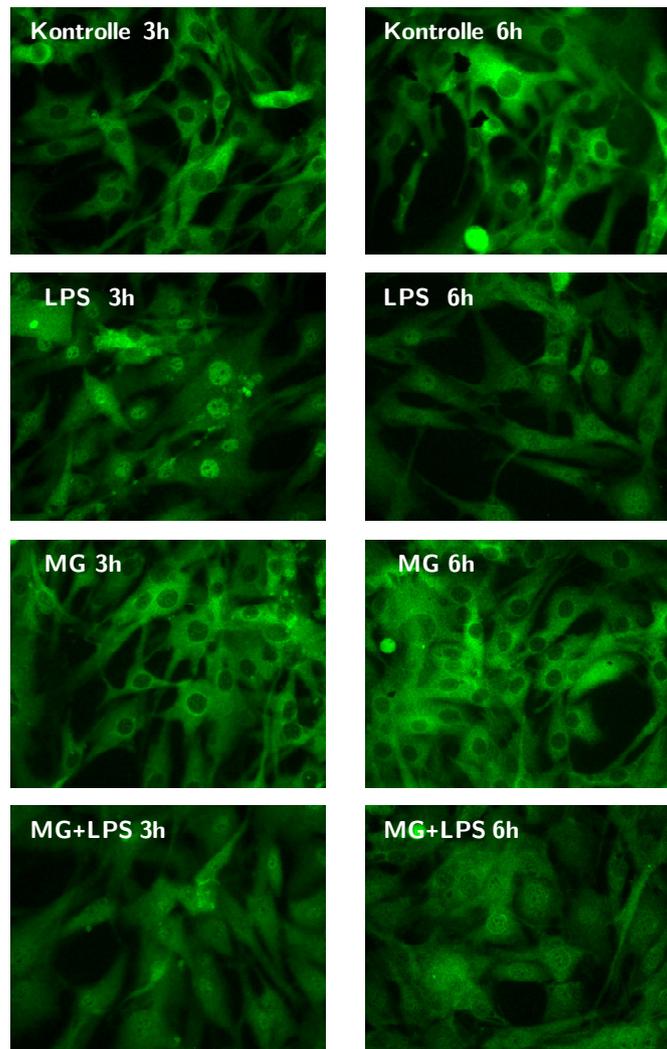
## 4.6 Immunzytochemie

COX-2+ Zellen wurden für 3 h und 6 h mit LPS, mit MG allein oder mit MG+LPS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit einem NF- $\kappa$ B p65 Antikörper inkubiert, um NF- $\kappa$ B p65 intrazellulär zu lokalisieren. Die Detektion von NF- $\kappa$ B p65 erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit einem CY-2 gekoppelten Sekundär-Ak.

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, liegt NF- $\kappa$ B p65 in COX-2+ unter Kontrollbedingungen überwiegend zytoplasmatisch vor. Durch Stimulation mit LPS wurde eine massive Translokation von NF- $\kappa$ B p65 in den Zellkern beobachtet. Die nukleäre Akkumulation von NF- $\kappa$ B war nach 3 h maximal ausgeprägt.

Die isolierte Gabe von MG schien auf die intrazelluläre Verteilung von NF- $\kappa$ B p65 wenig Einfluss zu haben. So wurde, ähnlich wie in der Kontrolle, eine zytoplasmatische Dominanz der p65-Untereinheit nachgewiesen.

Die kombinierte Gabe von MG und LPS hatte, wie bereits die isolierte LPS-Gabe, eine signifikante Translokation von NF- $\kappa$ B p65 in den Zellkern zur Folge. Diese nukleäre Anhäufung von NF- $\kappa$ B p65 erwies sich als etwas weniger stark ausgeprägt als bei LPS-Stimulation.



