



**Auswirkungen und zugrunde liegende Mechanismen von  
hormetischen Stimuli auf das Reparatur- und  
Regenerationsvermögen der Haut**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky  
Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

angenommene

**Dissertation**

von

**Frau Sandra Annette Bolhuis**

geboren am 17.11.1980

in Leer

Gutachterin: Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Tag der Disputation: 01. Juni 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	1
1.1.1 Folgen der Hautalterung	3
1.2 Degradative Systeme in der Zelle	4
1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasomen-System	5
1.2.1.1 Hitzeschockproteine	7
1.2.2 Autophagie	8
1.2.2.1 Der Prozess der Makroautophagie	9
1.2.2.2 Experimentelle Inhibition und Induktion von Makroautophagie	12
1.2.3 Cross-Talk zwischen Autophagie und dem UPS	12
1.2.4 Zelltod durch Autophagie: Cross-Talk zwischen Makroautophagie und Apoptose	13
1.3 Hormetische Einflüsse auf Alterungsprozesse	16
1.4 Posttranslationale Modifikationen durch SUMO	18
1.4.1 SUMOylierung von Proteinen	19
1.4.2 Funktionen von SUMO	20
1.4.3 Das Ubiquitin-Proteasomen-System und SUMO	21
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3 Material</b>	<b>24</b>
3.1 Geräte, Materialien und Chemikalien für Zellkulturarbeiten und Hautmodelle	24
3.2 Geräte, Materialien und Chemikalien für SDS-PAGE	25
3.3 Geräte, Materialien und Chemikalien für Western Blot	26
3.3.1 Antikörper für den immunocytochemischen Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran	27
3.4 Geräte, Materialien und Chemikalien für Immunocytochemie	27
3.4.1 Antikörper für die Immunocytochemie	28
3.5 Geräte, Materialien und Chemikalien für Molekularbiologie	29
3.5.1 Isolierung von RNA aus Fibroblasten und Keratinocyten	29
3.5.2 RT-PCR	29
3.5.3 PCR	29
3.5.4. Microarrayanalysen	29
3.6 Geräte, Materialien und Chemikalien für Cytotoxizitätsassays	30
3.7 Geräte, Materialien und Chemikalien für Sequentielle Extraktion	30
3.8 Geräte, Materialien und Chemikalien für Proteasomen-Assay	30
3.9 2D-Gelelektrophorese	30
3.10 In vitro SUMOylierung von Vimentin	31
<b>4 Methoden</b>	<b>32</b>
4.1 Zellbiologische Methoden	32
4.1.1 Kultivierung von primären Keratinocyten und Fibroblasten	32
4.1.2 Passagieren von primären Keratinocyten und Fibroblasten	32
4.1.3 Beschichtung von Mikrotiterplatten	32
4.1.4 Kryokonservierung von Fibroblasten und Keratinocyten	33
4.1.5 Auftauen und Wiederinkulturnahme von primären Fibroblasten und Keratinocyten	33
4.1.6 Kultivierung und Behandlung von Phenion®-Hautmodellen	33
4.2 Behandlung der Zellen mit Stressoren	34
4.2.1 Proteasomale Inhibition	34

4.2.2 Induktion von Makroautophagie.....	34
4.2.3 Inhibition von Makroautophagie.....	34
4.2.4 Hitzestress.....	34
4.3 Morphologische Untersuchungen.....	35
4.4 Proteinbiochemische Methoden.....	35
4.4.1 Probenaufbereitung für die SDS-PAGE.....	35
4.4.2 Isolierung von Proteinen aus Hautmodellen.....	35
4.4.3 Proteinbestimmung nach NEUHOFF (1979).....	35
4.4.4 Molekulargewicht-Standard.....	36
4.4.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	36
4.4.6 ECL-Western Blot.....	37
4.4.6.1 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran.....	37
4.4.6.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf der Trägermembran.....	37
4.5 Immuncytochemische Methoden.....	38
4.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit Monolayerkulturen.....	38
4.5.2 Anfertigung von Kryostatschnitten von Hautmodellen.....	40
4.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Hautmodellschnitten.....	40
4.6 Molekularbiologische Methoden.....	40
4.6.1 RNA-Isolierung und RT-PCR.....	40
4.6.2 PCR.....	41
4.6.3 Microarray-Analysen.....	42
4.6.3.1 cDNA-Synthese und -Labeling.....	42
4.6.3.2 Microarray-Hybridisierung.....	43
4.7 Cytotoxizitätsassays.....	44
4.7.1 MTT-Assay.....	44
4.7.2 Neutralrot-Assay.....	44
4.8 Sequentielle Extraktion.....	45
4.9 2D-Gelelektrophorese.....	45
4.9.1 Herstellung von Zelllysaten für die 2D-Gelelektrophorese.....	45
4.9.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	45
4.9.2.1 Rehydrierung der IEF-Strips.....	45
4.9.2.2 Isoelektrische Fokussierung.....	46
4.9.2.3 Equilibrierung der fokussierten Strips.....	46
4.9.3 Analyse SUMOylierter Proteine.....	46
4.10 In vitro SUMOylierung von Vimentin.....	47
4.11 Proteasomen-Aktivitäts-Assay.....	47
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
5.1 Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf Fibroblasten und Keratinocyten.....	49
5.1.1 Morphologie, Cytotoxizität und proteasomale Aktivität.....	49
5.2 Induktion von Hitzeschockproteinen in Fibroblasten und Keratinocyten.....	52
5.2.1 Auswirkungen proteasomaler Inhibition.....	52
5.2.2 Microarrayanalyse der Auswirkung von MG132 auf die Genexpression.....	55
5.2.3 Auswirkungen von MG132 auf Hautmodelle.....	58
5.3 Induktion von Hitzeschockproteinen nach Hitzestress in Fibroblasten und Keratinocyten.....	59
5.4 Makroautophagie und proteasomale Inhibition in Fibroblasten und Keratinocyten.....	61
5.5 Induktion von Autophagie nach Hitzestress.....	65
5.6 Wirkungen von 3-Methyladenin, einem Inhibitor der MA, auf Fibroblasten und Keratinocyten.....	66
5.6.1 Einfluss von 3-Methyladenin auf Apoptose.....	69

5.6.2 Einfluss von 3-Methyladenin auf das Cytoskelett.....	70
5.6.3 Langzeitwirkung von 3-Methyladenin.....	72
5.7 Aktivierung von MA in Fibroblasten und Keratinocyten mittels Rapamycin.....	75
5.8 SUMOylierung und Ubiquitinierung von Proteinen in Fibroblasten und Keratinocyten .....	77
5.8.1 Ist Vimentin ein Zielprotein von SUMO-1?.....	85
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>88</b>
6.1 Die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut.....	88
6.1.1 Stimulation des UPS als Ziel hormetischer Effekte in der Haut.....	89
6.1.2 Stimulation von Autophagie als Ziel hormetischer Effekte in der Haut.....	90
6.1.3 Stimulation der Hitzestressantwort als Ziel hormetischer Effekte in der Haut.....	92
6.2 Vergleich der Stressantworten von Fibroblasten und Keratinocyten.....	94
6.2.1 Unterschiede in den Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf Fibroblasten und Keratinocyten.....	94
6.2.2 Die Bedeutung der MG132-induzierten Makroautophagie.....	95
6.2.2.1 Makroautophagie und Apoptose in Fibroblasten und Keratinocyten.....	97
6.3 Bedeutung der SUMOylierung von Proteinen in Fibroblasten und Keratinocyten.....	98
6.3.1 Zielproteine für SUMO-1 in Fibroblasten.....	100
6.3.2 Bedeutung von SUMO in der Haut.....	101
6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	103
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>8 Summary.....</b>	<b>109</b>
<b>9 Literatur.....</b>	<b>112</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>120</b>
<b>11 Curriculum vitae.....</b>	<b>121</b>
<b>12 Erklärung.....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
A. bidest	Aqua bidest
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovine serum albumine
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDAC6	Histondeacetylase 6
HMK	Hoffmann-Modulationskontrast
HRP	Horseradish Peroxidase
HSF-1	Hitzeschockfaktor-1
Hsps	Hitzeschockproteine
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Lamp2a	lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2a
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MA	Makroautophagie
MG132	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MTOC	Mikrotubuli- organisierendes Zentrum (microtubule organising center)
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Stichprobenanfang
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotations per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris-Buffered Saline-Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin

TH	Totalhomogenat
TRITC	Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Der menschliche Körper wird durch die Haut vor äußeren Einflüssen geschützt. Dieses größte Organ des Menschen bildet dabei eine physiologische Barriere zwischen der Umwelt und dem inneren Milieu des Organismus und ist unmittelbar verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Reparaturmechanismen und Erneuerungsprozesse der Haut spielen bei der Aufrechterhaltung ihrer Schutzfunktion eine wichtige Rolle, können aber durch Umwelteinflüsse und Alterungsprozesse beeinträchtigt werden.

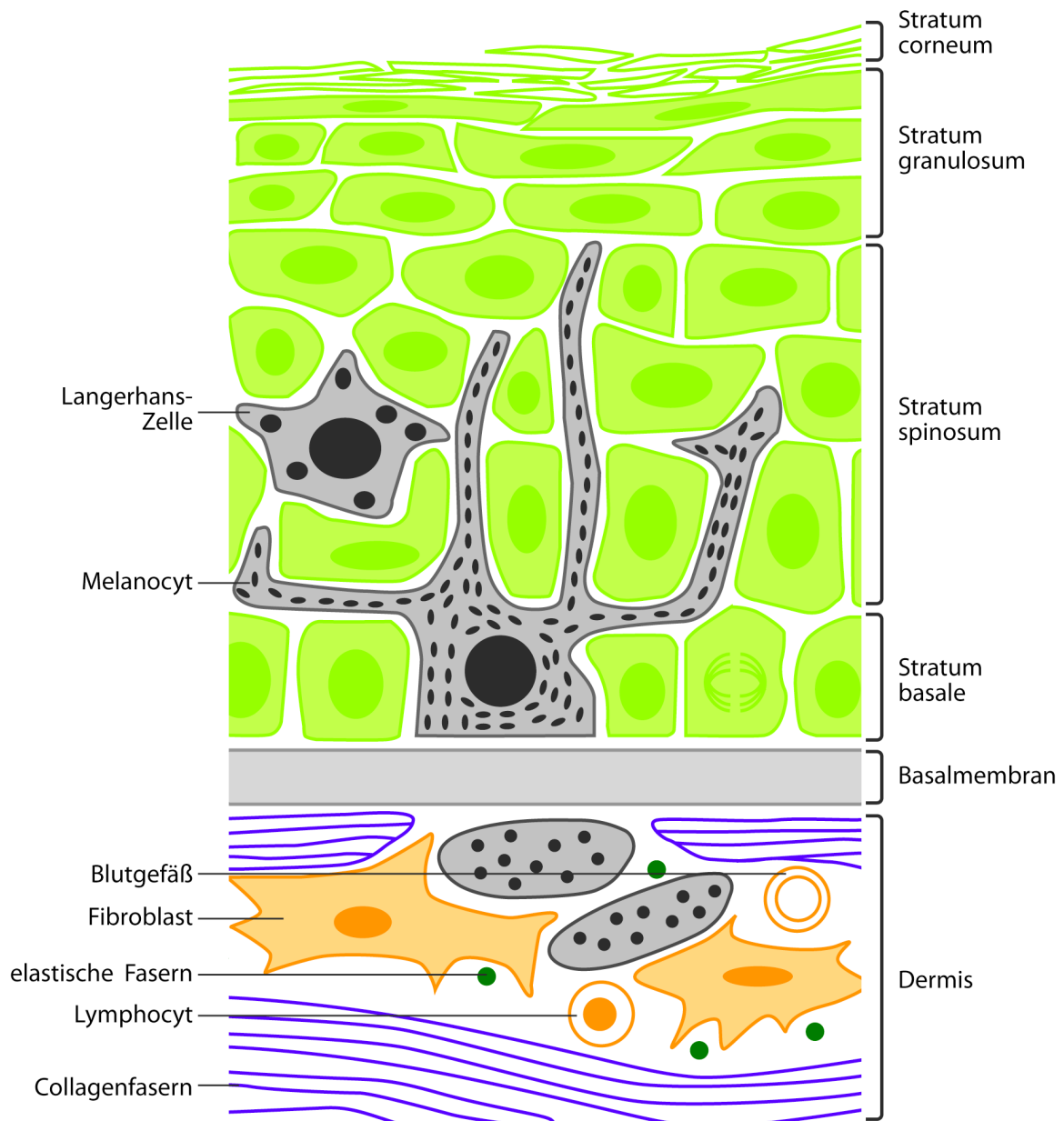
Die Haut besteht aus zwei Hauptgeweben, der mehrschichtigen Epidermis (Oberhaut) und dem darunter liegenden Bindegewebe, der kollagenreichen Dermis (Lederhaut). Unter der Dermis befindet sich die Subcutis (Unterhautfettgewebe), die aus einem lockeren, stark dehnbaren Bindegewebe mit eingelagerten Adipocysten besteht. Dieses subcutane Fettgewebe dient der Wärmeisolierung, dem mechanischen Schutz und ist Energiespeicher.

Fibroblasten sind der Hauptzelltyp in der Dermis, die als Stütz- und Bindegewebe mit hoher mechanischer Festigkeit dient und von zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen durchzogen wird (Abb. 1). Die Dermis besteht aus sich kreuzenden, netzartig durchflochtenen Bündeln kollagener und elastischer Fasern, der extrazellulären Matrix (ECM). Fibroblasten sind für den Aufbau der ECM verantwortlich, da sie die Vorstufen des Collagens, Glycosaminoglycane und auch Collagenasen, die Collagene abbauen, synthetisieren. Fibrocyten sind seneszente Fibroblasten. Sie sind nicht mehr an der Synthese der Bestandteile der ECM beteiligt. Die Anzahl und das Verhältnis von Fibroblasten und Fibrocyten charakterisieren die synthetische Aktivität des Bindegewebes. Die Dermis ist über die Basalmembran mit der Epidermis verbunden (Abb. 1).

Auf dieser Basalmembran, der Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis, liegt das Stratum basale der Epidermis (Abb. 1). Das Stratum basale besteht aus einer Reihe zylindrischer Basalzellen, die mitotisch aktiv sind und deren Teilung die Grundlage für die ständige Erneuerung und Regeneration der Epidermis bildet. Die Basalzellen adherieren über Hemidesmosomen und Fokalkontakte an die Basalmembran (reviewed in Suter et al., 2009). Die Tochterzellen der mitotisch aktiven Basalzellen sind die Keratinocyten, die zu 90% Bestandteil der Epidermis sind. Sie wandern in einem streng kontrollierten



Differenzierungsprozess zur Hautoberfläche, dem Stratum corneum, wo sie eine Schicht aus abgeflachten, keratinisierten Hautschuppen (Korneocyten) bilden.



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Haut.** Zu sehen sind die verschiedenen Schichten der Epidermis, die über die Basalmembran mit der Dermis verbunden ist.

Dieser Prozess ist innerhalb von 28 Tagen abgeschlossen. Zwischen den Basalzellen im Stratum basale sind zudem Melanocyten lokalisiert, die die DNA der Keratinocyten durch Abgabe des Pigments Melanin vor UV-Strahlung schützen, sowie Merkel-Zellen, spezielle Sinneszellen, die als Druckrezeptoren wirken.

Nach außen an das Stratum basale schließt das Stratum spinosum an, die Stachelzellschicht (Abb. 1). Die Zellen werden hier größer und auch zunehmend runder. Sie kommunizieren über Desmosomen miteinander. In dieser Schicht tritt die Keratinisierung und Synthese von Proteinen ein, die für die verhornte Epidermis charakteristisch sind. Dazu gehören Involucrin, Loricrin und Cornifin. Außerdem bilden die Zellen die verschiedenen Lipide, die später die Barrierschicht der Haut bilden. Die mitotische Aktivität der Zellen nimmt extrem ab, kann aber unter Umständen wieder stimuliert werden, beispielsweise während der Wundheilung. Im Stratum spinosum sind zudem die Langerhans-Zellen, die Abwehrzellen des lymphatischen Systems, lokalisiert (Abb. 1).

Mit Eintritt der terminalen Differenzierung beim Übergang in das darüber liegende Stratum granulosum, der Körnerschicht, geht die mitotische Aktivität der Zellen endgültig verloren und die Verhornung beginnt. Diese Schicht besteht aus 1-3 Zelllagen, in denen die Zellen eine sehr flache Morphologie aufweisen (Abb. 1). Im nach außen weisenden Bereich des Stratum granulosum laufen rapide Differenzierungsvorgänge, die die Verhornung der Keratinocyten einleiten, ab. Hierzu gehören das Abflachen der Zellen, die Degeneration der Kerne und der Zellorganellen, Dehydrierung, die Ausbildung einer Lipidsubstanz im Interzellularraum sowie die des „cornified envelope“ an der Plasmamembran. Die endgültige Verhornung schließlich macht die Zellen starr und immobil.

Dermis und Epidermis werden durch die Basalmembran, die aus Komponenten der extrazellulären Matrix besteht, voneinander getrennt. In der Epidermis verlaufen keine Blutgefäße. Die Keratinocyten sind auf die Versorgung von Metaboliten durch Diffusion aus der Dermis angewiesen, die gut durchblutet ist. Verschiedene lösliche Wachstumsfaktoren und Cytokine, die für die Proliferation und Differenzierung epidermaler Zellen sowie zur Wundheilung benötigt werden, werden durch dermale Zellen produziert und sezerniert. Andersherum beeinflussen aber auch Keratinocyten durch Produktion von Wachstumsfaktoren Fibroblasten. Abfallprodukte aus der Epidermis werden über die Dermis entsorgt (reviewed in Downing, 1992).

### **1.1.1 Folgen der Hautalterung**

Die Haut ist einer permanenten Regeneration und Erneuerung unterzogen. Diese Prozesse beruhen auf der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der Keratinocyten und

Fibroblasten. Alterungsprozesse können die Regenerationsfähigkeit dieser Zellen negativ beeinflussen.