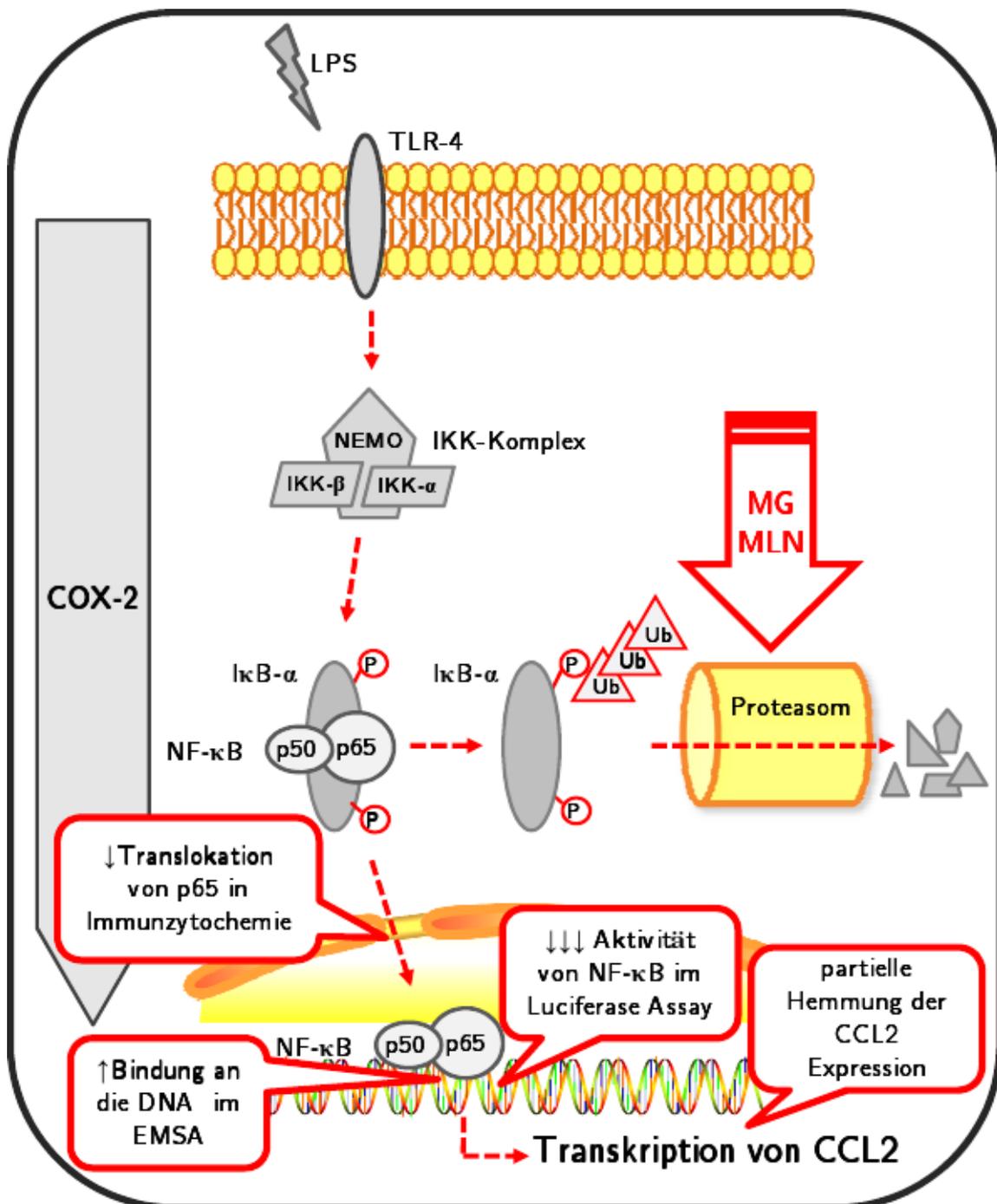
**Abb. 29: Intrazelluläre Verteilung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 in COX-2+**  
 Auf einem Glasträger kultivierte COX-2+ wurden für 3 h bzw. 6 h mit LPS (1  $\mu$ g/ml), MG (10  $\mu$ M) oder MG+LPS inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit einem p65-Antikörper inkubiert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion wurde ein CY-2 markierter Sekundär-Ak verwendet.

## 5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu klären, ob durch den Einsatz proteasomaler Inhibitoren in glomerulären Mesangiumzellen NF- $\kappa$ B gehemmt und so LPS-induzierte proinflammatorische Effekte der COX-2 limitiert werden können. Zur besseren Übersicht bei der Komplexität der Ergebnisse wurden die im vorigen Abschnitt detailliert beschriebenen Beobachtungen vereinfachend in Abb. 30 zusammengestellt.

Aus den Vitalitätsanalysen lässt sich ableiten, dass die beiden Inhibitoren MG und MLN in einer Konzentration von 10  $\mu$ M sowohl isoliert als auch in Kombination mit LPS in einem Zeitfenster bis zu 6 h bedenkenlos einzusetzen sind (Abb. 5 und Abb. 6). Da unter dem Hemmer MLN die Vitalität der Zellen nach 24 h teilweise deutlich unter 90 % lag, muss davon ausgegangen werden, dass toxische Effekte auf die Zellen nach 24 h zunehmend an Bedeutung gewinnen (Abb. 4). Dies wird auch durch die größeren Standardabweichungen der CCL2 Expression nach 24 h im Vergleich zu den frühen Zeitpunkten belegt, die als progrediente Instabilität der zellulären Systeme von COX-2+ und VK gedeutet werden könnte (Abb. 13 und Abb. 14). Da in Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits für die frühen Zeitpunkte bis zu 6 h nach LPS-Stimulation eine signifikante Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie eine signifikante Expressionssteigerung der Chemokine CCL2 und CCL5 in COX-2+ nachgewiesen werden konnte, wurden die Experimente vorwiegend innerhalb der akuten LPS-Phase durchgeführt. Durch die Konzentrations-Wirkungs-Analysen konnte gezeigt werden, dass die höchste eingesetzte Konzentration der Proteasomenhemmer die kleinste Standardabweichung aufweist und zugleich die größte hemmende Wirkung auf die COX-2+ Zellen zeigt (Abb. 17 und Abb. 18), ohne dass die Vitalität der Zellen hierdurch deutlich erniedrigt ist (Abb. 3 und Abb. 4). Somit wurde für die folgenden Experimente eine MG bzw. MLN Konzentration von 10  $\mu$ M gewählt.

Nach Ermittlung optimaler Versuchsbedingungen wurde zunächst der Wirkmechanismus der Proteasomenhemmer überprüft. Die intrazelluläre Anhäufung polyubiquitinerter Proteine (Abb. 7) zeigt, dass die Funktionsfähigkeit des 26S Proteasoms durch die verwendeten Proteasomenhemmer deutlich eingeschränkt wird. Ferner demonstriert die Akkumulation von polyubiquitiniertem I $\kappa$ B- $\alpha$  in Proteasomenhemmer-behandelten Zellen (Abb. 9), dass I $\kappa$ B- $\alpha$  in den Zellen nicht mehr suffizient abgebaut werden kann. Wie eingangs beschrieben, sollte hierdurch verhindert werden, dass NF- $\kappa$ B von seinem Inhibitorprotein I $\kappa$ B- $\alpha$  freigesetzt wird, in den Zellkern trans-



**Abb. 30: Begrenzung proinflammatorischer COX-2 Effekte**

Bezug nehmend auf das in Abb. 2 vorgestellte Schaubild zur experimentellen Begrenzung proinflammatorischer COX-2 Effekte, wurden in der vorliegenden Abb. die tatsächlichen Ergebnisse vereinfachend zusammengestellt. Wie in der Arbeitshypothese angenommen führten die Proteasomenhemmer MG und MLN in COX-2+ zu einer verminderten Translokation von NF-κB in den Zellkern sowie zu einer stark reduzierten transaktivierenden Wirkung im Luciferase-Assay. Wider Erwarten erwies sich jedoch die Bindung von NF-κB an die DNA als leicht erhöht und die CCL2 Expression lediglich partiell inhibiert.

loziert und dort die Transkription seiner Zielgene beeinflusst (Abb. 2). In COX-2+ Zellen, für die experimentell eine massive Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufgezeigt wurde [60], war erwartungsgemäß auch mehr I $\kappa$ B- $\alpha$  nachzuweisen als in VK Zellen. Der Wirkmechanismus der eingesetzten Proteasomenhemmer konnte darüber hinaus auch auf Ebene von phosphoryliertem I $\kappa$ B- $\alpha$  nachvollzogen werden (Abb. 8). So akkumulierte phosphoryliertes I $\kappa$ B- $\alpha$  vor allem dort, wo eine massive Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen wurde, also wiederum in LPS-stimulierten Mesangiumzellen. Die Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren führte insbesondere in COX-2+ Zellen zu einer deutlichen Vermehrung von phosphoryliertem I $\kappa$ B- $\alpha$ . In VK Mesangiumzellen schien MLN dem Hemmer MG deutlich überlegen zu sein. Eine stärkere Wirksamkeit des Hemmers MLN im Vergleich zu MG konnte jedoch in Wiederholungsexperimenten nicht belegt werden.

Durch immunzytochemische Untersuchungen an fixierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Proteasomenhemmer nicht nur I $\kappa$ B- $\alpha$ , sondern auch NF- $\kappa$ B beeinflussen. So konnte eine LPS-induzierte massive Translokation von p65 in den Zellkern durch den Einsatz von Proteasomenhemmern deutlich vermindert, wenn auch nicht gänzlich unterdrückt werden (Abb. 29).

Im Luciferase Assay wurde untersucht, wie sich die Proteasomenhemmer auf die genregulierende Aktivität von NF- $\kappa$ B auswirken. Die Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren führte sowohl in COX-2+ als auch in VK Mesangiumzellen zu einer stark verminderten Aktivität von NF- $\kappa$ B. Die Aktivitätsminderung von NF- $\kappa$ B korrelierte hierbei mit dem Grad der Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter den jeweiligen Bedingungen (Abb. 23 und Abb. 24). Zum einen wurde festgestellt, dass der Einfluss proteasomaler Inhibitoren bei Kombination von MG bzw. MLN mit LPS deutlich größer ist als bei alleiniger Hemmerinkubation. Ferner war der Hemmereffekt in COX-2+ Zellen stärker ausgeprägt als in VK Mesangiumzellen. Erwartungsgemäß war die Aktivitätsminderung von NF- $\kappa$ B also in den Zellen am stärksten ausgeprägt, für die eine signifikante Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems beschrieben ist [60].

Mittels EMSA wurde untersucht, inwieweit die beobachtete Aktivitätsminderung von NF- $\kappa$ B auch mit einer verminderten Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA einhergeht. Wie bereits in der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, kommt es in COX-2+ Mesangiumzellen nach Stimulation mit LPS zu einem hyperinflammatorischen Effekt, der durch eine stark erhöhte Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA gekennzeichnet ist [60]. Interessanterweise konnte die Bindung von NF- $\kappa$ B an die entsprechende Konsensus-

sequenz durch proteasomale Inhibitoren nicht reduziert werden. In unstimulierten COX-2+ und VK Zellen bewirkten die Proteasomenhemmer sogar eine erhöhte Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA (Abb. 19).

Da die Proteasomenhemmer zu einer deutlichen Aktivitätsminderung von NF- $\kappa$ B führten, ohne dabei die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA wesentlich zu beeinträchtigen, wurde untersucht, inwieweit Proteasomenhemmer NF- $\kappa$ B in seiner Fähigkeit zur Transaktivierung beeinflussen. Die Transkription von Zielgenen wird über Transaktivierungsdomänen (TAD) der NF- $\kappa$ B Untereinheiten vermittelt. Während die NF- $\kappa$ B Untereinheit p50 keine TAD trägt und daher auch nur im heterodimeren Komplex transaktivierend wirken kann, hat NF- $\kappa$ B p65 gleich zwei c-terminale TAD [39]. Vor dem Hintergrund, dass p50/p50 Homodimere die Transkription von Zielgenen reprimieren können, wurde überprüft, ob Proteasomenhemmer eine Auswirkung auf die Zusammensetzung von NF- $\kappa$ B Dimeren haben. Durch einen Supershift für die NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65 wurde jedoch ausgeschlossen, dass die verminderte Aktivität von NF- $\kappa$ B im Luciferase-Assay mit unbeeinträchtigter Bindung im EMSA auf eine veränderte Zusammensetzung von NF- $\kappa$ B Dimeren zurückgeführt werden kann (Abb. 20).