In der alternden Haut verringern Fibroblasten, die am Auf- und Abbau der verschiedenen Komponenten der ECM beteiligt sind, ihre proliferative Aktivität. Im Alter weist die Dermis dadurch einen Verlust der ECM auf (Varani et al., 2000) und kann ihre Rolle bei der Aufrechterhaltung der komplexen Hautstruktur nicht weiter vollständig erfüllen. Auch in Keratinocyten nimmt die Fähigkeit zur Proliferation ab (Gerstein et al., 1993). Durch die verringerte proliferative Aktivität von Fibroblasten und Keratinocyten wird auch die Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren durch diese Zellen beeinträchtigt (reviewed in Sunderkötter et al., 1997). Die Aktivität von MAP-Kinasen ist zudem reduziert. Dies beeinflusst die Stressantworten der Zellen (Chung et al., 2000) und auch Differenzierungs- und Proliferationsprozesse, die durch MAP-Kinasen kontrolliert werden (Berge et al., 2008; Nielsen et al., 2006). Wundheilungsprozesse sind durch die verringerte Proliferationsfähigkeit der Keratinocyten beeinträchtigt. Dadurch wird die Barrierefunktion der Haut nach Verletzungen verlangsamt wiedererlangt (reviewed in Elias und Ghadially, 2002).

Eine weitere Folge von Alterungsprozessen in der Haut ist die replikative Seneszenz von Keratinocyten und Fibroblasten, die die Anzahl der Zellteilungen limitiert. Die seneszenten Zellen sind ebenfalls für Veränderungen in der Struktur alternder Haut verantwortlich, die auf der Produktion spezieller Enzyme und von Lipofuscin basieren. Der Gehalt an Metalloproteinasen, die zur Degradation der Dermis beitragen, nimmt zu (Varani et al., 2000).

## **1.2 Degradative Systeme in der Zelle**

Alle zellulären Abläufe basieren auf dem Gleichgewicht der Synthese, Degradation und dem Recycling verschiedener Proteine und zellulärer Komponenten. Die Aktivität und Halbwertszeit von Proteinen muss kontrolliert werden. In eukaryotischen Zellen existieren zwei große proteolytische Systeme, die als regulatorische Mechanismen in diesem Zusammenhang dienen: das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) und das lysosomale System (Lecker et al., 2006).

Das proteasomale System dient dem kontrollierten Abbau kurzlebiger intrazellulärer Proteine. Das betrifft zum einen mutierte und posttranslational geschädigte Proteine aus dem Cytosol, dem Nucleus und dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), zum anderen Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus und des Zellwachstums, an Signaltransduktionsprozessen, der Apoptose, der Antigen-Präsentation sowie an Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Lee und Goldberg, 1998). Inhibierung der proteasomalen Aktivität stoppt die Degradation solcher

Proteine und führt zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine, die dann unlösliche, für die Zelle toxische Aggregate ausbilden können.

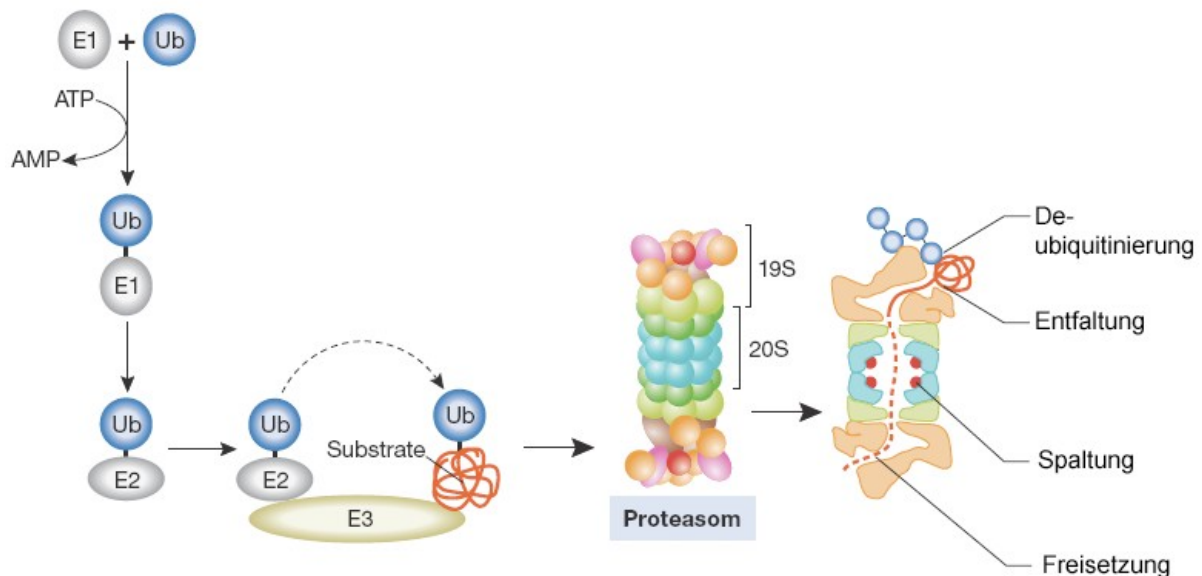
Das Proteasom ist nicht dazu in der Lage, Organellen, Oligomere oder Proteinaggregate zu degradieren, da die Substrate entfaltet werden müssen, um in das Proteasom zu gelangen (reviewed in Rubinsztein et al., 2005). Diese Zellkomponenten werden in den Lysosomen abgebaut, ebenso wie extrazelluläre Proteine, die durch Endocytose und Pinocytose in die Zelle gelangen. Das Lumen der Lysosomen hat ein saures Milieu mit einem pH von 5, das von Protonenpumpen in der Lysosomenmembran aufrechterhalten wird. In diesem Milieu ist die Aktivität der Cathepsine, den lysosomalen Proteasen, optimal. Der Mechanismus, der die zu degradierenden Zellkomponenten den Lysosomen zuführt, wird als Autophagie bezeichnet.

### 1.2.1 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Man findet Proteasomen im Cytoplasma, im Nucleus und in Membranstrukturen. Sie machen etwa 1-2% des gesamten cytosolischen Proteingehalts aus. 1% der Proteasomen befindet sich am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) (reviewed in Kopito, 2000). Der Großteil der Proteine, die über den proteasomalen Weg abgebaut werden, wird durch die kovalente Anbindung mehrerer Ubiquitin-Moleküle markiert. Diese dienen als Erkennungssignal für das 26S-Proteasom, einem großen Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 2100 kDa. Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 8,5 kDa. Die Ubiquitinierung erfolgt über eine Reihe von enzymatischen Schritten (Myung et al., 2001): Ubiquitin wird durch Bindung an das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) unter ATP-Hydrolyse aktiviert, auf ein Mitglied der Familie der Ubiquitin verknüpfenden Enzyme (E2) und anschließend auf eine Substrat-spezifische Ubiquitinligase (E3) übertragen. Das E3 katalysiert die kovalente Bindung des Ubiquitin an einen Lysinrest eines Substrates (Abb. 3). Das Anfügen der Polyubiquitinkette erfolgt durch E4-Enzyme (Ciechanover, 1998).

Das 26S-Proteasom besteht aus dem fassartigen 20S-Proteasom, das an jeder Seite von einem 19S-Komplex flankiert wird (Abb. 2). Das 20S-Proteasom (700 kDa) setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen, die eine zylindrische Struktur aus vier Ringen ausbilden. Die zwei inneren  $\beta$ -Ringe enthalten jeweils die drei proteolytischen  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-Untereinheiten. Die zwei äußeren  $\alpha$ -Ringe des 20S-Proteasoms besitzen keine proteolytische Aktivität. Ihre Funktion besteht darin, die 19S-Regulator-Einheiten zu binden. Diese Einheiten modifizieren die katalytischen Eigenschaften des 20S-Proteasoms. Sie sind aus 18 Untereinheiten zusammengesetzt. An ihrer Basis befinden sich sechs homologe ATPasen, die zu

degradierende Proteine binden, unter Hydrolyse von ATP entfalten und dem 20S-Komplex zuführen.



**Abb. 2:** Ubiquitin (Ub) wird durch Bindung an das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) unter ATP-Hydrolyse aktiviert, auf ein E2-Enzym und anschließend auf eine Ubiquitinligase (E3) übertragen. E3 katalysiert die kovalente Bindung des Ubiquitins an sein Substrat. Das Substrat bindet an den 19S-Komplex, Isopeptidasen zerlegen die Ubiquitinketten, unter Hydrolyse von ATP wird das Substrat entfaltet und dem 20S-Komplex zugeführt. Im Lumen des 20S-Komplexes wird es durch die proteolytischen Untereinheiten in kleine Peptide gespalten. Diese Peptide werden aus dem Proteasom entlassen, im Cytosol durch Endopeptidasen und Aminopeptidasen in einzelne Aminosäuren zerlegt und dem Metabolismus zurückgeführt. Modifiziert nach Kaiser und Fon (2007).

An der äußeren Seite des 19S-Komplexes befinden sich Untereinheiten, die die Polyubiquitin-Ketten binden sowie zwei deubiquitinierende Enzyme (Isopeptidasen). Diese Isopeptidasen zerlegen die Ubiquitinketten. So wird das Ubiquitin der Wiederverwertung bei der Degradation anderer Proteine zugeführt. Sobald das Substrat das Lumen des 20S-Komplexes erreicht hat, wird es durch die sechs proteolytischen Untereinheiten in kleine Peptide einer Größe von 3 bis 25 Aminosäuren gespalten. Diese Peptide werden aus dem Proteasom entlassen und im Cytosol durch Endopeptidasen und Aminopeptidasen in einzelne Aminosäuren zerlegt, die zur Synthese neuer Proteine verwertet werden können (Lecker et al., 2006).

Es ist möglich, die Aktivität der Proteasomen mit natürlichen oder synthetischen Substanzen zu inhibieren. MG132 (Cbz-leu-leu-leucinal) ist ein Beispiel für einen synthetischen Proteasomen-Inhibitor. Dieses Peptidaldehyd ist membrangängig und bindet reversibel an die proteolytisch aktiven Bereiche des 20S-Proteasoms (Lee und Goldberg, 1998).

Lactacystin ist ein natürlicher Proteasomen-Inhibitor, der vom Bakterium *Streptomyces lactacystinaeus* synthetisiert wird und das N-terminale Threonin der  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms irreversibel modifiziert (Myung et al., 2001). Lactacystin ist spezifischer als MG132, welches konzentrationsabhängig auch die proteolytische Aktivität von Calpain und lysosomalen Cystein-Proteasen hemmen kann (Lee und Goldberg, 1998).

### 1.2.1.1 Hitzeschockproteine

Das UPS spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Qualität der Proteine in der Zelle, indem geschädigte und fehlgefaltete Proteine, die aggregieren könnten, durch das Proteasom abgebaut werden. In dieser Funktion wird das UPS von einer Familie von Proteinen, den Hitzeschockproteinen (Hsps), unterstützt. Konstitutiv exprimierte Hsps sind als Chaperone an der Faltung von neu synthetisierten oder geschädigten Proteinen und an der Proteindegradation beteiligt. Unter Stresseinwirkung können Hsps induziert werden und Aggregationen fehlgefalteter Proteine verhindern, Proteinaggregate auflösen und bei der Markierung geschädigter Proteine für die Degradation assistieren. Ist das Proteasom überlastet, inhibiert oder arbeitet es fehlerhaft, spielen Hsps also eine große Rolle beim Schutz der Zelle.

Hsps sind in allen Zellen und Organismen zu finden. Verschiedene Stressbedingungen wie Hitzeschock, Sauerstoffmangel, virale Infektionen, Schwermetalle oder oxidativer Stress und auch die Inhibierung des proteasomalen Systems führen zur Induktion von Hsps (Richter-Landsberg und Goldbaum, 2003). Die Hitzeschockantwort ist einer der grundlegendsten Schutzmechanismen gegen verschiedene Stressbedingungen.

Hitzeschockproteine werden basierend auf ihrem Molekulargewicht in sechs Hauptklassen unterteilt: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und die kleinen Hitzeschockproteine Hsp27,  $\alpha$ A-Crystallin und  $\alpha$ B-Crystallin (Richter-Landsberg und Goldbaum, 2003).

Die Regulation der Expression der Hsp-Gene erfolgt über den Hitzeschockfaktor-1 (HSF-1). Säugetierzellen exprimieren drei Hitzeschockfaktoren (HSF-1, -2 und -4). HSF-2 ist nicht in Stressantworten involviert, spielt aber eine Rolle bei der Differenzierung und Entwicklung der Zellen. HSF-1 ist essentiell für die Expression der Hitzeschockgene in Säugetierzellen und liegt unter normalen Bedingungen als inaktives Monomer konstitutiv phosphoryliert an Serin 230, 303, 307 und 363 im Cytoplasma und im Zellkern vor. Die konstitutive Phosphorylierung an Serin 303, 307 und 363 unterdrückt die Transkriptionsfunktion von HSF-1. Außerdem liegt die inaktive Form des HSF-1 an Hsp90, Hsp70 und weitere Chaperone gebunden vor. Bei Stresseinwirkung auf die Zelle wird diese Interaktion

unterbrochen. HSF-1 wird trimerisiert, hyperphosphoryliert und transloziert in den Zellkern (reviewed in Rattan et al., 2004). Dort bindet es an Hitzeschockelemente und die Hitzeschockgene werden exprimiert. Alle Hitzeschockfaktoren besitzen am N-Terminus eine DNA-Bindedomäne, die essentiell für die Bindung an die Hitzeschockelemente ist. Hydrophobe Regionen nahe der DNA-Bindedomäne sind essentiell für die Ausbildung der Trimere.

### **1.2.2 Autophagie**

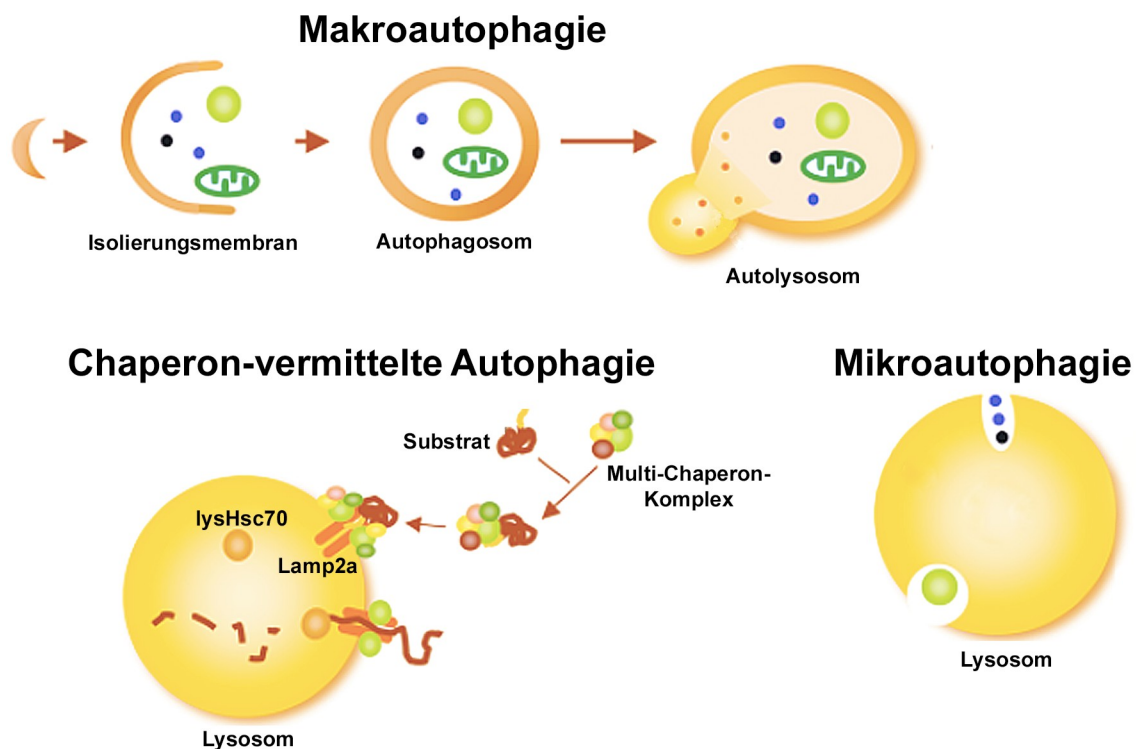
Als Autophagie wird der Transportmechanismus bezeichnet, durch den Zellbestandteile den Lysosomen zur Degradation zugeführt werden. Es existieren verschiedene Typen der Autophagie: Makroautophagie (MA), Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) und Mikroautophagie (Abb. 3). Sie unterscheiden sich durch ihre Substrate, den Mechanismus, über den die Substrate zum Lysosom gelangen und die unterschiedliche Regulierung ihrer Aktivität.

MA ist der am häufigsten studierte und bisher am besten verstandene Typ der Autophagie. Beim Prozess der MA werden cytosolische Proteine und ganze Organellen von einer sich neu bildenden Doppelmembran unter Bildung des Autophagosoms eingeschlossen. Das Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom, in dem die eingeschlossenen Komponenten degradiert werden (Abb. 3).

Die CMA ist verantwortlich für die selektive Degradation cytosolischer Proteine in Lysosomen (Abb. 3). Organellen können nicht über diesen Weg degradiert werden. CMA benötigt keine Vesikelbildung oder großartige Veränderungen der lysosomalen Membran. Stattdessen passiert das Substrat die Membran direkt und wird im Lumen des Lysosoms degradiert. Cytosolische Proteine, die eine KFERQ-Sequenz tragen, werden selektiv den Lysosomen durch CMA zugeführt. Etwa 30% aller cytosolischen Proteine tragen diese Sequenz. Die Sequenz wird von Hsc70 und seinen Co-Chaperonen erkannt, das mit dem Substrat im Cytosol interagiert. Dieser Komplex bindet über den Rezeptor Lamp2a (lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2a) an die lysosomale Membran. Dort wird das Substrat durch den molekularen Chaperonkomplex entfaltet und mit Hilfe des lysosomalen Hsc70 dann in die Lysosomen transportiert und degradiert (Dice, 2007).