Da die Untersuchung der NF- $\kappa$ B Untereinheiten keine Erklärung für die primär widersprüchlichen Ergebnisse des Luciferase-Assay und des EMSA lieferte, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die Proteasomenhemmer zu einer Strukturveränderung von NF- $\kappa$ B führen. Hierbei war Ausgangspunkt, dass nicht nur  $\kappa$ B- $\alpha$  sondern auch NF- $\kappa$ B p65 proteasomal degradiert wird. Die proteasomale Degradation von NF- $\kappa$ B p65 stellt einen zellulären Mechanismus dar, über den in Abwesenheit von  $\kappa$ B- $\alpha$  die Transkription von Zielgenen terminiert werden kann. Hierbei wird nach Bindung eines NF- $\kappa$ B Dimers an die DNA, die p65 Untereinheit zunächst polyubiquitiniert und im Anschluss durch das Proteasom abgebaut [37]. Aus diesem Grund wurde NF- $\kappa$ B p65 aus nukleären Proteinen immunpräzipitiert und genauer charakterisiert. Wie erwartet, führte die Behandlung von COX-2+ und VK Mesangiumzellen mit dem Proteasomenhemmer MG zu einer Anhäufung von nukleärem NF- $\kappa$ B p65 (Abb. 10). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es im Zellkern von COX-2+ Zellen sowohl bei isolierter Gabe von MG als auch bei Kombination von MG mit LPS zu einer massiven Akkumulation von polyubiquitiniertem NF- $\kappa$ B p65 kommt (Abb. 11). Auf die Frage, warum eine Polyubiquitinierung von nukleärem NF- $\kappa$ B p65 letztendlich zu einer massiv verminderten Aktivität von NF- $\kappa$ B führen könnte, soll an späterer Stelle genauer eingegangen werden.

Um die Effekte der Proteasomenhemmer auf ein Zielgen von NF- $\kappa$ B zu beurteilen, wurde der Einfluss von MG bzw. MLN auf die CCL2 Expression untersucht. Hierbei wurde das Chemokin CCL2 als Zielgen ausgewählt, da es im Rahmen von Glomerulonephritiden frühzeitig hochreguliert wird [35] und darüber hinaus auch mit dem Ausmaß einer renalen Schädigung korreliert [53]. Die Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren führte in LPS-stimulierten COX-2+ Zellen zu den Zeitpunkten 3 h und 6 h zu einer partiellen, jedoch nicht signifikanten Hemmung der CCL2 Expression, während sich die Hemmer in LPS-stimulierten VK Zellen leicht steigernd auf die CCL2 Expression auswirkten (Abb. 13 und Abb. 14). Überraschend mündete auch die alleinige Behandlung mit den Proteasomenhemmern nicht in einer Hemmung, sondern in einer Induktion der CCL2 Expression (Abb. 15 und Abb. 16). Die Beobachtung, dass Proteasomenhemmer neben antiinflammatorischen Effekten auch proinflammatorisch auf Zellen wirken können, wurde bereits in einer Arbeit von Nakayama aufgezeigt, in der proteasomale Inhibitoren eine paradoxe Induktion von CCL2 in unstimulierten Mesangiumzellen provozierten [27]. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen an Ratten, die nach der Behandlung mit dem Proteasomenhemmer MLN-273 eine erhöhte glomeruläre Expression von CCL2 zeigten [59].

Um die primär widersprüchlichen Ergebnisse des EMSA, des Luciferase-Assay und die CCL2 Expression bewerten zu können, wurde im Folgenden die Aussagekraft der einzelnen Methoden gegenübergestellt.

Durch einen EMSA können im zellfreien System Informationen über die Bindungsfähigkeit nukleärer Proteine an die reine DNA erhoben werden. Ein EMSA erlaubt deshalb keinerlei Aussagen über den Aktivitätsgrad DNA-bindender Proteine. Eine erhöhte Bindung eines Proteins an cis-Elemente auf der DNA kann sowohl eine Transkriptions-induzierende als auch eine Transkriptions-reprimierende Wirkung auf das entsprechende Zielgen haben. Darüber hinaus sind kooperative Effekte zwischen verschiedenen transkriptionsregulierenden Proteinen nicht erfassbar, die letztendlich eine Transaktivierung des Zielgens zur Folge haben. Die Beobachtung, dass die Behandlung von COX-2+ Zellen mit Proteasomenhemmern nicht zur verminderten Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA führt, schließt demnach eine Aktivitätsminderung von NF- $\kappa$ B keinesfalls aus.

Im Vergleich zum EMSA misst der Luciferase-Assay im zellulären System. Durch Einbringen von Vektoren in die Zellen wird eine Situation geschaffen, die den physio-

logischen Bedingungen deutlich näher kommt, als es im EMSA der Fall ist. Durch den experimentellen Aufbau kann nicht nur das Ausmaß einer Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und die Bindung an entsprechende DNA-Konsensussequenzen, sondern gleichzeitig auch die genregulierende Aktivität DNA-bindender Proteinen erfasst werden. Der im Luciferase-Assay verwendete NF- $\kappa$ B Reportervektor enthält im Promotor fünf hintereinander geschaltete NF- $\kappa$ B Enhancer-Kassetten, über die die Transkription des Luciferase-Gens reguliert wird. Demnach wird die Aussage des Luciferase-Assay dadurch limitiert, dass lediglich die Bedeutung eines einzelnen Transkriptionsfaktors abgeschätzt wird, während die Regulation eines Gens wie CCL2 nicht nur NF- $\kappa$ B, sondern verschiedenen Transkriptionsfaktoren unterliegt [34].

Während der EMSA und der Luciferase-Assay folglich nur zur Untersuchung von Teilaspekten des proinflammatorischen NF- $\kappa$ B Signalweges geeignet sind, wird durch die Aufreinigung der mRNA aus den Zellen die gesamte regulative Einheit von CCL2 erfasst. Da die CCL2 Expression sämtliche Wechselwirkungen von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Adapterproteinen einbezieht, ist die Aussage sehr viel komplexer als die des EMSA oder Luciferase-Assay. So werden zur Transaktivierung eines NF- $\kappa$ B regulierten Gens wie CCL2 nach der Bindung eines NF- $\kappa$ B Dimers an die DNA verschiedene Koaktivatoren wie CBP/p300 und PCAF benötigt [33]. Bevor sich CBP/p300 an NF- $\kappa$ B anlagern kann, muss NF- $\kappa$ B p65 zunächst durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden [12]. Für die Aktivierung der Transkription eines Zielgens ist nach Assemblierung des Aktivator-Koaktivator-Komplexes eine Acetylierung der p65 Untereinheit von Bedeutung [12]. Die Koaktivatoren CBP/p300 sowie PCAF zeichnen sich durch eine intrinsische Histonacetyltransferaseaktivität aus, die über eine lokale Umstrukturierung des Chromatins letztendlich eine Transaktivierung des Zielgens bewirkt [18]. Da für die Transaktivierung eines Gens durch NF- $\kappa$ B die p65 Untereinheit also nicht nur epigenetisch modifiziert werden muss, sondern auch eine Komplexbildung mit Koaktivatoren wie CBP/p300 nötig ist, ist es denkbar, dass eine Stabilisierung von p65 im Zellkern mit veränderter Tertiärstruktur die Assemblierung des Aktivator-Komplexes verhindert. Eine gestörte Interaktion beteiligter Proteine könnte so erklären, warum NF- $\kappa$ B im EMSA zwar weitgehend unbeeinträchtigt an die DNA binden kann, es dabei jedoch nicht mehr zur Transaktivierung von CCL2 kommt.

Um die partielle Inhibition der CCL2 Expression bei nahezu kompletter Aktivitätshemmung von NF- $\kappa$ B in COX-2+ zu erklären, ist zu berücksichtigen, dass Proteasomenhemmer nicht nur die Aktivität von NF- $\kappa$ B beeinträchtigen, sondern auch den Funktionszustand von weiteren Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. So könnte die im EMSA erhöhte Bindung von AP-1 an die DNA durch eine erhöhte Aktivität expressionssteigernd auf die Expression von CCL2 wirken. Eine Gegenregulation durch AP-1 könnte so dazu beitragen, dass die CCL2 Expression durch proteasomale Inhibitoren lediglich partiell gehemmt wird. Eine derartige gegenläufige Regulation mit einer signifikant verminderten NF- $\kappa$ B Aktivität und erhöhten AP-1 Aktivität wurde für den Proteasomenhemmer MG in bovinen Epithelzellen aus der Aorta (BAEC) nachgewiesen [11]. Ferner wurde auch die bereits erwähnte paradoxe Induktion von CCL2 in Mesangiumzellen bei Behandlung mit MG auf eine Aktivierung von AP-1 zurückgeführt [27]. Leider war es auf Grund methodischer Probleme nicht möglich eine erhöhte Aktivität von AP-1 mittels Luciferase-Assay in COX-2+ und VK Mesangiumzellen zu belegen.

Eine gegenläufige Regulation von AP-1 und NF- $\kappa$ B könnte also, neben einer gestörten Transaktivierung des NF- $\kappa$ B regulierten CCL2 Gens, ein weiterer komplexer Mechanismus sein, durch den die primär widersprüchlichen Ergebnisse des EMSA, des Luciferase-Assay und der CCL2 Expression zu erklären sind.