Es ist bisher wenig über die Mechanismen und molekularen Komponenten bekannt, die am Prozess der Mikroautophagie beteiligt sind. Bei der Mikroautophagie werden Komponenten aus dem Cytoplasma direkt von der lysosomalen Membran eingeschlossen (Abb. 3). Dieser Teil der Membran wird dann zusammen mit den eingeschlossenen cytoplasmatischen

Bestandteilen in das Lumen der Lysosomen aufgenommen und dort degradiert (Klionsky, 2007).



**Abb. 3: Übersicht über die drei Typen der Autophagie.** Durch Makroautophagie werden cytosolische Proteine und ganze Organellen von einer sich neu bildenden Doppelmembran unter Bildung des Autophagosoms eingeschlossen, das mit dem Lysosom fusioniert (Autolysosom). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie bindet ein Multi-Chaperon-Komplex ein Substrat. Dieser Komplex bindet über den Rezeptor Lamp2a an die lysosomale Membran, wo das Substrat durch den molekularen Chaperon-Komplex entfaltet und mit Hilfe des lysosomalen Hsc70 dann in die Lysosomen transportiert und degradiert wird. Bei der Mikroautophagie werden Komponenten aus dem Cytoplasma direkt von der lysosomalen Membran eingeschlossen. Modifiziert nach Cuervo et al., 2005.

### 1.2.2.1 Der Prozess der Makroautophagie

MA ist in vielen Zellen ein konstitutiver Mechanismus und dient der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Zudem wird ihr eine große Rolle beim Zell-Überleben zugesprochen. Wachstumsfaktoren unterstützen die Aufnahme von Nährstoffen und unterdrücken MA. Entzug von Wachstumsfaktoren bedeutet für die Zelle einen intrazellulären Mangel an Nährstoffen und induziert MA. Auf diesem Wege werden nicht essentielle Proteine und Membranlipide in den Lysosomen degradiert und der Pool an Metaboliten, nämlich freie Fett- und Aminosäuren, die für ATP-Synthese und Biosynthese benötigt werden, wird aufrechterhalten (Rodriguez-Enriquez et al., 2006; Nixon, 2006). MA ist also unter Nährstoffentzug ein Mechanismus, der das Überleben der Zellen durch Aufrechterhaltung des



Metabolismus ermöglicht. Eine Inhibition von MA unter diesen Bedingungen führt zur Apoptose (Boya et al., 2005).

Das basale Niveau der MA wird zudem durch weitere verschiedenste intra- oder extrazelluläre Stimuli verändert. Hierzu gehören Infektionen mit Pathogenen wie Bakterien oder Viren, bestimmte Hormone und Stressoren wie geschädigte Organellen, ER-Stress, oxidativer Stress und Hypoxie.

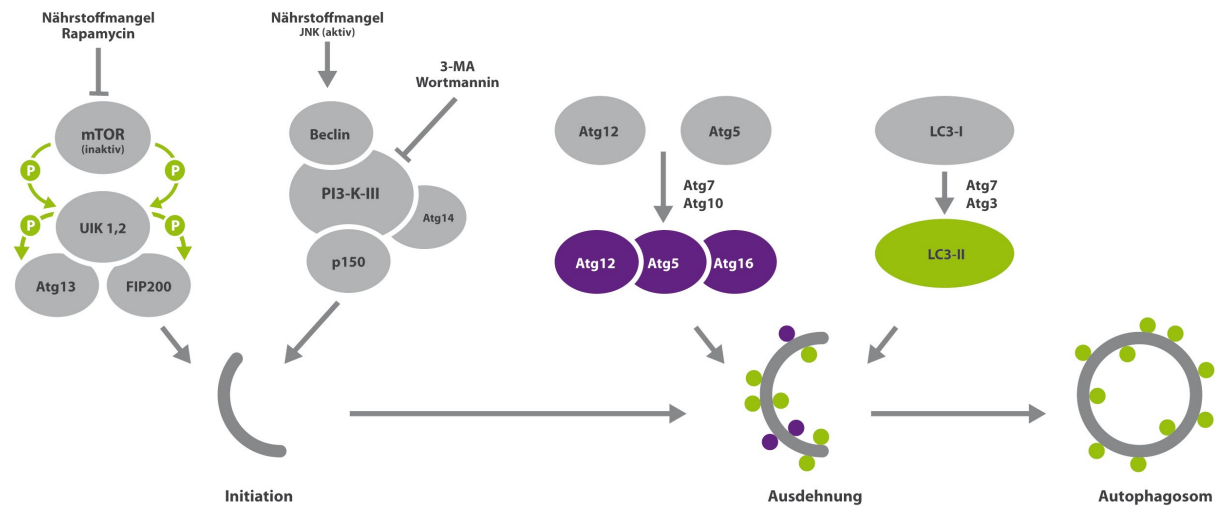
Bei Induktion von MA dehnen sich kleine Membranstücke zu einer Isolierungsmembran aus, die sich vergrößert und eine Region des Cytoplasmas mit darin enthaltenen Zellkomponenten umschließt. Neueste Studien vermuten das ER als Quelle für die Membranstücke (Hamasaki und Yoshimori, 2010).

Die Induktion von MA und die Ausbildung von Autophagosomen werden über ein intrazelluläres Netzwerk reguliert, das noch weitgehend unerforscht ist. Bis dato wurden 31 Gene identifiziert, die an der Ausbildung der MA beteiligt sind. Sie werden Atg-Gene (**autophagy-related genes**) genannt.

Zudem sind verschiedene Proteinkinasen an der Regulation von Autophagie beteiligt (Abb. 4). Die am besten beschriebene ist die mTOR-Kinase. mTOR (mammalian target of rapamycin) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die neben der MA Zellwachstum, Zellzyklus, Nährstoffimport, und Proteinsynthese reguliert. Sie besteht aus den Komplexen mTORC1 und mTORC2, wobei mTORC1 Rapamycin-sensitiv ist. Ist mTORC1 aktiv, findet Zellwachstum und Proteinsynthese statt. Unter diesen Bedingungen wird MA inhibiert. Die Inaktivierung von mTORC1 ist der erste Schritt zur Induktion von MA (reviewed in Pattingre et al., 2008): Downstream von mTOR und mTORC1 befindet sich der Atg1-Komplex, bestehend aus den Atg-Proteinen Ulk1/2, Atg13, FIP200 und Atg101. Ulk1 und 2 sind Serin-Threonin-Kinasen. Inaktivierung von mTORC1 leitet die Bildung von Autophagosomen ein, indem sie zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Atg13 und FIP200 durch Ulk1/2 und zur Translokation des Komplexes zur Isolierungsmembran führt (reviewed in Mehrpour et al., 2010).

Zu den einleitenden Schritten der MA gehört neben der Inhibierung von mTOR und der Aktivierung von Atg13 die Aktivierung der PI3-Kinase der Klasse III (Abb. 4). Diese beruht auf der Bildung eines Komplexes der PI3-Kinase der Klasse III mit seinem Membranadaptor p150, Beclin-1 und Atg14L. Die aktivierte Kinase produziert PI(3)P-reiche Membrandomänen, die als Plattform für die Rekrutierung weiterer Faktoren dienen, die für die Bildung der Autophagosomen essentiell sind (reviewed in Mehrpour et al., 2010).

Wie diese zwei einleitenden Mechanismen gekoppelt sind, ist bisher noch unklar (reviewed in Mehrpour et al., 2010).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der einleitenden Schritte zur Bildung des Autophagosoms.** Die Inaktivierung von mTOR leitet die Bildung von Autophagosomen ein, indem sie zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Atg13 und FIP200 durch Ulk1/2 und zur Translokation des Komplexes zur Isolierungsmembran führt. Zu den einleitenden Schritten der MA gehört neben der Inhibierung von mTOR die Aktivierung der PI3-Kinase der Klasse III. Diese beruht auf der Bildung eines Komplexes der PI3-Kinase der Klasse III mit seinem Membranadaptor p150, Beclin 1 und Atg14L. Die Ausdehnung der Isolierungsmembran wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme reguliert, dem Atg12-System und dem LC3-System.

Die Ausdehnung der Isolierungsmembran wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme reguliert, an denen weitere Atg-Proteine beteiligt sind:

Eines dieser Systeme ist das Atg12-System (Abb. 4). Endogenes Atg12 wird an Atg5 konjugiert. Dies passiert über einen Ubiquitin-ähnlichen Mechanismus. Ein C-terminaler Glycinrest von Atg12 wird von Atg7 (E1-Enzym) aktiviert. Es entsteht ein Atg12-Atg7-Thioester-Zwischenprodukt. Atg12 wird dann auf Atg10 transferiert und ein Atg12-Atg10-Thioester-Zwischenprodukt entsteht. Letztendlich wird das C-terminale Glycin von Atg12 kovalent mit Lysin 130 von Atg5 über eine Isopeptidbindung verbunden (Mizushima et al., 2002).

Das meiste Atg5/Atg12 existiert im Cytosol als etwa 800kDa großer Komplex mit Atg16L (Klionsky et al., 2007). Eine kleine Fraktion des Atg12-Atg5-Atg16L-Komplexes befindet sich während ihrer Ausdehnung an der äußeren Seite der Isolierungsmembran und dissoziiert von der Membran, wenn die Bildung des Autophagosoms abgeschlossen ist. Atg12/Atg5 ist essentiell für die Ausbildung von Autophagosomen (Mizushima et al., 2002).

Das LC3-System ist das zweite Ubiquitin-ähnliche Konjugationssystem, das an der Ausbildung der Isolierungsmembran beteiligt ist (Abb. 5). Gleich nach seiner Synthese wird das C-terminale Ende des LC3-Proteins durch die Protease Atg4 abgespalten. Das entstandene LC3-I trägt einen Glycinrest am C-terminalen Ende. Nach Aktivierung durch Atg7 (E1-Enzym) wird LC3 auf Atg3 (E2-Enzym) transferiert (Mizushima et al., 2002). Durch Atg3 wird LC3-I an Phosphatidylethanolamin konjugiert. So entsteht das membrangebundene LC3-II, das mit Autophagosomen assoziiert ist (Klionsky et al., 2007).

LC3-II ist auf beiden Seiten der Autophagosomenmembran lokalisiert und das einzige Atg-Protein, das mit den vollständigen Autophagosomen assoziiert ist. Wenn Lysosomen mit der äußeren Membran des Autophagosoms verschmelzen (Autolysosom/Autophagolysosom), werden die im Autophagosom eingeschlossenen Bestandteile sowie die innere Membran des Autophagosoms degradiert (Mizushima et al., 2004). LC3-II wird als Marker für MA genutzt und die experimentell detektierte Menge des LC3-II dient als Maß für diesen Prozess.

### **1.2.2.2 Experimentelle Inhibition und Induktion von Makroautophagie**

Um die Bedeutung der MA zu untersuchen, werden verschiedene Substanzen zur Inhibition oder Induktion dieses Mechanismus eingesetzt.

Das Antibiotikum Rapamycin aus *Streptomyces hygroscopicus* ist ein synthetischer Inhibitor der mTOR und induziert somit MA (Abb. 4). Rapamycin bindet direkt an den mTOR Complex1 (mTORC1) (Nixon, 2006; Pattingre et al., 2008).

Um MA zu unterdrücken, werden oftmals Inhibitoren der PI3-Kinasen verwendet. Dazu gehören 3-Methyladenin (3-MA) (Seglen et al., 1982) und Wortmannin, die die PI3-Kinasen der Klasse III inhibieren (Klionsky et al., 2007) (Abb. 4). Ein Einfluss dieser Substanzen auf CMA konnte bisher nicht festgestellt werden (Finn et al., 2005).

### **1.2.3 Cross-Talk zwischen Autophagie und dem UPS**

Lange wurde angenommen, das UPS und das lysosomale System würden unabhängig arbeiten: Autophagie als verantwortlicher Mechanismus zur nicht-selektiven Degradation langlebiger Proteine und Organellen, um die Homöostase der Zelle aufrecht zu erhalten sowie als Mechanismus zum Überleben der Zelle bei Nährstoffmangel. Das UPS wurde als hochselektiver Mechanismus zur Eliminierung einzelner, durch Ubiquitin-Ketten markierter Proteine, die in etliche zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Signaltransduktion und Genexpression involviert sind, angesehen. Inzwischen ist bekannt, dass auch MA selektiv ablaufen kann. Beispiele hierfür sind Xenophagie (Degradation von Pathogenen), Mitophagie

(Degradation von Mitochondrien), Crinophagie (Degradation des Golgi-Apparates), Reticulophagie (Degradation des ER), Heterophagie (Degradation von Endosomen) und Pexophagie (Degradation von Peroxisomen).

Es gibt Untersuchungen, die auf Ubiquitin als molekularen Link zwischen dem UPS und dem lysosomalen System hinweisen. Ein Beispiel ist die selektive Beseitigung von Proteinaggregaten durch MA. p62 (oder SQSTM1) ist ein durch Stress induzierbares Protein, das an der Sequestrierung von polyubiquitinierten Proteinen in Aggregaten beteiligt ist. Es besitzt am C-terminalen Ende eine Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), die Polyubiquitin-Ketten nicht-kovalent bindet. An seinem N-Terminus besitzt das Protein eine PB1-Domäne, die zur Protein-Protein-Interaktion dient. Diese Domäne kann direkt an das Proteasom binden. Somit spielt p62 wahrscheinlich eine Rolle bei der Sortierung ubiquitiniertes Proteine, indem es sie zum Proteasom oder zu Aggregaten leitet. p62 bindet aber auch über eine Sequenz nahe der UBA an LC3 (reviewed in Ding und Yin, 2008). Auf diese Weise wird p62 spezifisch zu den Autophagosomen geleitet und lysosomal abgebaut. Gleichzeitig könnten so an p62 gebundene ubiquitinierte Proteine über den lysosomalen Weg degradiert werden. Als weiterer molekularer Link in diesem Zusammenhang dient wahrscheinlich die Histon-Deacetylase 6 (HDAC6). HDAC6 bindet über seine BUZ-Domäne an polyubiquitinierte Proteine (reviewed in Ding und Yin, 2008). Zudem interagiert HDAC6 direkt mit Dynein. So werden Aggregate zum MTOC transportiert und Aggresomen ausgebildet. p62 führt ubiquitinierte Proteine den Aggregaten zu und HDAC6 dirigiert den Transport zum MTOC. Auch Autophagosomen werden über Mikrotubuli und Dynein zu den Lysosomen am MTOC transportiert. Hier könnten große Aggregate, die über das Proteasom nicht degradiert werden können, dann durch MA abgebaut werden (reviewed in Kraft et al., 2010).

Weitere Beispiele für Proteine, die wie p62 direkt oder indirekt mit Ubiquitin und MA interagieren, sind NBR1 und NDP52 (reviewed in Kraft et al., 2010). NBR1 bindet wie p62 direkt an Ubiquitin und LC3. NDP52 bindet an ubiquitinierte Bakterien und initiiert den Einschluss der Bakterien in Autophagosomen (reviewed in Kraft et al., 2010).

Zusätzliche Hinweise auf eine Verbindung der beiden Degradationssysteme geben Untersuchungen, die zeigen, dass eine Inhibierung des Proteasoms zur Induktion von MA führt (Iwata et al., 2005; Massey et al., 2006; Jänen et al., 2010). In diesem Fall dient MA möglicherweise als Mechanismus, der den Ausfall der proteasomalen Degradation kompensiert.

### **1.2.4 Zelltod durch Autophagie: Cross-Talk zwischen Makroautophagie und Apoptose**

Immer mehr Studien beschreiben, dass neben dem Cross-Talk zwischen dem UPS und der MA auch ein Zusammenspiel zwischen Apoptose und Autophagie existiert. Doch dieser wechselseitige Einfluss der zwei Wege, die zum Zelltod führen, ist noch nicht verstanden.

Apoptose, oder der programmierte Zelltod Typ I, ist die am besten beschriebene Form des programmierten Zelltods. Apoptotische Prozesse sind in die Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Regulation und Funktionen des Immunsystems involviert. Zudem eliminiert Apoptose geschädigte und den Organismus gefährdende Zellen und gewährleistet dabei im Gegensatz zur Nekrose keine Schädigung des benachbarten Gewebes. Die klassischen apoptotischen Merkmale sind der Zusammenbruch des Cytoskeletts, die Chromatin-Kondensation (Pyknose), die Caspase-abhängige Fragmentierung des Zellkerns und das Schrumpfen der Zelle. Letztendlich wird die Zelle in kleine membranumschlossene Strukturen fragmentiert, die apoptotischen Körperchen, die dann durch Makrophagen aus dem Gewebe entfernt werden (reviewed in Lawen, 2003).

Die Einleitung der Apoptose kann über einen intrinsischen (oder mitochondrialen) und einen extrinsischen Weg verlaufen. Der extrinsische Weg wird aktiviert, wenn ein Todesrezeptor der TNFR-Familie in der Zellmembran durch Bindung eines Liganden aktiviert und dann trimerisiert wird. Typische Todesrezeptoren sind Fas und TNF-R. Die Trimerisierung resultiert in einer Bindung und Aktivierung der Caspase-8 durch die Adaptorproteine FADD/TRADD. So bildet sich der Apoptose induzierende Signalkomplex DISC. Von hier aus breiten sich die Todessignale über verschiedene Wege aus: 1. Die Proteolyse der Caspase-8 führt zur Aktivierung von Caspase-3, -6 und -7, die dann weitere Proteinsubstrate wie PARP und Actin spalten. 2. Die Aktivierung von Caspase-8 führt zur Spaltung von Bid, einem Bcl-2-Protein, Translokation von tBid zu den Mitochondrien, wo es mit Bax und Bak agiert und Cytochrom c aus den Mitochondrien entlässt (reviewed in Lawen, 2003). Der intrinsische Weg wird durch verschiedene intrazelluläre Stressoren oder DNA-Schäden stimuliert und aktiviert die pro-apoptotischen BH3-Proteine der Bcl-2-Familie Bax und Bak. Bax und/oder Bak werden in der äußeren Mitochondrienmembran oligomerisiert und formen so Kanäle. Es kommt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP). Dies führt zur Bildung des Apoptosoms, eines Caspase-aktivierenden Komplexes bestehend aus APAF-1, Caspase-9 und Cytochrom c. Caspase-9 initiiert eine Caspase-Kaskade aus Caspase-3, -7 und -6 (reviewed in Lawen, 2003).