Wie in den einleitenden Worten thematisiert, ist das Ubiquitin-Proteasom-System weitaus komplexer, als es seine Entdecker Anfang der 80er Jahre erwarteten. Die Ubiquitinierung zellulärer Proteine ist ein hochkomplexer Prozess, der bisher nur partiell verstanden ist. Neueren Erkenntnissen zufolge wird die Ubiquitinierung von Proteinen nicht nur durch eine Vielzahl ubiquitinierender Enzyme, sondern auch durch deubiquitinierende Enzyme, sogenannte *deubiquitylating enzymes* (DUBs) reguliert. Zu den DUBs, die in NF- $\kappa$ B Signalwege eingreifen, gehört beispielsweise das Protein A20, das sowohl als E3 Ligase bei der Ubiquitinierung fungiert, als auch eine Domäne mit DUB Aktivität aufweist [47]. Da die Prozesse der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung sehr eng nebeneinander ablaufen, bisweilen sogar durch dasselbe Enzym ausgeführt werden, ist es denkbar, dass die durch MG bzw. MLN induzierte Akkumulation polyubiquitinerter Proteine wie I $\kappa$ B- $\alpha$  oder nukleärem NF- $\kappa$ B p65 durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes von Ubiquitinierung und Deubiquitinierung letztlich zur Aktivierung von DUBs führt. In vitro Untersuchungen haben ergeben, dass DUBs wie A20 in der Lage sind, sowohl K48 als auch K63 polyubiquitinierte Zielproteine zu deubiquitinieren [47]. Die Verwendung der Proteasomenhem-

mer MG und MLN könnte demzufolge durch ein Überwiegen ubiquitiniertes Proteine zur Aktivierung von DUBs führen, die dann durch Deubiquitinierung von K63 verknüpften Ubiquitin-Ketten eine Auswirkung auf Protein-Protein-Wechselwirkungen haben könnten.

Die Störung des Gleichgewichtes zwischen Ubiquitinierung und Deubiquitinierung könnte also, neben den bereits diskutierten Erklärungsversuchen einer gegenläufigen Regulation von AP-1 und NF- $\kappa$ B sowie einer gestörten Transaktivierung des NF- $\kappa$ B regulierten CCL2 Gens, einen dritten Mechanismus darstellen, der zu den scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen des EMSA, des Luciferase-Assay und der CCL2 Expression beigetragen haben könnte.

Bedingt durch die Unspezifität proteasomaler Inhibitoren konnten die proinflammatorischen Effekte der COX-2 somit nur in den Zellen partiell limitiert werden, in denen eine massive Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems vorliegt, während die Proteasomenhemmer in Zellen mit basaler oder nur geringfügig induzierter NF- $\kappa$ B Aktivität eine proinflammatorische Wirkung auf die Zellen hatten. Da sich die Effekte der Proteasomenhemmer auf Mesangiumzellen als äußerst komplex erwiesen, stellt sich die Frage, inwieweit bei der Untersuchung der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen nicht präferenziell auf spezifischere Inhibitoren wie IKK Hemmer zurückgegriffen werden sollte, um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nicht auf der Basis einer Klasse von Hemmern abschätzen zu müssen, deren Unspezifität schon in der Zellkultur auffällt.

## 6 Zusammenfassung

Bei der Pathogenese verschiedener GN kommt der Proliferation von Mesangiumzellen eine entscheidende Bedeutung zu [14]. Die COX-2 wird im Rahmen einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse wie auch bei GN frühzeitig hochreguliert [3, 19].

Bei der Vermittlung proinflammatorischer COX-2 Effekte wurde NF- $\kappa$ B als zentraler Transkriptionsfaktor identifiziert [60]. NF- $\kappa$ B transloziert nach Freisetzung von seinem Inhibitorprotein I $\kappa$ B- $\alpha$  in den Zellkern und reguliert dort die Transkription seiner Zielgene [21] wie das proinflammatorische Chemokin CCL2 [27].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch den Einsatz proteasomaler Inhibitoren die Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  verhindert und so auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in glomerulären Mesangiumzellen eingewirkt werden kann. Um proinflammatorische Effekte in den Mesangiumzellen abzuschätzen, wurde die Expression des Chemokin CCL2 bestimmt (Abb. 2).

Es zeigte sich, dass die CCL2 Expression durch Proteasomenhemmer nur partiell und lediglich bei massiver Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems vermindert wurde. In Zellen, deren NF- $\kappa$ B System nicht oder nur schwach aktiviert ist, wurde die CCL2 Expression durch Behandlung mit Proteasomenhemmern nicht abgeschwächt, sondern sogar geringfügig gesteigert. Die Unfähigkeit proteasomaler Inhibitoren, proinflammatorische Effekte der COX-2 signifikant zu limitieren, könnte auf die Unspezifität der Proteasomenhemmer und eine Gegenregulation alternativer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 zurückzuführen sein [11, 27]. Zusätzlich gibt es Anhalt dafür, dass die Proteasomenhemmer den nukleären Abbau der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 beeinträchtigen und auf diesem Wege möglicherweise die Assemblierung eines Aktivator Komplexes für die Transkription von Zielgenen wie CCL2 erschweren. Ferner könnte die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine über eine Aktivierung deubiquitinierender Enzyme zu Wechselwirkungen zwischen Proteinen führen [47], die an der Vermittlung der COX-2 Effekte beteiligt sind und zur Komplexität der Ergebnisse beitragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen die Frage auf, inwieweit Proteasomenhemmer wegen ihrer unspezifischen Effekte im Rahmen antiinflammatorischer Therapieveruche überhaupt eingesetzt werden sollten, oder ob nicht vielmehr auf spezifischere Hemmer von NF- $\kappa$ B wie die IKK Hemmer zurückgegriffen werden sollte, um die Pathogenese von GN experimentell zu untersuchen.