Beim Zelltod durch Autophagie oder dem programmierten Zelltod Typ II findet keine Spaltung von Caspasen statt (Kitanaka und Kuchino, 1999). Autophagosomen akkumulieren und Organellen werden degradiert, während das Cytoskelett weitgehend intakt bleibt. Der programmierte Zelltod Typ II unterscheidet sich in seinem Prozess grundlegend von der Apoptose, bei der die Organellen zunächst erhalten bleiben (reviewed in Thorburn, 2008).

Auf einen Zusammenhang zwischen MA und Zelltod stießen erstmals Bursch et al. (1996), die in ihren Versuchen zeigten, dass 3-MA MA sowie den Zelltod in MCF-7-Zellen inhibiert. Das Merkmal der vermehrt auftretenden Autophagosomen ist nicht unbedingt immer ein Anzeichen Autophagie-induzierten Zelltods, sondern kann alternativ ein Zeichen für einen durch Stress induzierten protektiven Mechanismus zum Zellüberleben sein. Im Falle von Nährstoffmangel trägt MA zum Überleben bei. Wird MA hier blockiert, sterben die Zellen durch Apoptose (Boya et al., 2005) und in manchen Zelllinien verhindert die Induktion von MA Apoptose (reviewed in Vicencio et al., 2008). Wie die Mechanismen der protektiven oder zum Zelltod führenden MA auf molekularer Ebene unterschieden werden können, ist bisher nicht klar.

Hinweise auf ein Zusammenspiel von MA und Apoptose bringen folgende Beobachtungen: 1. Autophagie und Apoptose teilen sich Signalwege. 2. Einige apoptotische Stimuli induzieren auch MA. Jia et al. (1997) fanden z. B. heraus, dass in humanen T-Zell-Lymphoblasten  $\text{TNF}\alpha$ , ein Ligand des Todesrezeptors, Autophagie stimuliert. 3. Die Inhibition des einen Weges kann zur Induktion des anderen führen. Wird beispielsweise Apoptose inhibiert, kann Autophagie als Aushilfsmechanismus zum Zelltod führen. Dies zeigten Xue et al. (2001) in HeLa-Zellen und SCG-Neuronen. Untersuchungen an  $\text{Bak}^-/\text{Bax}^-$  MEFs, die keine Apoptose einleiten können, zeigten, dass in diesen Zellen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien der Zelltod anstelle von Apoptose durch Autophagie ausgelöst wird. Knockdown von Beclin-1 oder Atg5 verminderten diesen eintretenden Zelltod (Shimizu et al., 2004).

Wie kommt es zu diesen Überschneidungen der beiden Typen des programmierten Zelltodes? Hierzu existieren verschiedene Untersuchungen:

Beclin 1 ist essentiell für die Ausbildung von Autophagosomen, indem es einen Komplex mit der PI3-Kinase der Klasse III und weiteren Proteinen bildet (siehe 1.2.2.1). Es interagiert aber auch mit den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (Bad, BNIP3 und BNIP3L) (Liang et al., 1998). Die Bindung dieser Proteine an Beclin-1 erfolgt über die BH3-Domäne

von Beclin-1. Durch die Bindung der Bcl-2-Proteine an Beclin 1 wird MA inhibiert (Pattingre et al., 2005). Die Zerstörung der Bindung zwischen Bcl-2 und Beclin-1 durch die Phosphorylierung von Bcl-2 durch die JNK induziert hingegen MA (reviewed in Thorburn, 2008 und Fimia and Piacentini, 2010). Auch eine Down-regulation von Bcl-2 in HL60-Zellen stimuliert MA (Saeki et al., 2000). Andersherum zeigten Xue et al. (2001) in SCG-Neuronen eine Inhibition von MA nach Überexpression von Bcl-2. Die Proteine der Bcl-2-Familie regulieren also nicht nur Apoptose, sondern auch den Zelltod durch Autophagie.

Eine weitere molekulare Verbindung zwischen Autophagie und Apoptose läuft über FADD und Atg5, das ebenso wie Beclin-1 essentiell für die Ausbildung von Autophagosomen ist (siehe 1.2.2.1). Atg5 kann aber auch Apoptose regulieren. Es ist bekannt, dass die Bindung von FADD an den Todesrezeptor den extrinsischen Weg der Apoptose auslöst. FADD kann aber auch in den Zelltod durch Autophagie involviert sein. Pyo et al. (2005) zeigten in HeLa-, MCF-7- und Hep3B-Zellen, dass IFN $\gamma$  zum Zelltod durch MA führt. Atg5 ist hierfür essentiell und interagiert in diesem Zusammenhang mit der Todesdomäne von FADD. Eine Aktivierung von Caspase-8 wurde in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen. Atg5 spielt also zum einen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Autophagosomen, aber auch beim Zelltod durch Autophagie. Beide Mechanismen teilen sich Atg5 als gemeinsamen Link.

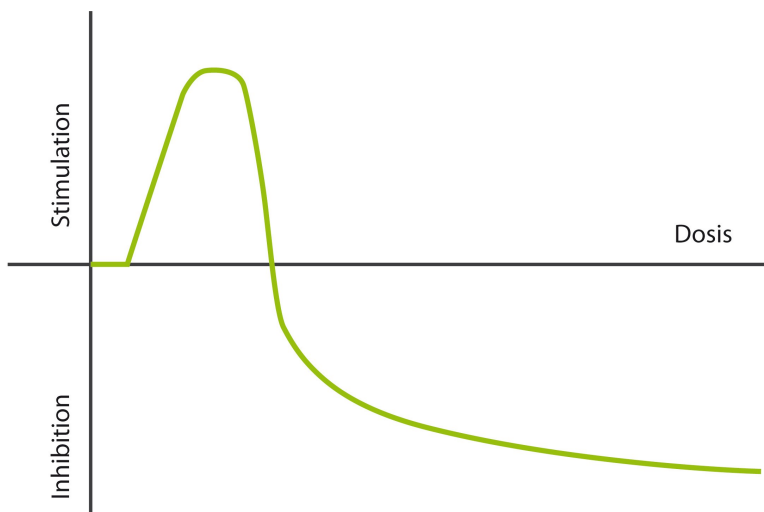
Atg5 kann aber auch in die Inhibition von Apoptose involviert sein. Ob Atg5 Apoptose induziert oder inhibiert, hängt vom Stimulus ab. So leiten embryonale Fibroblasten aus Mäusen mit einem Atg5-Knock-Out den extrinsischen Weg der Apoptose schneller ein als die Wildtyp-Zellen (reviewed in Fimia and Piacentini, 2010). Dieselben Zellen weisen andererseits eine höhere Resistenz gegenüber UV, Menadion und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf (reviewed in Fimia and Piacentini, 2010).

Einen weiteren Zusammenhang zwischen Apoptose und Autophagie stellen Mitochondrien dar. Elmore et al. zeigten 2001, dass in primären Hepatocyten depolarisierte Mitochondrien selektiv durch MA degradiert werden. Deshalb wurde angenommen, dass MA vor Apoptose schützt, indem sie geschädigte Mitochondrien eliminiert und so eine Freisetzung von proapoptotischen Faktoren verhindert. In der Hefe ist das Protein Uth1p, das in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist, in diesen selektiven Prozess involviert (Kissová et al., 2004).

### 1.3 Hormetische Einflüsse auf Alterungsprozesse

Die Haut ist direkt verschiedensten schädigenden äußeren Einflüssen ausgesetzt. Zudem beeinflussen Alterungsprozesse, die u. a. die Aktivität der degradativen Systeme abschwächen, ihre Schutzfunktion. Es wird diskutiert, dass den so entstehenden Schädigungen in der Haut durch hormetische Effekte entgegengewirkt werden kann und so auch Alterungsprozesse verlangsamt werden.

Unter Hormesis versteht man den biologischen Effekt einer positiven Wirkung in der Zelle oder im Organismus, den ein Toxin gering dosiert hervorruft. In hohen Konzentrationen bewirkt dies in der Regel einen gegenteiligen, eher toxischen Effekt. Es kommt bei geringen Dosen also zu einer Stimulation von protektiven zellulären Mechanismen und bei hohen Dosen zu toxischen Effekten, was zu einer U-förmigen Dosis-Wirkungs-Kurve führt (Abb. 5). Man kann von einer Art Eustress sprechen. Es wird angenommen, dass hormetische Effekte auf einer Anregung der Reparaturmechanismen in Zellen beruhen.



**Abb. 5: Darstellung einer durch hormetische Effekte hervorgerufene Dosis-Wirkungs-Kurve.** Niedrige Konzentrationen eines Toxins rufen die gegenteilige Reaktion einer hohen Dosis hervor.

Stimulation von hormetischen Prozessen kann z. B. Alterungsprozessen über ein Ankurbeln der proteinabbauenden Systeme entgegenwirken. So ist beispielsweise bekannt, dass die Aktivität des UPS in alternden Zellen und Organismen abnimmt (Dasuri et al., 2009). Dies ist auch in der Haut der Fall (Petropoulos et al., 2000; Bulteau et al., 2000). Auch eine altersbedingte Abnahme von Autophagie wird diskutiert (Cavallini et al., 2007; Cuervo und Dice, 2000; Donati et al., 2001). Um einer nachlassenden Aktivität der degradativen Systeme in der alternden Haut vorzubeugen, könnten diese also beispielsweise durch hormetische Effekte stimuliert werden.



Eine Reihe von Substanzen weisen in niedrigen Dosierungen hormetische Effekte auf. Dazu gehören Schwermetalle, Ethanol, Aldehyde, Chloroform, Antibiotika oder ionisierende Strahlung (reviewed in Rattan et al., 2005). Aber auch durch Hitzeeinwirkung können hormetische Effekte erzielt werden. Es wurde gezeigt, dass ein wiederholter milder Hitzestress in Fibroblasten die Synthese von Hsps steigert (Fonager et al., 2002), die altersbedingte Akkumulation von oxidativ veränderten, glykosylierten und carbonylierten Proteinen und die Akkumulation von Lipofuscin reduziert (Verbeke et al., 2001; Nielsen et al., 2006), sowie die proteasomale Aktivität stimuliert (Beedholm et al., 2004). Zudem weisen viele Studien hormetische Effekte für Proteasomen-Inhibitoren nach. Die Behandlung von neocorticalen Neuronen mit sehr geringen Dosen des Proteasomen-Inhibitors MG132 führte zu einer gesteigerten proteasomalen Aktivität und reduzierte den Zelltod nach anschließendem oxidativen Stress (Lee et al., 2004). Auch in humanen Fibroblasten konnte eine gesteigerte Aktivität der Proteasomen nach Behandlung mit geringen Dosen MG132 beobachtet werden (Kraft et al., 2006). Aufgrund dieser Ergebnisse werden Proteasomen-Inhibitoren in pharmakologischen Dosen als Mittel zur Vorbeugung oder Behandlung von Krankheiten, bei denen beispielsweise oxidativer Stress eine Rolle spielt, sowie zur Verzögerung von Alterungsprozessen diskutiert.

#### **1.4 Posttranslationale Modifikationen durch SUMO**

Posttranslationale Modifikationen durch Ubiquitinierung regulieren verschiedene zelluläre Prozesse. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Degradation von Proteinen über das UPS. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen können aber auch durch SUMOylierung stattfinden. Durch den hoch dynamischen und reversiblen Prozess der SUMOylierung kann die Aktivität, die intrazelluläre Lokalisation und die Stabilität eines Zielproteins kontrolliert werden.

Der Begriff SUMO leitet sich von **s**mall **u**biquitin-related **m**odifier ab. SUMO ist ein 10-11 kDa schweres Protein und gehört neben Ubiquitin, NEDD8, ISG15, AUT17, APG12, HUB1, FAT10, URM1, MNSF und Ufm1 zu den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (Rosas-Acosta et al., 2005). SUMO und Ubiquitin sind entfernt verwandt (20% Übereinstimmung). In Vertebraten werden drei SUMO-Gene exprimiert: SUMO-1 (auch als Smt3c, PIC1, GMP1, Sentrin oder Ubl1 bezeichnet) ist aus 101 Aminosäuren zusammengesetzt. Neben SUMO-1 werden noch SUMO-2 (Smt3a, Sentrin3) und SUMO-3 (Smt3b, Sentrin2) synthetisiert. SUMO-2 und -3 unterscheiden sich in nur drei N-terminalen Aminosäureresten und sind zu 95% identisch. Sie bilden zusammen eine Unterfamilie (SUMO-2/-3). SUMO-2 ist zu 48% identisch zu SUMO-

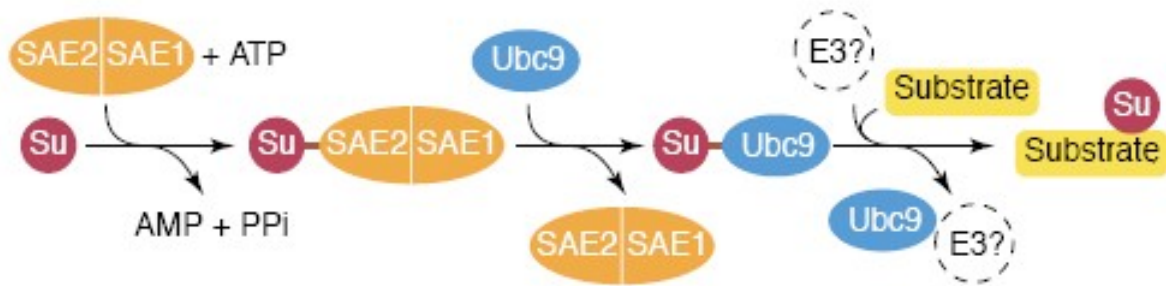
1, SUMO-3 zu 46%. Ein viertes Mitglied der SUMO-Familie (SUMO-4) wird in der Niere exprimiert (Bohren et al., 2004).

### 1.4.1 SUMOylierung von Proteinen

Die SUMOylierung von Proteinen ist mechanistisch der Ubiquitinierung gleich, es sind aber andere Enzyme beteiligt (Abb. 6). SUMO wird als inaktives Molekül synthetisiert, das durch eine SUMO-Protease gespalten werden muss, um ein Diglycin-Motiv freizulegen, das für die Konjugation erforderlich ist. Das SUMO-aktivierende Enzym (E1) ist ein Heterodimer bestehend aus SAE1- und SAE2-Untereinheiten. SAE1/SAE2 katalysiert die Adenylierung von SUMO, indem die C-terminale Carboxyl-Gruppe des SUMO kovalent an AMP gebunden wird. Wird diese Verbindung gebrochen, wird die C-terminale Carboxyl-Gruppe des SUMO über eine Thioesterbindung an die Sulphydryl-Gruppe eines Cystein-Restes (C173) von SAE2 gebunden. Im zweiten Schritt wird SUMO von SAE2 auf Cystein 93 von Ubc9, dem SUMO-konjugierenden Enzym (E2), übertragen. Von hier kann SUMO direkt mit Hilfe von SUMO-Ligasen auf sein Substrat-Protein übertragen werden. Dabei wird eine Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxyl-Gruppe des SUMO und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Substratproteins katalysiert. Mit Ubc9 existiert nur ein einziges SUMO-spezifisches E2-Enzym, wohingegen etwa 40 Ubiquitin-spezifische E2-Enzyme existieren. Die Übertragung von SUMO auf sein Zielprotein kann noch über einen zweiten Weg erfolgen, bei dem eine E3-Ligase SUMO an sein Substrat konjugiert. Obwohl Ubc9 SUMO spezifisch auf seine Substrate übertragen kann, existieren einige E3-Ligasen, die die SUMOylierung von Proteinen noch verstärken können. Zu den E3-Ligasen gehören RanBP2, die PIAS-Proteine und Pc2 (reviewed in Gareau und Lima, 2010).

Viele Substrate von SUMO besitzen eine Sequenz, an der ihre Modifikation durch SUMOylierung stattfindet. Hier findet die Interaktion zwischen Ubc9 und dem Substrat statt. Diese Sequenz wird mit  $\Psi Kx E/D$  bezeichnet.  $\Psi$  stellt eine hydrophobe Aminosäure dar (L, I, V, F) und interagiert direkt mit Ubc9, x steht für eine beliebige Aminosäure und K ist das Ziel-Lysin für die kovalente Bindung an SUMO.

Weitere Bindestellen für SUMO sind u. a. PDSMs (phosphorylation-dependent SUMO motifs) und NDSMs (negatively charged amino acid-dependent SUMO motifs). PDSMs beschreiben eine Bindestelle, die direkt neben einer Phosphorylierungsstelle lokalisiert ist ( $\Psi Kx E/DXXSP$ ). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle verstärkt die SUMOylierung des Proteins. NDSMs weisen C-terminal der SUMO-Konsensussequenz negative Reste auf ( $\Psi Kx E/DXXEEEE$ ) (reviewed in Gareau und Lima, 2010).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der SUMOylierung von Proteinen.** SAE1/SAE2 ist das SUMO-aktivierende Enzym. SUMO wird von SAE2 auf Ubc9, dem SUMO-konjugierenden Enzym, übertragen. Von hier kann SUMO direkt mit Hilfe von SUMO-Ligasen auf sein Substrat-Protein übertragen werden. Die Übertragung von SUMO auf sein Zielprotein kann aber noch über einen zweiten Weg erfolgen, bei dem eine E3-Ligase SUMO an sein Substrat konjugiert. Modifiziert nach Hay (2001).

SUMOylierung ist eine reversible Modifikation. Zu den Proteasen, die eine SUMOylierung von Proteinen rückgängig machen können, gehören die Ubl-spezifischen Proteasen in der Hefe und die humanen Sentrin-spezifischen Proteasen (Ulp1 und SENPs). Diese Proteasen haben eine C-terminale Sequenz aus ca. 200 Aminosäuren gemeinsam, die die katalytische Domäne enthält (Hay, 2001).

## 1.4.2 Funktionen von SUMO

Viele Substrate von SUMO sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch SUMOylierung reguliert wird. Andere Substrate von SUMO sind in die Chromatin-Organisation, DNA-Reparatur, Transport zum Kern, Signaltransduktionswege und in den RNA-Metabolismus involviert.

SUMO wurde erstmals kovalent an das GTPase-aktivierende Protein RanGAP1 gebunden gefunden (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). RanGAP1 verstärkt die GTP-Hydrolyse an Ran, einem GTP-bindenden Protein aus der Ras-Familie, das für den Transport zwischen Nucleus und Cytoplasma erforderlich ist. Die Modifikation von RanGAP1 geschieht durch SUMO-1. SUMO-2/-3 spielt keine Rolle (Saitoh and Hinchey, 2000).

Ein Beispiel für die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren ist das Tumorsuppressorprotein p53. SUMOylierung von p53 steigert dessen transkriptionale Aktivität (Hay, 2001).

Rosas-Acosta et al. (2005) konnten eine SUMOylierung der Cytoskelettbestandteile  $\alpha$ -Tubulin und Actin in SUMO-1 und -3-überexprimierenden Nierenzellen nachweisen. SUMO könnte an der zellulären Architektur und intrazellulären Transportprozessen beteiligt sein

sowie an der Organisation des Zellzyklus. Van Niekerk et al. (2007) konnten zeigen, dass eine SUMOylierung des RNA-bindenden Proteins La zu dessen Interaktion mit dem Motorprotein Dynein führt und für den Transport von La entlang der Mikrotubuli erforderlich ist (Flight, 2007).

HSF-1 ist ein weiteres Zielprotein von SUMO-1. Durch Hitzestress wird HSF-1 SUMOyliert. Diese SUMOylierung aktiviert die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA (Hong et al., 2001). HSF1 enthält drei SUMOylierungs-Sequenzen ( $\Psi$ KxE) im Bereich der Lysine 91, 126 und 298. Durch Stress wird HSF-1 an Ser 303 phosphoryliert und an Lysin 298 SUMOyliert (Hietakangas et al., 2003). Diese Modifizierung reguliert wahrscheinlich die Bindung dieses Transkriptionsfaktors an die DNA, indem es die Trimerisierung des Proteins induziert (Hong et al., 2001).

Die Anzahl neu entdeckter weiterer Substrate von SUMO und damit auch die Erforschung der Bedeutung dieses Proteins in verschiedenen zellulären Prozessen steigt stetig. Dorval und Fraser (2006) konnten in vitro eine kovalente Bindung von SUMO-1 an Tau und  $\alpha$ -Synuclein und eine schwache Modifikation der zwei Proteine durch SUMO-2 und SUMO-3 detektieren, zwei Proteine, die eine große Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson spielen.

### **1.4.3 Das Ubiquitin-Proteasomen-System und SUMO**

Ubiquitin und SUMO unterscheiden sich in ihrer Struktur und ihren Sequenzen stark. Auf diesen Unterschieden beruhen wahrscheinlich die unterschiedlichen Funktionen beider Proteine sowie auf den unterschiedlichen Enzym- und Substratpartnern. Ubiquitin ist bekannt für die Anheftung von Ubiquitin-Ketten an Zielproteine, die in den meisten Fällen zu deren proteasomaler Degradation führt. SUMOylierung hingegen führt in vielen Fällen zur Stabilisierung von Zielproteinen und wurde aus diesem Grund lange als Antagonist zu Ubiquitin angesehen. SUMO und Ubiquitin können an die gleichen Lysinreste ihrer Zielproteine binden und darum konkurrieren. Beispielsweise befindet sich NF- $\kappa$ B in unstimulierten Zellen an seinen Inhibitor I- $\kappa$ B $\alpha$  gebunden. Durch Ubiquitinierung nach Stimulation der Zellen und anschließendem proteasomalen Abbau von I- $\kappa$ B $\alpha$  wird NF- $\kappa$ B aktiviert, wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription unterschiedlicher Gene. Eine SUMOylierung von I- $\kappa$ B $\alpha$  hingegen führt zu dessen Stabilisierung und verhindert seine Degradation und somit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Desterro et al., 1998). Im Falle vom Protein Huntingtin stabilisiert SUMO ebenfalls das Protein und unterstützt die

Neurodegeneration (Steffan et al., 2004). In diesen Beispielen hemmen SUMO und Ubiquitin sich kompetitiv.

SUMO und Ubiquitin können aber auch zusammenarbeiten. Die Untereinheit des I- $\kappa$ B-Komplexes NEMO wird erst SUMOyliert und phosphoryliert und anschließend ubiquitiniert. Erst in diesem Stadium ist NEMO aktiviert und kann NF- $\kappa$ B aktivieren (Huang et al., 2003).

Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass SUMO mit dem UPS interagiert. So scheint SUMOylierung eine Rolle bei der Degradation der DNA-Topoisomerase II $\beta$  zu spielen (Isik et al., 2003). Rosas-Acosta et al. (2005) beobachteten eine vermehrte SUMOylierung zellulärer Proteine nach Behandlung ihrer Zellen mit MG132. Und Uzunova et al. (2007) konnten in humanen Zellen sowie in Hefezellen zeigen, dass nach proteasomaler Inhibition Proteine akkumulieren, an die Ubiquitin und SUMO zugleich konjugiert sind. Schimmel et al. (2008) fanden Ubiquitin und SUMO-2 in aufgereinigten Zellfraktionen. Nach Behandlung mit MG132 konnte eine Akkumulation ubiquitinerter und an SUMO-2/3-gebundener Proteine beobachtet werden. Bailey und O'Hare (2005) zeigten, dass nach proteasomaler Inhibition durch MG132 in Hep2-Zellen die Anzahl der PML NBs (promyelocytic leukemia protein nuclear bodies) stieg, SUMO-1 konjugierte vermehrt an Proteine und war in den PML NBs lokalisiert. Diese Studien weisen auf einen Signalweg hin, durch den SUMOylierte Proteine proteasomal abgebaut werden. Matafora et al. (2009) vermuten, dass SUMOylierung von Proteinen in Koordination mit dem UPS stattfindet und die Aufrechterhaltung der nucleären Integrität reguliert. Nach proteasomaler Inhibition in HeLa-Zellen nahm die Menge SUMOylierter Proteine im Nucleus, die dort in nucleären Strukturen akkumulierten, zu. Die Forscher identifizierten 193 Substrate von SUMO-1, von denen viele zugleich ubiquitiniert vorlagen und die meist nucleären Proteinfamilien angehören.

## 2 Zielsetzung

Die Vitalität und Regenerationsfähigkeit von Fibroblasten und Keratinocyten bilden die Grundlage für die Aufrechterhaltung der Hautfunktionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Vitalität und Regeneration der Zellen durch hormetische Effekte stimuliert werden können. Unter Hormesis versteht man den biologischen Effekt einer positiven Wirkung in der Zelle oder im Organismus, den ein Toxin gering dosiert hervorruft (Rattan et al., 2004). Dabei werden wahrscheinlich zelluläre Abwehr- und Reparaturmechanismen stimuliert.

Es sollten speziell hormetische Effekte durch Modulation der degradativen Systeme und der Hitzeschockantwort in primären humanen Fibroblasten und Keratinocyten erzielt werden. Diese Prozesse nehmen altersbedingt ab.

Des Weiteren sollten die molekularen Mechanismen, die den hormetischen Effekten unterliegen, charakterisiert werden. Hormetisch bedingte Veränderungen in den Zellen wie eine veränderte Genexpression, apoptotische Prozesse, proteasomale und lysosomale Aktivität, Aufrechterhaltung des Cytoskeletts und posttranslationale Veränderungen von Proteinen sollten charakterisiert werden. Im Bereich der posttranslationalen Veränderungen sollte die Rolle der SUMOylierung von Proteinen in Fibroblasten und Keratinocyten untersucht werden.

Unterschiede oder Ähnlichkeiten zwischen den Stressantworten von Fibroblasten und Keratinocyten sollten analysiert werden, um die an den Primärkulturen etablierten hormetischen Level in der Zukunft an 3D-Hautmodellen testen zu können.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, eine neue experimentelle Basis für die Beiersdorf AG zur Entwicklung neuer Hautpflegeprodukte mit Reparatur- und Anti-Aging-Effekten, die auf hormetischen Effekten basieren, zu schaffen.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte, Materialien und Chemikalien für Zellkulturarbeiten und Hautmodelle

DMEM	Gibco, #52100
DMSO	Roth
FCS	PAA, #A15-101
Glutamax	Invitrogen, #35050-038 100% Stammlösung
Inkubator	Heraeus
Isopropanol	VWR
Kamera	Kappa CF 8/4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kryoröhrchen	Nunc
Kulturmedium für Fibroblasten	DMEM + NaHCO <sub>3</sub> [3,7 g/l] + Penicillin [50 µg/ml] + Streptomycin [50 U/ml] + Glutamax [2 mM] + FCS [10%]
Kulturmedium für Hautmodelle	Phenion ALI-Medium
Kulturmedium für Keratinocyten	KGM-2 (Clonetics #CC-3158) + KBM-2 Single Quots (Clonetics #CC-4152) + 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
Lactacystin	Calbiochem, #426100 Stammlösung: 10mM in DMSO
3-Methyladenin	Sigma, # M9281 Stammlösung: 125 mM in Bidest
MG132	Calbiochem, #474790 Stammlösung: 10 mM in DMSO
Mikroskop	Olympus iX 70-88F mit Hoffman Modulations-Kontrast, Model EP40
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
Neubauer-Zählkammer	American optical
PBS	NaCl [137 mM], KCl [2,7 mM], KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1,47 mM], Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [8,4 mM], pH 7,4
Penicillin/Streptomycin	PAA, #P11-010
PLL	Sigma, #P-2636 Stammlösung: 1 mg/ml in A. bidest; Gebrauchslösung: 50 µg/ml in A. bidest, autoklaviert
Rapamycin	Santa Cruz Biotechnology, #sc-3504 Stammlösung: 10 mM in DMSO
Software	Soft Imaging System SIS AnalySIS® 2.1
Sterilbank	Heraeus
Trypsin/EDTA	PAA, #L11-003 Stammlösung: 0,5% Trypsin; 0,2% EDTA, Gebrauchslösung: 0,05% Trypsin; 0,02% EDTA in A. bidest
Vakuumpumpe	Vakumat 100, Bachofer
Wärmebad	GFL 1083
Wortmannin	Sigma, # W1628

Zellkulturplastik	Stammlösung: 10 mM in DMSO
Zentrifuge	Nunc
	Heraeus Megafuge 1.0 R

### 3.2 Geräte, Materialien und Chemikalien für SDS-PAGE

Acrylamid	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA)	Acrylamid [30% w/v], N,N'-Methylenbisacrylamid (0,8% w/v), filtrieren
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva [10% w/v in A. bidest]
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Bromphenolblau	Merck
Cellulose-Acetate Folie	Sartorius AG, # 11200-78-150K
Complete Mini	Roche, # 111836153001 (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)
DMSO	Roth
EDTA	Sigma
Entfärber	Methanol/50%/Essigsäure (9:1)
Einmal-Plastikküvetten	Ratiolab
Elektrophoresesystem	BioRad, MiniProtean
Gelkammer	BioRad
Glasscheiben	BioRad
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
Kämme	BioRad
Laufpuffer	Glycin [12,5 mM], Tris [2,5 mM], SDS [0,1%]
Lysispuffer	Tris [100 mM], EDTA [1 mM], MgSO <sub>4</sub> [0,5 mM]
Molekulargewicht-Standard	NaF [2 mM], Complete Mini
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung	Sigma, # 15H-9418
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	1 M Gebrauchslösung
Neuhoff-Färbelösung	Serva
	Merck
	0.5% Amido Schwarz 10B in
	Methanol/50%/Esigsäure (9:1)
Netzgerät	BioRad, PowerPac Basic™
N,N'-Methylenbisacrylamid	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
PBS	(siehe 3.1.)
Photometer	BioRad, SmartSpec™ 3000
Probenpuffer (1x)	Glycerin [10%], $\beta$ -Mercaptoethanol [0,1%], SDS [2%], Tris [0,5 M], EDTA [125 mM], Bromphenolblau [0,01%]
Probenpuffer (5x)	Glycerin [50%], $\beta$ -Mercaptoethanol [0,5%], SDS [10%], Tris [625 mM], EDTA [5 mM], Bromphenolblau [0,05%]
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Plastibrand
Remazol Blue R	Sigma, #R8001
	10 mg/ml in 10% SDS-Lösung
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
Schüttler	IKA, MTS 4



SDS	Serva
Taumler	Heidolph
Tischzentrifuge	Beckman
Trenngelpuffer	0,5 M Tris/Cl; pH 6,8
Tris	Roth
Vortex	Janke & Kunkel, VF2
Zellschaber	Sarstedt

### 3.3 Geräte, Materialien und Chemikalien für Western Blot

ECL-Detektionskit	Amersham; Pierce
Entwickler	Kodak, D-19
Filmpapier	Pierce, CL-XPosure™ Film, Clear Blue X-Ray Film
Filterpapier	Whatman 3MM Chr
Fixierer	Tetenal, Superfix Plus
Kühleinheit	BioRad, Bio-Ice
Magnetrührer	IKA-Combimag REO
Milchpulver	Nestlé
NaN <sub>3</sub>	Merck
Netzgerät	Gebrauchslösung: 10% in A. bidest
Nitrocellulose (NC)-Membran	BioRad, PowerPac Basic™
Ponceau S	VWR, Protran® BA83, 0,2 µm
Ponceau-Färbelösung	Sigma
PVDF-Membran	Ponceau S [0,2% in 3%iger TCA]
Röntgenplatte	BioRad, #162-0177
Schaumstoff-Schwämme	
Stoppbad	Wasser
TBS	Tris [10 mM], NaCl [150 mM]; pH 7,3
TBST	TBS + 0,1% Tween
Tesa®-Film	Beiersdorf
Transferkammer	BioRad, MiniTrans-Blot
Transferpuffer	Tris [25 mM], Glycin [192 mM], Methanol [20%]; pH 8,1-8,4
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tween	Serva, Tween®20, pure

### 3.3.1 Antikörper für den immunocytochemischen Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran

**Tab. 1:** Verwendete primäre Antikörper für den immunochemischen Nachweis von Proteinen auf der NC- oder PVDF-Membran.

Antikörper	Organismus	Erkennt	Verdünnung in 5% Milchpulver in TBS	Herkunft
$\alpha$ -Tubulin	mouse	$\alpha$ -Tubulin	1:1000	Sigma T9026
$\alpha$ B-Crystallin	mouse	$\alpha$ B-Crystallin	1:1000	Stressgen SPA-222
Hsp27	mouse	Hsp27	1:1000	Stressgen SPA-800
Ubiquitin	mouse	Ubiquitin	1:1000	Stressgen SPA-203
HSF-1-pSer326	rabbit	aktivierten HSF-1 (phosphoryliert an Serin 326)	1:10.000	Epitomics 2092-1
Hsp40	rabbit	Hsp40	1:1000	Stressgen SPA-400
Hsp70	mouse	induziertes Hsp70	1:1000	Stressgen SPA-810
Hsp90	mouse	Hsp90	1:500	Stressgen SPA-830
LC-3	mouse	LC3-I LC3-II	1:250	nanoTOOLS 0231-100
SUMO-1	rabbit	SUMO-1	1:1000	Cell Signaling 4930

### 3.4 Geräte, Materialien und Chemikalien für Immunocytochemie

Blockpuffer	PBS + 10% FCS
BSA	Roth
Coverslips	Fisherbrand, #12-545-82 12CIR-1D (autoklaviert)
Einbettungsmedium	Vector Laboratories, Burlingame, USA, H-1200) Vectashield Mounting medium mit DAPI
FCS	siehe 3.1
Kamera	Zeiss Axio Cam
Kimwipes	Kimberly-Clark
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica TCS SL
Kryotom	Leica, Jung Frigocut 2800E
Mikroskop	Zeiss Axiophot
Mowiol	Sigma, #81381
Nagellack	Rimmel
NaOH	Scharlau
Objektträger	Menzel
Parafilm	American National Can <sup>TM</sup>
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën (3% in PBS, pH 7,3)

PBS	siehe 3.1
Phalloidin-TRITC	Sigma, # P1951 Stammlösung: 0,5 mg/ml in Methanol Gebrauchslösung: 50 µg/ml in PBS
Software	Zeiss, Axio Vision 3.3
TissueTek	Sakura Finetek, #4583
Triton X-100	Serva Stammlösung: 10% in Aqua bidest Gebrauchslösung: 0,1% Triton X-100 in PBS

### 3.4.1 Antikörper für die Immuncytochemie

**Tab. 2:** Verwendete primäre Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz.

Antikörper	Organismus	Erkennt	Verdünnung in PBS	Herkunft
Vimentin	mouse	Vimentin	1:50	Sigma V5255
α-Tubulin	mouse	α-Tubulin	1:200	Sigma T9026
Caspase 3	rabbit	aktivierte Caspase-3	1:100	PromoKine PK-AB577-3015
SUMO-1	rabbit	SUMO-1	1:100	Cell Signaling 4930
FK2	mouse	ubiquitinierte Proteine	1:100	Stressgen SPA-205
LC3	rabbit	LC3-I und -II	1:100	abcam ab48394-100

**Tab. 3:** Verwendete sekundäre Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz.

Antikörper	Verdünnung in PBS	Herkunft
TexasRed anti-mouse	1:100	Jackson ImmunoResearch #715-075-151
TexasRed anti-rabbit	1:100	Jackson ImmunoResearch #711-075-152
FITC anti-mouse	1:100	Jackson ImmunoResearch #715-095-151
FITC anti-rabbit	1:100	Jackson ImmunoResearch #711-095-152

## 3.5 Geräte, Materialien und Chemikalien für Molekularbiologie

### 3.5.1 Isolierung von RNA aus Fibroblasten und Keratinocyten

RNasefreies Wasser	Eppendorf
RNeasy Minikit	Qiagen, #74106
Spektralphotometer	Peqlab (NanoDrop®-1000)

### 3.5.2 RT-PCR

dNTPs	Roth, #K039.1
M-MLV 5x Reaction Buffer	Promega, #M5317
Oligo-dT <sub>18</sub> -Primer	Fermentas, #SO131
PCR Softubes	Biozym, #711090
Random Primer	Promega, #C118
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, #N2515
RNasefreies Wasser	Eppendorf
Thermocycler	Biometra, T3

### 3.5.3 PCR

Agarose	Biozym
dNTPs siehe 3.5.2	
GelRed	Biotium, #41003
Loading Dye Blue/Orange	Promega, #G1881
Power Supply	Biometra Standard Power Pack P25
Primer Invitrogen	
10xProbenpuffer	Genecraft
TBE-Puffer (10x)	Sigma
UV-Tisch	Herolab

### 3.5.4. Microarrayanalysen

EDTA	0,5 M (pH 8)
MICRON YM-100 Column	Millipore
NaOH	1 N
PIQOR™ Microarray Kit	Miltenyi Biotec
Scanner	GenePix® 4000B (Axon Instruments)
Software	Acuity 4.0 (Molecular Devices)
	GenePix Pro 6.0
TSA-Labeling and Detection Kit	Perkin-Elmer
TSA™-Labeling and Detection Kit	Perkin-Elmer
Tris	siehe 3.2

### 3.6 Geräte, Materialien und Chemikalien für Cytotoxizitätsassays

ELISA Reader	Packard, SpectraCount™
Essigsäure	
Essigsaurer Alkohol	1% Essigsäure in 50% EtOH
MTT	Amersham, #19265 (Gebrauchslösung: 5 mg/ml in PBS)
Neutralrot	Sigma, # N2880 Stammlösung: 0,4% in A. bidest Gebrauchslösung: 1,25% in Kulturmedium
PBS	siehe 3.1
Solubilisierungslösung	10% SDS in 0,01 mol/l HCl

### 3.7 Geräte, Materialien und Chemikalien für Sequentielle Extraktion

Complete Mini	siehe 3.2
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
NaF	Roth
PBS	siehe 3.1
Probenpuffer (1x, 5x)	siehe 3.2
Rab-Puffer	Tris [0,1 M], EGTA [1 mM], MgSO <sub>4</sub> [0,5 mM], NaF [2 mM], NaCl <sub>2</sub> [0,75 M], Complete Mini; pH 7.0
Ripa-Puffer	Tris [50 mM], NaCl <sub>2</sub> [150 mM], 1% Triton X-100, EDTA [2 mM], 0,5% DOC, 0,1% SDS, Complete Mini; pH 7.5
SDS	siehe 4.2
Tris	siehe 4.2
Triton	X-100 siehe 4.4

### 3.8 Geräte, Materialien und Chemikalien für Proteasomen-Assay

ATP	Sigma, # A26209 Stammlösung: 50 mM in A. bidest
Mikrotiterplatte	Nunc, # 36105
Proteasomenassaypuffer	Tris-HCl (pH 7.2) [10 mM], SDS [0,035%], MgCl <sub>2</sub> [5 mM], ATP [5 mM]
Substrat II	Enzo, # ZW 9345-0005 (Z-Leu-Leu-Glu-AMC)
Elisa-Reader	Packard, FluoroCount™

### 3.9 2D-Gelelektrophorese

Agarose	0,5 % in 50 mM Tris-HCL, pH 8,8
Bio-Lyte	Bio-Rad
Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
IEF-Gel	Criterion™ Tris-HCL, 10%, IEF well, Bio-Rad
Lysispuffer	Tris-HCl [50 mM], EDTA [ 5 mM], NaCl [300 mM ], Triton X 100 [0,5 %], Complete Mini
PROTEAN®IEF-Cell	Bio-Rad

ReadyStrip IPG Strip (11 cm, linear pH 3-10)	Bio-Rad
Rehydratationspuffer	Bio-Rad
	Stocklösung: Urea [8 M], CHAPS [3 mM], Bromphenolblau [3 µM]
	Aliquots zu je 2,5 ml, Lagerung bei -20 °C
SDS-Equilibrierungspuffer	Stocklösung: Tris-HCl [50 mM], pH 8,8, Urea [6 M], Glycerol [30 %(v/v)] SDS [70 mM]
	Bromphenolblau [3 µM]
	Aliquots zu je 10 ml, Lagerung bei -20 °C
TCA	siehe 3.3

### 3.10 In vitro SUMOylierung von Vimentin

SUMOylierungs-Kit	Enzo Life Sciences, # UW8955
Vimentin	Enzo, # 908-280-010

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellbiologische Methoden**

Die für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen primären Fibroblasten und Keratinocyten wurden bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Die Zellen stammten aus Biopsiematerial von jeweils drei Spendern und wurden in den Passagen 2 – 4 verwendet. Die Keratinocyten stammten von weiblichen Spendern im Alter von 19 bis 31 Jahren. Die Fibroblasten wurden zwei weiblichen und einem männlichen Spender im Alter von 18 bis 30 Jahren entnommen. Für vergleichende Versuche wurden gleiche Passagen verwendet. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

#### **4.1.1 Kultivierung von primären Keratinocyten und Fibroblasten**

Die Fibroblasten wurden in DMEM mit FCS [10%], 50 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin und 2 mM Glutamax kultiviert, die Keratinocyten in KBM-2 mit KBM-2-Single Quots und 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>. Das Medium wurde während der Kultivierung der Zellen zweimal wöchentlich gewechselt.

#### **4.1.2 Passagieren von primären Keratinocyten und Fibroblasten**

Die Zellen wurden passagiert, wenn sie in etwa zu 70% konfluent waren. Um die adhärenenten Zellen vom Kulturschalenboden zu lösen, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen, um verbliebenes Medium zu entfernen, und ein dünner Film Trypsin/EDTA (37 °C) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden fünf Minuten bei 37 °C in Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit einer Stopplösung überführt. Im Falle der Fibroblasten wurde das Kulturmedium als Stopplösung verwendet, im Falle der Keratinocyten PBS mit 10% FCS. Das in der jeweiligen Stopplösung enthaltene FCS inhibiert die Aktivität des Trypsin/EDTA. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm fünf Minuten zentrifugiert und das Pellet in neuem Medium resuspendiert. Mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) wurde die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Zellmenge für die Experimente in neue Kulturschalen gesät.

### **4.1.3 Beschichtung von Mikrotiterplatten**

Um eine verbesserte Adhäsion der Keratinocyten auf Mikrotiterplatten zu gewährleisten, wurden diese vor der Aussaat der Zellen mit PLL beschichtet. Hierfür wurden die einzelnen Vertiefungen für mindestens 30 Minuten mit PLL-Gebrauchslösung bedeckt. Vor der Aussaat der Zellen wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen.

### **4.1.4 Kryokonservierung von Fibroblasten und Keratinocyten**

Um die Fibroblasten und Keratinocyten einzufrieren, wurden die Zellen wie unter 4.1.2 beschrieben vom Schalenboden gelöst und das Pellet nach der Zentrifugation in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen pipettiert und in einem Behälter mit Isopropanol langsam auf -80 °C gekühlt (1 °C pro Minute). Dieses langsame Einfrieren und die Anwendung von DMSO sind nötig, um einer intrazellulären Kristallbildung entgegen zu wirken. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **4.1.5 Auftauen und Wiederinkulturnahme von primären Fibroblasten und Keratinocyten**

Die eingefrorene Zellsuspension wurde im Wärmebad bei 37 °C aufgetaut, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit Kulturmedium überführt und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, um den DMSO-Zusatz zu entfernen. Die Pellets wurden in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Zellmenge auf eine Kulturschale gegeben.

### **4.1.6 Kultivierung und Behandlung von Phenion®-Hautmodellen**

Das Phenion®-Hautmodell ist ein Vollhautmodell, welches aus Keratinocyten und Fibroblasten desselben menschlichen Spenders aufgebaut ist. Zusätzlich zu Untersuchungen an Monolayerkulturen erlaubt das Vollhautmodell somit Untersuchungen in einem der Haut ähnlichen Gewebe.

Der Durchmesser eines einzelnen Modellhautstückes beträgt 1,3 cm, was einer Oberfläche von rund 1,3 cm<sup>2</sup> entspricht. Die Keratinocyten und Fibroblasten werden aus gesundem Vorhautgewebe gewonnen. In einem ersten Schritt werden die vereinzelt Fibroblasten in eine Kollagenmatrix eingebettet. Nach ca. 2 Wochen werden in einem zweiten Schritt auf diese rekonstruierte Dermis die Keratinocyten ausgesät. Nach einigen Tagen ist eine Ausdifferenzierung und Schichtung der Keratinocyten erkennbar. Für eine natürliche Ausdifferenzierung ist der Luftkontakt zum richtigen Zeitpunkt essentiell. Nach insgesamt 5-



wöchiger Kultivierung, wovon die letzten 12 Tage an der Luft-Medium-Grenze, ist die Hautstruktur analog zu nativer Haut vollständig ausgebildet. Die Epidermis umfasst 8 bis 10 Zellschichten, weist die epidermistypische Schichtung auf (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) und ist mit der darunter liegenden rekonstruierten Dermis fest verhaftet. Mit zunehmendem Alter findet eine Verdickung des Stratum corneum und damit eine Verhornung statt.

Nach ihrer Ankunft wurden die Hautmodelle in 6-Lochplatten mit Phenion-ALI-Medium überführt, für 24h akklimatisiert und dann behandelt.

## **4.2 Behandlung der Zellen mit Stressoren**

### **4.2.1 Proteasomale Inhibition**

Für die proteasomale Inhibition wurden MG132 oder Lactacystin verwendet. MG132 (Cbz-leu-leu-leucinal) ist ein synthetischer Proteasomen-Inhibitor, der reversibel an die proteolytisch aktiven Bereiche des 20S-Proteasoms bindet. Lactacystin ist ein natürlicher Proteasomen-Inhibitor, der das N-terminale Threonin der  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms irreversibel modifiziert.

Um die Zellen mit MG132 oder Lactacystin zu behandeln, wurde das Medium mit dem gewünschten Volumen der Gebrauchslösung versetzt und die Zellen darin für den gewünschten Zeitraum inkubiert.

### **4.2.2 Induktion von Makroautophagie**

Rapamycin ist ein synthetischer Inhibitor der mTOR-Kinase und induziert somit MA.

Das Medium wurde mit dem entsprechenden Volumen der Gebrauchslösung versetzt und die Zellen für den gewünschten Zeitraum darin inkubiert.

### **4.2.3 Inhibition von Makroautophagie**

3-Methyladenin und Wortmannin inhibieren die PI3-Kinasen der Klasse III und werden als Inhibitoren von MA eingesetzt.

Das Medium wurde mit den entsprechenden Volumina der Gebrauchslösungen versetzt und die Zellen für den gewünschten Zeitraum darin inkubiert.

#### **4.2.4 Hitzestress**

Um die Zellen einem Hitzestress auszusetzen, wurden die Zellkulturschalen mit Parafilm abgedichtet und für 30 Minuten in ein Wasserbad, das auf die entsprechende Temperatur eingestellt wurde, gesetzt. Für Recovery-Versuche wird die Parafilm-Folie wieder entfernt und die Zellen für weitere 18h unter normalen Bedingungen kultiviert. Die Zellkulturschalen mit den Kontrollzellen wurden ebenfalls für 30 Minuten mit Parafilm abgedichtet, verblieben jedoch im Inkubator.

#### **4.3 Morphologische Untersuchungen**

Die Morphologie der behandelten Zellen sowie der unbehandelten Kontrollzellen wurde mit Hilfe des Hoffmann-Modulations-Kontrast-Mikroskops (HMK) charakterisiert und fotografisch dokumentiert.

#### **4.4 Proteinbiochemische Methoden**

##### **4.4.1 Probenaufbereitung für die SDS-PAGE**

Das Medium wurde von der Schale gesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 1x Probenpuffer abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 100 °C im Wasserbad denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Tensid SDS überdeckt zum einen die Eigenladung der Proteine, so dass sie eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und entsprechend ihres Molekulargewichts im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Zum anderen führt es zur Lyse der Zellen, Denaturierung der Proteine und Unterbindung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Disulfidbrücken, die u. a. für die Tertiärstruktur des Proteins verantwortlich sind, werden durch die Thiolverbindung  $\beta$ -Mercaptoethanol gespalten. Noch bestehende Sekundärstrukturen werden durch das Auflösen von Wasserstoffbrückenbindungen beim Kochen der Proben zerstört.

##### **4.4.2 Isolierung von Proteinen aus Hautmodellen**

Die Hautmodell-Stücke wurden in einem Handhomogenisator in 1 ml Lysispuffer homogenisiert. Zusätzlich wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:5 mit 5x Probenpuffer versetzt.

#### **4.4.3 Proteinbestimmung nach NEUHOFF (1979)**

Um die Proteinkonzentrationen der aufbereiteten Proben zu ermitteln, wurden 3 x 5 µl jeder Probe auf eine Cellulose-Acetatfolie pipettiert und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Folie wurde nach dem Trocknen zehn Minuten in der Neuhoff-Färbelösung gefärbt und anschließend wieder entfärbt. Nach dem Trocknen der Folie wurden die nun gefärbten Proteinproben ausgeschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in 1 ml DMSO über Nacht auf dem Schüttler gelöst. Am nächsten Tag wurde der Proteingehalt bei 630 nm photometrisch mit Hilfe einer Eichkurve (0,1 µg - 10 µg) bestimmt. Als Blindwert für die Messungen diente dabei ein Stück Cellulose-Acetatfolie ohne Proteinprobe, das wie oben genannt behandelt wurde. Das Photometer wurde mit definierten Mengen BSA kalibriert (Neuhoff et al., 1979).

#### **4.4.4 Molekulargewicht-Standard**

Die 3 mg des Molekulargewicht-Standard wurden in 900 µl Aqua bidest gelöst, mit 45 µl 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 55 µl Remazole Brilliant Blue Lösung versetzt, fünf Minuten gekocht und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde der Marker 1:5 mit 5 x Probenpuffer versetzt.

Der SDS-6H2-Standard dient der Überprüfung des Molekulargewichts der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine. Er liefert Markerbanden von 29 bis 205 kDa.

#### **4.4.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE**

Mit Hilfe der SDS-PAGE können denaturierte Proteine in einem Proteingemisch nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die durch das im Probenpuffer enthaltene SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode. Das Trennmedium ist ein Polyacrylamid-Gel, welches durch die Polymerisation von Acrylamidmonomeren und dessen Quervernetzung durch N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Die Vernetzung wird durch die Katalysatoren APS und TEMED ausgelöst. Die Porengröße kann durch unterschiedliche Anteile von AA/BA variiert werden.

Zunächst wurde das Trenngel in der Gießapparatur gegossen und sofort mit 0,1% SDS-Lösung überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern und eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Nach einer halbstündigen Polymerisationszeit wurde die SDS-Lösung entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, dessen Polymerisationszeit 45 Minuten betrug. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Bevor die Proben mit Hilfe von Kapillarspitzen auf das Gel aufgetragen wurden, wurden 1,5 µl einer 0,1%igen Bromphenolblaulösung in jede Tasche pipettiert. Das

Bromphenolblau macht die Taschen im Gel sichtbar. Die Apparatur wurde nun mit Laufpuffer befüllt und die Geltaschen mit den Proben sowie mit dem hochmolekularen Standardmarker (29 - 205 kDa) befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 160V für 60 bis 70 Minuten.

**Tab. 4: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS-PAGE**

	Sammelgel	Trenngel		
	4,5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
0,5 M Tris/Cl; pH 6,8	0,8 ml	0	0	0
1,5M Tris/Cl; pH8,8	0	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
Aqua bidest.	2,0 ml	5,0 ml	4,0 ml	3,0 ml
AA/BA	0,5 ml	3,0 ml	4,0 ml	5,0 ml
TEMED	15 µl	30 µl	30 µl	30 µl
APS	30 µl	60 µl	60 µl	60 µl

#### 4.4.6 ECL-Western Blot

Beim Western Blot werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Trägermembran transferiert. Die übertragenen Proteine sind so für immunochemische Analysen zur Identifizierung und Quantifizierung zugänglich.

##### 4.4.6.1 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran

Die Polyacrylamidgele equilibrierten nach der SDS-PAGE einige Minuten in Transferpuffer. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol lockert die Bindung der Proteine an das SDS. So wird deren Bindung an die Trägermembran erhöht. Anschließend wurde der Blot nach dem Sandwichverfahren in einer Gelkassette zusammengebaut. Ein Schaumstoffschwamm bildet die erste Lage. Es folgen zwei Whatman-Filter, das Gel, die Membran, wieder zwei Filter und noch ein Schaumstoffschwamm. Die Schwämme, Filter und die Nitrocellulose-Membran wurden vor dem Zusammenbau 15-30 Minuten in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde zunächst eine Minute in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer überführt. Der Transfer der Proteine auf die Trägermembran erfolgte in der Blot-Apparatur für 65 Minuten bei 350 mA Stromstärke.

Nach Beendigung des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran, wurde diese in Ponceau S inkubiert, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Die Bindung des Farbstoffs ist reversibel. Die Membran wurde durch Waschen mit TBST wieder entfärbt.

#### **4.4.6.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf der Trägermembran**

Mit dieser Methode können relevante Proteine auf der Membran mittels Detektion durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die entfärbte Membran wurde für eine halbe Stunde mit 5% Milchpulver in TBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem antigenspezifischen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Die Antikörperverdünnungen wurden in TBS mit 5% Milchpulver erstellt. Die Zugabe von  $\text{NaN}_3$  verhindert das Wachstum von Mikroorganismen. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit TBST wurde die Trägermembran mit einem Meerretichperoxidase(HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in TBS mit 5% Milchpulver 1:3000 verdünnt. Es folgten drei 10-minütige Waschschrritte mit TBST.

Die Visualisierung der Antikörperbindung an die Proteine erfolgt durch die Oxidation von Luminol durch die an den sekundären Antikörper gebundene HRP. Dies geschieht durch die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und Luminol und dabei entstehende Sauerstoffradikale. Diese oxidieren das Luminol, was in einen angeregten Zustand übergeht. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht (Chemilumineszenz) frei und das Filmpapier belichtet.

Die ECL-Lösungen wurden für etwa eine Minute über die Trägermembran pipettiert, die anschließend luftblasenfrei zwischen Klarsichtfolie gelegt und mit Tesafilm auf der Röntgenplatte fixiert wurde. In der Dunkelkammer wurde das Filmpapier auf die Membran gelegt und belichtet. Die Belichtungszeiten variierten je nach Proteinmenge und Antikörper. Nach der Belichtung wurde das Filmpapier in den Entwickler gelegt, die Reaktion anschließend mit Wasser gestoppt und das Filmpapier fixiert. Anschließend wurde das Filmpapier mit Leitungswasser abgespült. Nach dem Trocknen konnten die visualisierten Proteinbanden ausgewertet werden.

## 4.5 Immuncytochemische Methoden

### 4.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit Monolayerkulturen

Mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenz ist es möglich, Proteine und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Hierbei bindet ein Primärantikörper an das Zielprotein. In einem zweiten Schritt wird der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex mit einem zweiten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper detektiert. Der Vorteil zur direkten Immunfluoreszenz, bei der nur ein fluoreszenzgekoppelter erster Antikörper an ein Antigen bindet, liegt in der Signalverstärkung, da mehrere sekundäre Antikörper an einen Primärantikörper binden.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Coverslips gezüchtet und behandelt. Zum gewünschten Zeitpunkt wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und fixiert. Dies geschah mittels Paraformaldehyd oder Methanol. Bei der Fixierung durch Paraformaldehyd kommt es zu einer Quervernetzung von Proteinen an ihren Aminosäuren. So bleiben die Lokalisation der Proteine in der Zelle und ihre Tertiärstruktur unverändert. Letzteres bietet den Vorteil, dass die Epitope des Antigens für die spezifischen Antikörper erhalten bleiben. Die gewaschenen Zellen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der Paraformaldehydlösung inkubiert. Anschließend erfolgten zwei fünfminütige Waschschrte mit PBS und ein 30-minütiger Permeabilisierungsschritt mit dem Detergens Triton X-100, damit die Antikörper die Zellmembran passieren können.

Zur Fixierung der Zellen mit Methanol wurde dieses für sieben Minuten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf die gewaschenen Zellen gegeben. Auch hierauf folgten zwei fünfminütige Waschschrte. Bei dieser Fixierungsmethode bleiben die Proteine erhalten, indem sie präzipitiert werden. Gleichzeitig erfolgt auch schon die Permeabilisierung der Membran.

Nach den verschiedenen Fixierungsmethoden wurde einheitlich weiter verfahren. Die Zellen wurden zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit 5% FCS in PBS blockiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS für je zehn Minuten und eine einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Dazu wurden  $25\text{ }\mu\text{l}$  der entsprechenden Antikörperverdünnung auf ein Stück Parafilm pipettiert und das Cover Slip mit der von den Zellen bewachsenen Seite aufgelegt. Dies gewährleistete eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers auf dem gesamten Cover Slip. Nach drei Waschschrten für je 10 Minuten mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

unter Lichtausschluss, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Abschließend folgten nochmals drei Waschschrte mit PBS für jeweils 10 Minuten. Für eine Detektion der Actinfilamente wurden die Zellen zusammen mit dem 2. Antikörper mit Phalloidin-TRITC inkubiert (Verdünnung: 50 µg/ml in PBS). Phalloidin-TRITC bindet spezifisch an F-Actin und fluoresziert rot.

Abschließend wurden die Cover Slips mit der von den Zellen bewachsenen Seite auf einen Tropfen Einbettungsmedium auf einen Objektträger gebracht und der Rand zum Versiegeln mit Nagellack bestrichen. Das Einbettungsmedium enthält den blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamin-2'-Phenylindol). Die Verbindung lagert sich an die DNA an und macht so die Zellkerne sichtbar. Es folgte die fotografische Dokumentation und Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

#### **4.5.2 Anfertigung von Kryostatschnitten von Hautmodellen**

Für die Anfertigung der Kryostatschnitte wurden die Hautmodelle aus den Kulturschalen genommen, in TissueTek auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Schnitte wurden bei -20 °C im Kryotom angefertigt und direkt auf die Objektträger übertragen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **4.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Hautmodellschnitten**

Die Hautmodellschnitte wurden 10 Minuten in Methanol/Aceton (1:1) fixiert, drei mal 10 Minuten mit PBS gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3% BSA in PBS blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 1h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte nach dreimaligem Waschen über Nacht bei 4 °C. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt. Die Hautmodellschnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt.

### **4.6 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.6.1 RNA-Isolierung und RT-PCR**

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit nach den Angaben des Herstellers. Nach der Isolation wurde der Gehalt der RNA durch die Extinktion bei 260 nm photometrisch bestimmt.

mRNA	x $\mu$ l
Random-Primer [12,5 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
Oligo-dT <sub>18</sub> -Primer [12,5 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
RNasefreies Wasser	12 - x $\mu$ l

**Tab 5.: Zusammensetzung des Primer-Mix für die RT-PCR**

5x M-MLV-Puffer	5 $\mu$ l
dNTPs, 10 mM	4 $\mu$ l
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	1 $\mu$ l
MMLV Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
	$\Sigma$ 11 $\mu$ L

**Tab 6.: Zusammensetzung des Reaction-Mix für die RT-PCR**

Je 1  $\mu$ g RNA wurde mit je 1  $\mu$ g Random-Primer und Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer versetzt (Tab. 5), 2 Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. In jede Probe wurden 11  $\mu$ l des Reaction Mix (Tab. 6) pipettiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten. Abschließend wurde die cDNA mit 45  $\mu$ l RNasefreiem Wasser versetzt und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C gelagert.

#### 4.6.2 PCR

Zur Durchführung der PCR wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix angesetzt (Tab. 8). Die Primer (Tab. 7) wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt.

**Tab. 7. : Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer**

Primer	Sequenz up	Sequenz down
GAPDH	5' AAC GGA TTT GGT CGT ATT GG 3'	5' AGT GAG CTT CCC GTT CAG C 3'
SUMO-1	5' CGT CAT CAT GTC TGA CCA GGA 3'	5' CAC TGA AAG TCA CAG TCC AGG 3 '

Die Expression der einzelnen mRNAs wurde über das Verhältnis der GAPDH-mRNA bestimmt. GAPDH ist ein Haushaltsgen, dessen mRNA gleichmäßig exprimiert wird.

A. bidest	37 $\mu$ l
10xProbenpuffer	5 $\mu$ l
dNTPs [2 mM]	2,5 $\mu$ l
Primer 1 [10 $\mu$ M]	2,0 $\mu$ l
Primer 2 [10 $\mu$ M]	2,0 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,5 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l

**Tab. 8: Zusammensetzung des MasterMixes für eine Probe.**



Jedem Mastermixansatz wurde 1 µl cDNA zugegeben. Im Thermocycler erfolgte bei 95 °C die Denaturierung der cDNA für 2 Minuten. Die zur Amplifikation der DNA verwendeten Programme sind in Tab. 9 aufgelistet. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf 4 °C heruntergekühlt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

**Tab. 9: PCR-Programme für die verwendeten Primer**

Primer	Denaturierung	Annealing	Synthese	Zyklen
GAPDH	2 min. bei 95 °C	30 sek. bei 60 °C	1 min. bei 72 °C	25
SUMO-1	2 min. bei 95 °C	30 sek. bei 64 °C	1 min. bei 72 °C	28

Nach der PCR wurde die Probe mit 8 µl Loading Dye versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. In dem Agarosegel war GelRed enthalten, um die DNA sichtbar zu machen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in TBE-Puffer. Bei 100 V wurde die DNA für 30 – 60 Minuten aufgetrennt. Ein 100 bp Marker ermöglichte die Identifizierung der amplifizierten Produkte. Nach dem Gellauf wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

### 4.6.3 Microarray-Analysen

Microarrays werden eingesetzt, um die Genaktivität ausgewählter Gene in Zellen oder Geweben unter Kontrollbedingungen und im Vergleich dazu unter dem Einfluss verschiedener Stimuli oder Stressoren zu untersuchen. Es kann unter den verschiedenen Bedingungen die mRNA-Menge bestimmter Gene nachgewiesen werden. Auf der Oberfläche der Microarrays befinden sich Gen-Sonden in einem bekannten Raster in vierfacher Ausführung. Zunächst wird die RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben und zugleich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese wird dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden die markierten cDNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays kann mittels eines Lasers ausgelesen werden. So kann die Aktivität ausgewählter Gene bestimmt werden.

#### 4.6.3.1 cDNA-Synthese und -Labeling

Die wie in 4.6.1 beschrieben isolierte RNA wurde in Fluorescein- oder Biotin-gelabelte cDNA mittels reverser Transkriptase und gelabelten Nucleotiden umgeschrieben. 2 µg RNA der behandelten Probe wurde mit Fluorescein (FL) markiert, 2 µg der unbehandelten Kontrolle mit Biotin. Hierfür wurde die RNA mit Kontroll-RNA 2, dem Primer-Mix und einem Reaktionsmix versetzt (siehe Tab. 10). Der Ansatz wurde erst für 10 Minuten bei 65 °C

denaturiert und dann für 5 Minuten auf 25 °C abgekühlt (Annealing). Anschließend wurden die Proben auf 42 °C erwärmt und der 10x Reaktionspuffer (2,5 µl) und der AMV RT/RNase Inhibitor Mix (2 µl) zugegeben. Die cDNA wurde während der folgenden 60 Minuten bei 42 °C umgeschrieben. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl 0,5 M EDTA (pH 8) und 2,5 µl 1,0 N NaOH. Anschließendes Abkühlen für 5 Minuten bei 4 °C und Zugabe von 6,5 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisierte den Ansatz. Die erhaltene cDNA wurde mittels MICRON YM-100-Säulen von nicht eingebauten Nucleotiden gereinigt. Hierfür wurden 200 µl 10 mM Tris (pH 7.5) auf die Säule gegeben, die Probe dazu pipettiert und bei 500 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Das Waschen der Säule geschah mit 400 µl 10 mM Tris (pH 7.5) bei 500 xg für 5 Minuten. Nach dem Waschen wurde die Säule invertiert und für 5 Minuten bei 500 xg zentrifugiert. Die Probe wurde in einer Vakuumentrifuge eingengt und in 15 µl 1x Hybridisierungslösung (42 °C) aufgenommen.

**Tab. 10: Zusammensetzung des Reaktions-Mixes für das Labeling der cDNA**

Reagent	Volume
2 µg RNA	x µl
Kontroll RNA 2	2 µl
Primer	2 µl
Reaction Mix Concentrate	1 µl
Fluorescein or Biotin Nucleotide	1 µl
RNase freies Wasser	14 – x µl
Endvolumen	20 µl

#### 4.6.3.2 Microarray-Hybridisierung

Zunächst wurde der Microarray in Millipore-Wasser bei 96 °C für 2 Minuten in einem 50 ml-Tube erhitzt. Dabei wurde die doppelsträngige cDNA auf der Arrayoberfläche denaturiert, so dass nur der an die Glasoberfläche gebundene Strang verbleibt. Nach dem Erhitzen wurde der Array für 30 Sekunden in 96% Ethanol überführt und anschließend bei 500 xg für 3 Minuten getrocknet. Die Prähybridisierungslösung wurde für 2 Minuten bei 96 °C erhitzt und anschließend auf 42 °C heruntergekühlt. 30 µl dieser Lösung wurden auf den Array pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Prähybridisierung erfolgte für 45 Minuten bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen unter feuchter Atmosphäre in einer Hybridisierungskammer mit 400 µl 2x SSC-Lösung. Nach den 45 Minuten wurde der Array auf Raumtemperatur abgekühlt. Die gelabelten cDNA-Proben wurden vermischt, für 2 Minuten auf 42 °C erwärmt, auf die Microarrays pipettiert, mit einem Deckgläschen abgedeckt und über Nacht bei 65 °C

in einem Hybridisierungssofen unter feuchter Atmosphäre in einer Hybridisierungskammer mit 400 µl 2x SSC-Lösung hybridisiert. Nach dem Waschen des Arrays wurde er zuerst mit anti-FL-HRP inkubiert. Dieses Antikörper-Enzym bindet spezifisch an die hybridisierte FL-gelabelte cDNA. Anschließend wurde der Microarray mit einer Cyanin-3-Tyramid-Lösung inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes Cyanin-3 von Cyanin-3-Tyramid. Cyanin-3 kann bei 532 nm detektiert werden. Nach 10 Minuten wurde die HRP inaktiviert. In einem nächsten Schritt wurde der Microarray mit Streptavidin-HRP, das an Biotin-gelabelte cDNA bindet, und anschließend mit einer Cyanin-5-Tyramid-Lösung inkubiert. Die HRP spaltet Cyanin-5-Tyramid und setzt den Fluoreszenzfarbstoff Cyanin-5 frei, der bei 635 nm detektiert wird.

## **4.7 Cytotoxizitätsassays**

### **4.7.1 MTT-Assay**

Mit Hilfe des MTT-Assays werden lebende Zellen anhand ihrer Reaktionsrate bei der Umsetzung von 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) detektiert. Die Reduktion von MTT erfolgt durch die pyridinhaltigen Reduktionsequivalente NADH und NADPH. Damit entspricht die Umsetzung des Salzes zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan der Glycolyserate der Zelle. Zudem ist die Reduktion auch von der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II der mitochondrialen Membran) und damit von der Atmungskette abhängig. MTT wird somit von allen lebenden, metabolisch aktiven Zellen umgesetzt und der Anteil an gebildetem Formazan ist proportional zur Anzahl der Zellen.

Die Zellen wurden auf Mikrotiterplatten (96 wells) ausgesät und behandelt. Es wurden 10 µl MTT-Gebrauchslösung in jedes Well appliziert und die Platte für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte die Umsetzung des Tetrazoliums Salzes. Im Anschluss wurden die Zellen für 4-16 Stunden mit 100 µl Solubilisierungslösung pro Well im Inkubator lysiert. Die Messung der Farbreaktion erfolgte photometrisch mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm. Die Vitalität der behandelten Zellen wurde in Prozent bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen (100%) angegeben.

### **4.7.2 Neutralrot-Assay**

Der Neutralrot-Assay beruht auf der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-Hydrochlorid) in die Lysosomen vitaler Zellen. Der leicht

kationische Farbstoff passiert durch nicht-ionische Diffusion die Zellmembran und akkumuliert in den Lysosomen. Im sauren lysosomalen Milieu wird Neutralrot protoniert und färbt sich rot. In geschädigten oder toten Zellen kann Neutralrot nicht akkumulieren und wird durch das Waschen der Zellen mit PBS wieder entfernt. Die Menge des aufgenommenen beziehungsweise gebundenen Neutralrots ist ein Maß für die Vitalität der Zellen.

Für den Neutralrot-Assay wurden die Zellen auf Mikrotiterplatten ausgesät und behandelt. Das Medium wurde abgesaugt, 100 µl Neutralrotgebrauchslösung in jedes Well pipettiert und für drei Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl essigsaurem Alkohol für 10 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Die Absorption wurde bei 540 nm im Elisa-Reader bestimmt.

#### **4.8 Sequentielle Extraktion**

Mittels sequentieller Extraktion kann die Löslichkeit von Proteinen überprüft werden. Hierfür wurden die Zellen in PBS abgekratzt, die Pellets über Nacht bei -80 °C eingefroren und die Gesamtzelllysate dann sequentiell mit Rab-, Ripa-Puffer oder 1x Probenpuffer extrahiert und die Fraktionen mittels Immunoblot analysiert. Die Pellets wurden zunächst in Rab-Puffer aufgenommen, sonifiziert, die Proteinkonzentrationen bestimmt und angeglichen und ein Teil des Gesamtzelllysats abgenommen (Totalhomogenat). Die Lysate wurden dann 20 Minuten bei 23.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die in Rab-Puffer löslichen Proteine. Das Pellet wurde in Ripa-Puffer resuspendiert und 20 Minuten bei 23.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die in Ripa-Puffer löslichen Proteine. Das Pellet mit den unlöslichen Proteinen wurde in 1x Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Die übrigen Fraktionen wurden mit 5x Probenpuffer 1:5 versetzt und gekocht.

#### **4.9 2D-Gelelektrophorese**

Bei der 2-dimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine eines Zelllysats zunächst hinsichtlich ihres Isoelektrischen Punktes aufgetrennt (Isoelektrische Fokussierung). In einem zweiten Schritt erfolgt die Auftrennung über ihr Molekulargewicht.

##### **4.9.1 Herstellung von Zelllysaten für die 2D-Gelelektrophorese**

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, im Lysispuffer abgekratzt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden dann 30 Minuten bei 4 °C lysiert und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren.

## 4.9.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Während der IEF werden die Proteine auf Basis ihres Isoelektrischen Punktes (pI) aufgetrennt (erste Dimension). Die Nettoladung eines Proteins resultiert aus dem Gehalt der positiv und negativ geladenen Aminosäuren. Der Isoelektrische Punkt (pI) ist der spezifische pH, an welchem die Nettoladung des Proteins 0 beträgt. Bei der IEF wandern Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes in einem pH-Gradienten zu ihrem pI. Dieser pH-Gradient ist in eine Polyacrylamid-Gelmatrix einpolymerisiert, die sich auf einem Plastikstreifen (Strip) befindet.

### 4.9.2.1 Rehydrierung der IEF-Strips

Zu 2,5 ml einer Rehydratationspuffer-Stocklösung wurden 7 mg DTT und 0,2 % Bio-Lyte gegeben. Pro Strip wurden 100 µg Protein in jeweils 200 µl Rehydratationspuffer resuspendiert. Die Proteine wurden für 1h in 0,8 Volumen 27%iger TCA gefällt und die Proben anschließend 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem Rehydratationspuffer resuspendiert.

Das in dem Rehydratationspuffer resuspendierte Protein wurde in die Kammer pipettiert, der IEF-Strip mit der Gelmatrix auf die Probe gelegt und mit 2 ml Silikonöl überschichtet. Die Rehydrierung wurde in der PROTEAN®IEF-Cell der Firma Bio-Rad für 12h bei 20 °C und einer Spannung von 50V durchgeführt.

### 4.9.2.2 Isoelektrische Fokussierung

Nach der Rehydrierung wurde direkt zur IEF übergegangen. Pro Strip wurde hierbei ein Strom von 50 µA eingestellt. Die Fokussierung setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen:

1. 250V, 15 min
2. 10.000V, 3 h
3. 8.000V, 35.000 Vh
4. 250V, 12 h

Schritt 4 konnte innerhalb der 12h gestoppt werden. Die 250V wurden angelegt, um eine Diffusion der Proteine zu vermeiden. Nach Abschluss der Fokussierung wird das Silikonöl mit Hilfe eines feuchten Filterpapiers abgetupft und die Strips bis zur eigentlichen SDS-Gelelektrophorese bei -80 °C gelagert.

### **4.9.2.3 Equilibrierung der fokussierten Strips**

Die Strips aus der IEF wurden vor der SDS-Gelelektrophorese equilibriert. Hierfür wurde der IEF-Strip 15 Minuten in 10 ml SDS-Equilibrierungspuffer mit 100 mg DTT zur Beseitigung von Disulfidbrücken und Beladung der Proteine mit SDS auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend folgte eine 15minütige Inkubation in 10 ml SDS-Equilibrierungspuffer mit 250 mg des Alkylierungsreagenz Iodacetamid. Der Strip wurde danach für einige Sekunden mit SDS-Laufpuffer gewaschen, in die Tasche des IEF-Gels gelegt und mit 0,5 % Agarose (in 50 mM Tris-HCL, pH 8,8) überschichtet. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte für 1,5 h bei 120V. Die Proteine wurden nun senkrecht zur ersten Dimension nach ihrer Größe aufgetrennt.

### **4.9.3 Analyse SUMOylierter Proteine**

Die IEF-Gele wurden nach der Elektrophorese kurz in TBS gewaschen und für 10 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das Entfärben erfolgte für mehrere Stunden in Wasser auf einem Schüttler, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Zur Identifikation SUMOylierter Proteine wurde ein ECL-Western Blot durchgeführt. Die Signale des SUMO-1-Western Blots auf der Nitrocellulosemembran wurden entsprechend im Coomassie-Gel bestimmt, aus diesem ausgeschnitten und bis zur Analyse in Aqua Bidest bei 4 °C gelagert. Die Identifikation der Proteine aus dem Coomassie-Gel erfolgte durch die ProteomeFactory in Berlin mittels nanoLCESI-MS/MS.

### **4.10 In vitro SUMOylierung von Vimentin**

Für die in vitro SUMOylierung von Vimentin durch SUMO-1 wurde ein SUMOylierungs-Kit der Firma Enzo Life Sciences verwendet. Rekombinates Vimentin wurde in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt und die Reaktion nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und ECL-Western Blot analysiert.

### **4.11 Proteasomen-Aktivitäts-Assay**

Die proteolytische Aktivität der 20S Proteasomen in den Keratinocyten und Fibroblasten wurde anhand eines Assays bestimmt, in dem ein fluorogenes Peptid (Z-Leu-Leu-Glu-AMC) als Substrat diente. Durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der Proteasomen wird AMC abgespalten. Das freigesetzte AMC emittiert unter Anregung (380 nm) Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 460 nm.

Für die Durchführung des Versuchs wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit einem Rubber-Policeman von der Zellkulturschale gekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß

überführt. Nach Zentrifugation der Proben für eine Minute in der Tischzentrifuge wurden die Pellets in kaltem Proteasomen-Assay-Puffer resuspendiert und sonifiziert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung der Lysate nach Neuhoff et al. und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde je nach Proteinmenge auf 1 µg/µl in 320 µl Proteasomen-Assay-Puffer für eine Dreifachbestimmung eingestellt. Von den Proben wurden ein bis drei Mal 100 µl Lysat in ein Well einer Mikrotiterplatte pipettiert, die dabei auf Eis stand. Anschließend wurden in jedes Well 3,5 µl des Substrat II (Stammlösung 5 mM) pipettiert und die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Fluoreszenzmessung.

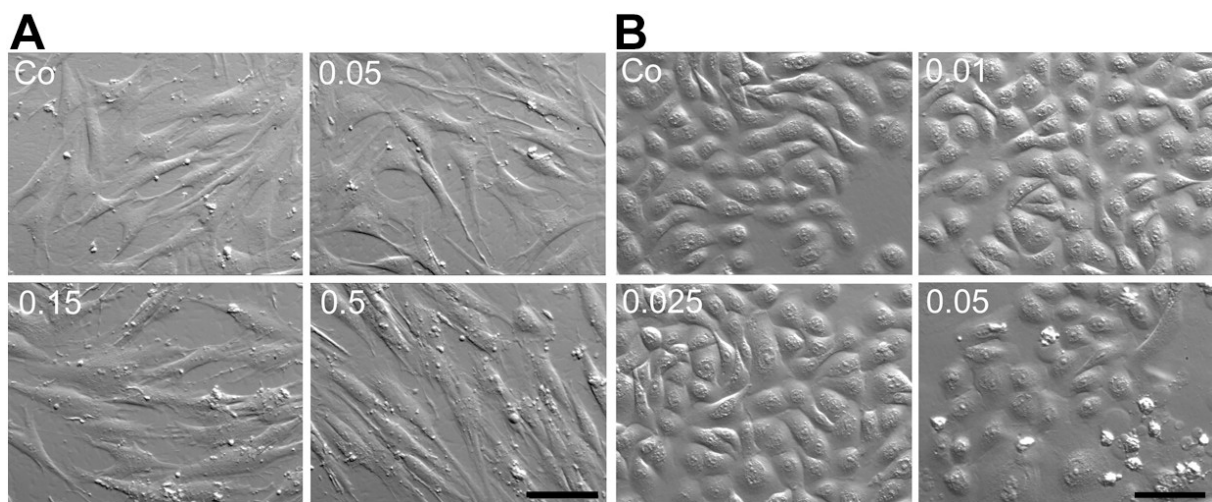
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf Fibroblasten und Keratinocyten

Der kontinuierliche Abbau fehlgefalteter und nicht mehr benötigter Proteine durch das UPS ist entscheidend für die Viabilität von Zellen. Durch Inhibition oder Überlastung des Proteasoms können cytotoxische Proteinaggregate und Aggresomen entstehen und zum Zelltod führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytotoxizität von MG132 in Fibroblasten und Keratinocyten vergleichend untersucht. Hierfür wurden morphologische Veränderungen der Zellen dokumentiert, ihre Viabilität mittels MTT-Assay untersucht sowie der Grad der Inhibition der Proteasomen bestimmt.

#### 5.1.1 Morphologie, Cytotoxizität und proteasomale Aktivität

Um die Empfindlichkeit von Fibroblasten und Keratinocyten gegenüber der Inhibition des proteasomalen Systems morphologisch zu untersuchen, wurden die Zellen für 24h mit ansteigenden Konzentrationen von MG132 inkubiert und morphologische Veränderungen mittels HMK analysiert.



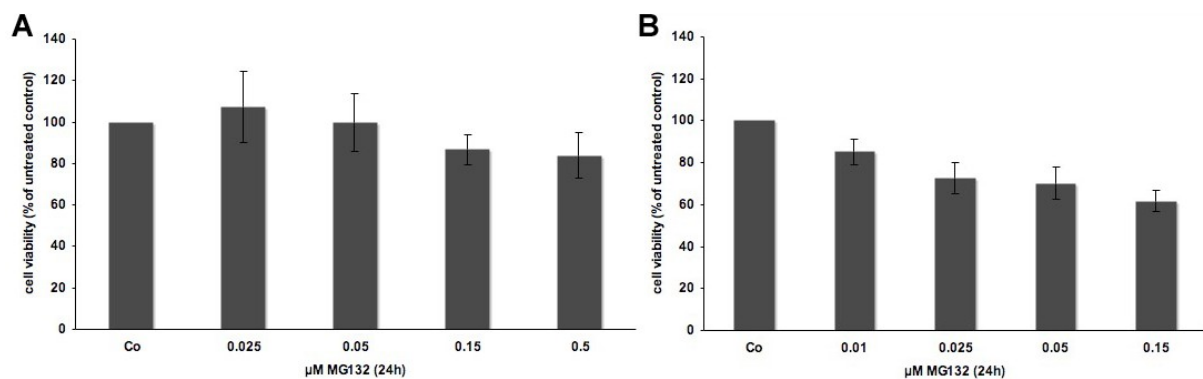
**Abb. 7: Morphologische Veränderungen von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach proteasomaler Inhibition.** Die Zellen wurden für 24h mit steigenden Konzentrationen von MG132 behandelt (0,05 bis 0,5  $\mu\text{M}$  (A) bzw. 0,01 bis 0,05  $\mu\text{M}$  (B)). Morphologische Veränderungen wurden mit dem HMK dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 7A zeigt, dass die Fibroblasten ab einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 erste morphologische Veränderungen aufweisen. Auf der Zelloberfläche sind kleine membranöse Ausstülpungen zu erkennen und die Ausläufer ziehen sich leicht zurück. Nach 24stündiger



Behandlung mit einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  MG132 erscheinen die Zellen morphologisch stärker geschädigt und besitzen eine eher bipolare Form (Abb. 7A). Keratinocyten reagieren deutlich empfindlicher auf proteasomalen Stress. Schon bei einer Konzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  MG132, bei der in Fibroblasten noch keine morphologischen Veränderungen auftreten, lösen sich erste Zellen vom Schalenboden (Abb. 7B). Erste Auswirkungen auf die Morphologie werden bereits ab einer Konzentrationen von 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 sichtbar, bei der sich die Zellen im Bereich des Zellkerns abflachen (Abb. 7B).

Für die Erzielung hormetischer Effekte werden toxische Substanzen nur sehr gering dosiert eingesetzt. Um eine Konzentration festlegen zu können, die nur leichte cytotoxische Effekte in Fibroblasten und Keratinocyten hervorruft, wurden die Auswirkungen von MG132 mittels MTT-Assay ermittelt. Hierfür wurden die Zellen für 24h mit Konzentrationen von MG132 behandelt, die keine morphologischen Veränderungen in den Zellen hervorrufen bis hin zu Konzentrationen, bei denen starke morphologische Schädigungen sichtbar waren. Konzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$  für Fibroblasten und 0,025  $\mu\text{M}$  für Keratinocyten führen zu vergleichbaren leichten cytotoxischen Effekten. Bei diesen Konzentrationen sinkt die Viabilität beider Zelltypen auf ca. 80% (Abb. 8A und 8B). Anhand der Bestimmung der Zellviabilität konnte wiederum gezeigt werden, dass Keratinocyten deutlich empfindlicher auf proteasomalen Stress reagieren als Fibroblasten. Dies bestätigt die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen.

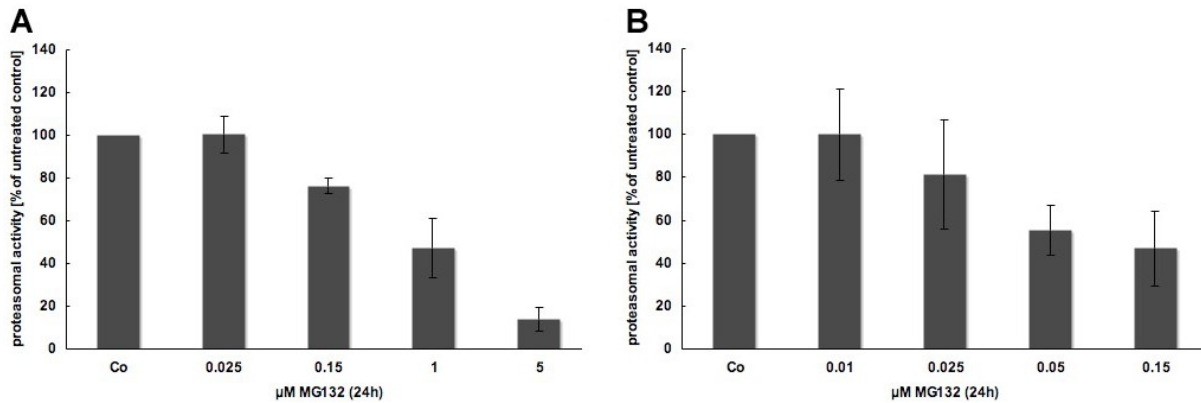


**Abb. 8: Bestimmung der Zellviabilität von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach proteasomaler Inhibition mittels MTT-Assay.** Die Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe mit MG132 behandelt (A: 0,025 – 0,5  $\mu\text{M}$ ; B: 0,01 – 0,15  $\mu\text{M}$ ). Nach 24h wurde der MTT-Assay durchgeführt. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Dass die ähnlichen cytotoxischen Effekte auf einer vergleichbaren Inhibition des Proteasoms beruhen, zeigen die Ergebnisse des Proteasomen-Assays (Abb. 9). Zur Bestimmung der proteasomalen Aktivität wurden Zelllysate mit einem fluorogenen Peptid (Z-Leu-Leu-Glu-

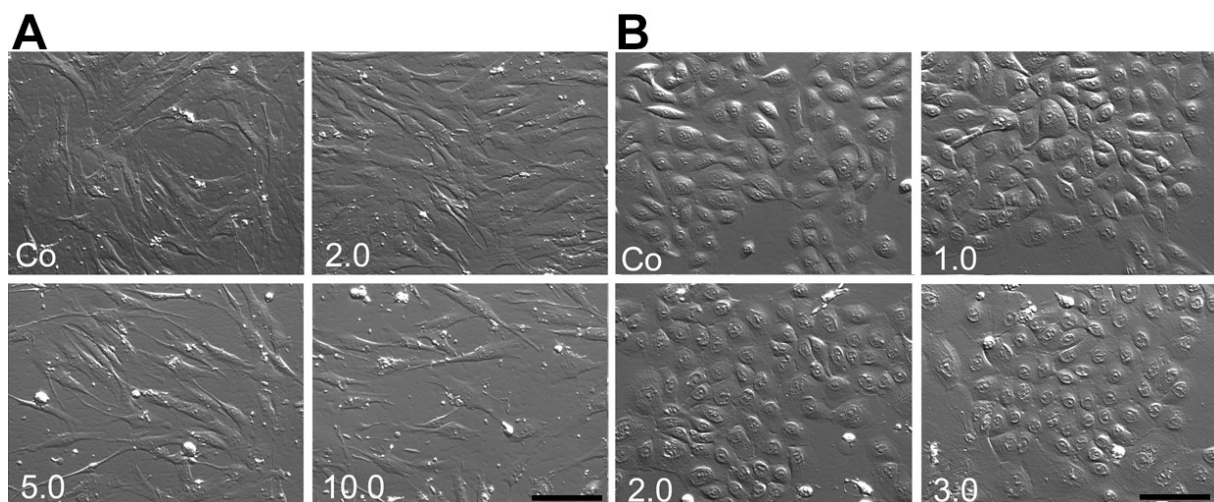
AMC) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der Proteasomen wird AMC abgespalten. Das freigesetzte AMC emittiert unter Anregung (380 nm) Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 460 nm. Die Intensität der Fluoreszenz ist somit ein Maß für die proteasomale Aktivität der Zellen.

Die proteasomale Aktivität sinkt bei Konzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$  in Fibroblasten und 0,025  $\mu\text{M}$  in Keratinocyten auf etwa 80% (Abb. 9A und B).



**Abb. 9: Bestimmung der proteasomalen Aktivität von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach Behandlung mit MG132.** Die Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe mit MG132 behandelt (A: 0,025 - 5  $\mu\text{M}$ ; B: 0,01 - 0,15  $\mu\text{M}$ ). Nach 24h wurde der Proteasomen-Assay durchgeführt. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Keratinocyten auf proteasomalen Stress deutlich empfindlicher reagieren als Fibroblasten. Um diesen Unterschied weiter abzusichern, wurde Lactacystin, ein weiterer proteasomaler Inhibitor mit größerer Spezifität, eingesetzt.



**Abb. 10: Morphologische Veränderungen von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach proteasomaler Inhibition.** Die Zellen wurden für 24h mit steigenden Konzentrationen von Lactacystin behandelt (2 - 10  $\mu\text{M}$  (A) bzw. 1 - 3  $\mu\text{M}$  (B)). Morphologische Veränderungen wurden mit dem HMK dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

Beide Zelltypen wurden für 24h mit aufsteigenden Konzentrationen dieser Substanz behandelt. Keratinocyten weisen ab einer Konzentration von 1,0  $\mu\text{M}$  Lactacystin leichte morphologische Veränderungen, vergleichbar mit denen nach Behandlung mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132, auf (Abb. 10B). Fibroblasten reagieren auf die Behandlung mit Lactacystin wie auch auf MG132 deutlich weniger empfindlich als Keratinocyten. Morphologische Veränderungen sind erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erkennbar (Abb. 10A).

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob sich der beobachtete Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber proteasomalem Stress auch in entsprechenden Unterschieden in den Stressantworten der beiden Zelltypen widerspiegelt. Hierfür wurden Stressantworten analysiert, die in Bezug auf die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut von Interesse sind. Dazu gehören die Induktion von Hsps und die Induktion von MA. Als dritter Parameter sollte die SUMOylierung von Proteinen untersucht werden.

## **5.2 Induktion von Hitzeschockproteinen in Fibroblasten und Keratinocyten**