## Literatur

- [1] Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA (2004) Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?—Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci* 7(2):217–226
- [2] Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Con-  
tel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM (1995) Renal abnormalities and  
an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*  
378(6555):406–409
- [3] Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte LBVD,  
Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*  
12(12):1063–1073
- [4] Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P (1990) The induction  
and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human mo-  
nocytes. *J Biol Chem* 265(28):16737–16740
- [5] Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby  
DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.  
*Nat Med* 5(6):698–701
- [6] Guan H, Hou S, Ricciardi RP (2005) DNA binding of repressor nuclear factor-  
kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase  
A catalytic subunit. *J Biol Chem* 280(11):9957–9962
- [7] Harris RC, Breyer MD (2001) Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in  
the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(1):F1–11
- [8] Hemler M, Lands WE (1976) Purification of the cyclooxygenase that forms  
prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol*  
*Chem* 251(18):5575–5579
- [9] Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*  
2(3):195–201
- [10] Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2—10 years later. *J Pharmacol Exp*  
*Ther* 300(2):367–375

- [11] Hipp MS, Urbich C, Mayer P, Wischhusen J, Weller M, Kracht M, Spyridopoulos I (2002) Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1. *Eur J Immunol* 32(8):2208–2217
- [12] Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW (2004) SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell* 16(2):245–255
- [13] Holdsworth SR, Kitching AR, Tipping PG (2000) Chemokines as therapeutic targets in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9(5):505–511
- [14] Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR (1998) Glomerulonephritis. *N Engl J Med* 339(13):888–899
- [15] Jocks T, Zahner G, Freudenberg J, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA (1996) Prostaglandin E1 reduces the glomerular mRNA expression of monocyte-chemoattractant protein 1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 7(6):897–905
- [16] Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):240–246
- [17] Karin M, Yamamoto Y, Wang QM (2004) The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3(1):17–26
- [18] Kiernan R, Brès V, Ng RWM, Coudart MP, Messaoudi SE, Sardet C, Jin DY, Emiliani S, Benkirane M (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem* 278(4):2758–2766
- [19] Komers R, Epstein M (2002) Cyclooxygenase-2 expression and function in renal pathophysiology. *J Hypertens Suppl* 20(6):S11–S15
- [20] Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266(20):12866–12872
- [21] Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10):725–734

- [22] Liu YC, Penninger J, Karin M (2005) Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5(12):941–952
- [23] Mezzano SA, Barría M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J (2001) Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 60(4):1366–1377
- [24] Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 251(9):2629–2636
- [25] Morris JK, Richards JS (1996) An E-box region within the prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) promoter is required for transcription in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 271(28):16633–16643
- [26] Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ (2001) Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 286(8):954–959
- [27] Nakayama K, Furusu A, Xu Q, Konta T, Kitamura M (2001) 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(3):1145–1150
- [28] Oda T, Ueda A, Shimizu N, Handa H, Kasahara T (2002) Suppression of monocyte chemoattractant protein 1, but not IL-8, by alprazolam: effect of alprazolam on c-Rel/p65 and c-Rel/p50 binding to the monocyte chemoattractant protein 1 promoter region. *J Immunol* 169(6):3329–3335
- [29] O’Neill LAJ (2006) Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 5(7):549–563
- [30] Panzer U, Steinmetz OM, Turner JE, Meyer-Schwesinger C, von Ruffer C, Meyer TN, Zahner G, Gómez-Guerrero C, Schmid RM, Helmchen U, Moeckel GW, Wolf G, Stahl RAK, Thaïss F (2009) Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(2):F429–F439
- [31] Parry GC, Martin T, Felts KA, Cobb RR (1998) IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in endothelial cells is blocked by proteasome inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(6):934–940

- [32] Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1):49–62
- [33] Quivy V, Lint CV (2004) Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 68(6):1221–1229
- [34] Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL (1999) Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 65(3):291–298
- [35] Rovin BH (1999) Chemokines as therapeutic targets in renal inflammation. *Am J Kidney Dis* 34(4):761–4; discussion 765–7
- [36] Rovin BH, Yoshiyura T, Tan L (1992) Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol* 148(7):2148–2153
- [37] Saccani S, Marazzi I, Beg AA, Natoli G (2004) Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J Exp Med* 200(1):107–113
- [38] Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlondorff D (1993) Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150(5):1971–1978
- [39] Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M (2004) NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *ChemBiochem* 5(10):1348–1358
- [40] Schneider A, Harendza S, Zahner G, Jocks T, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, , Stahl RA (1999) Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular monocyte chemoattractant protein-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55(2):430–441
- [41] Schneider A, Stahl RA (1998) Cyclooxygenase-2 (COX-2) and the kidney: current status and potential perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 13(1):10–12
- [42] Schopenhauer A (1989). Aphorismen zur Lebensweisheit. 5. Auflage Goldmann Verlag, München

- [43] Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL (1989) Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4):1178–1182
- [44] Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145–182
- [45] Sridhar P, Liu Y, Chin LD, Borja CE, Mann M, Skopicki HA, Freter RR (1999) Platelet-derived growth factor-stimulated expression of the MCP-1 immediate-early gene involves an inhibitory multiprotein complex. *Mol Cell Biol* 19(6):4219–4230
- [46] Strand V (2007) Are COX-2 inhibitors preferable to non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with risk of cardiovascular events taking low-dose aspirin? *Lancet* 370(9605):2138–2151
- [47] Sun SC (2008) Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol* 8(7):501–511
- [48] Sutcliffe AM, Clarke DL, Bradbury DA, Corbett LM, Patel JA, Knox AJ (2009) Transcriptional regulation of monocyte chemotactic protein-1 release by endothelin-1 in human airway smooth muscle cells involves NF-kappaB and AP-1. *Br J Pharmacol* 157(3):436–450
- [49] Tanabe T, Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:95–114
- [50] Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55(4):564–574
- [51] Trifan OC, Hla T (2003) Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 7(3):207–222
- [52] Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97–120
- [53] Viedt C, Orth SR (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol Dial Transplant* 17(12):2043–2047
- [54] Warner TD, Mitchell JA (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 18(7):790–804

- [55] Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):599–609
- [56] Wenzel U, Dominiak P, Neumayer HH, Wolf G (2003) Hemmung der Progression von chronischen Nierenerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 100:2072–2079
- [57] White FA, Bhangoo SK, Miller RJ (2005) Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 4(10):834–844
- [58] Williams CS, DuBois RN (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270:G393–G400
- [59] Zahner G, Grosser K, Streichert T, Meyer-Schwesinger C, Ruckdeschel K, Steinbach B, Gatzemeier S, Stahl R, Thaiss F (2007) Resolution of Inflammatory Renal Diseases and Downregulation of Lipopolysaccharide (LPS) Response in Mesangial Cells Are Delayed by Proteasome Inhibitors. *J Am Soc Nephrol (Abstract Issue)* 18:659A. (Abstract)
- [60] Zahner G, Stahl RA, Thaiss F (2005) Pro- and anti-inflammatory role of cyclooxygenase-2 on CCL2 and CCL5 expression in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol (Abstract Issue)* 16:606A. (Abstract)
- [61] Zahner G, Wolf G, Ayoub M, Reinking R, Panzer U, Shankland SJ, Stahl RA (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *J Biol Chem* 277(12):9763–9771
- [62] Zahner G, Wolf G, Schroeder S, Stahl RA (2006) Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation by cyclooxygenase-2 overexpression is abolished through reactive oxygen species. *FEBS Lett* 580(10):2523–2528
- [63] Zarraga IGE, Schwarz ER (2007) Coxibs and heart disease: what we have learned and what else we need to know. *J Am Coll Cardiol* 49(1):1–14

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Friedrich Thaiss für die Bereitstellung des Themas sowie die allzeit motivierende und anerkennende Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Gunther Zahner für die hervorragende kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit, seiner Bereitschaft die Experimente mit mir durchzuplanen, inhaltliche Zusammenhänge zu erläutern und meine zahlreichen Fragen zu beantworten.

Des Weiteren möchte ich mich ausdrücklich bei allen Mitarbeitern des Labors für ihre Unterstützung und das überaus nette Arbeitsklima bedanken. Hierbei danke ich insbesondere Bettina Steinbach und Stefan Gatzemeier für Ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner EMSA-Experimente. An dieser Stelle will ich auch Saskia Schröder und Anett Peters nicht unerwähnt lassen, die mir in meiner Laborzeit mit hilfreichen Tipps und Anregungen zur Seite standen. Jan Turner und Hans-Joachim Paust danke ich für ihre geduldigen Hilfestellungen bei der Nutzung des FACS-Gerätes.

Zu guter Letzt danke ich mich auch allen Personen aus meinem privaten Umfeld, die mir in meiner Laborzeit und bei der Anfertigung meiner Dissertation motivierend zur Seite gestanden haben.

# Lebenslauf

## Persönliches

Name Katharina Cornelia Großer  
Kontakt katharina.grosser@stud.uke.uni-hamburg.de  
Geburtsdatum und -ort 11.02.1984 in Hamburg

## Schullaufbahn

1990-1992 Grundschule Goosacker, Hamburg  
1992-1994 Grundschule Windmühlenstieg, Hamburg  
1994-1995 Gymnasium Christianeum, Hamburg  
1995-2003 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg  
2003 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,0)

## Studium

Oktober 2003 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg  
August 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  
Juni 2008 Erwerb der Zusatzqualifikation "Grundlagen der Molekularen und Experimentellen Medizin"  
Februar 2009 USMLE Step 1 (238 Punkte<sup>1</sup>)  
September 2009 USMLE Step 2CK (231 Punkte<sup>2</sup>)  
Mai 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5) sowie Abschluss des Studiums der Medizin (Gesamtnote 1,66)

## Famulaturen

Januar 2006 Zentrale Notaufnahme, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg  
Februar 2006 Gastroenterologie, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg  
März 2006 Kardiologie, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg  
August 2008 Innere Medizin, Framingham Union Hospital- Metro West Medical Center, Framingham, USA

## Praktisches Jahr

1. Terial Innere Medizin Beth Israel Medical Center, New York, USA  
General Hospital- Health Sciences Centre, St. John's, Kanada  
2. Terial Neurologie UKE, Hamburg  
3. Terial Chirurgie Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

---

<sup>1</sup>Bestehensgrenze 185 Punkte; mittlere Punktzahl US-amerikanischer Erstprüflinge 222 ±22

<sup>2</sup>Bestehensgrenze 184 Punkte; mittlere Punktzahl US-amerikanischer Erstprüflinge 229 ±23

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: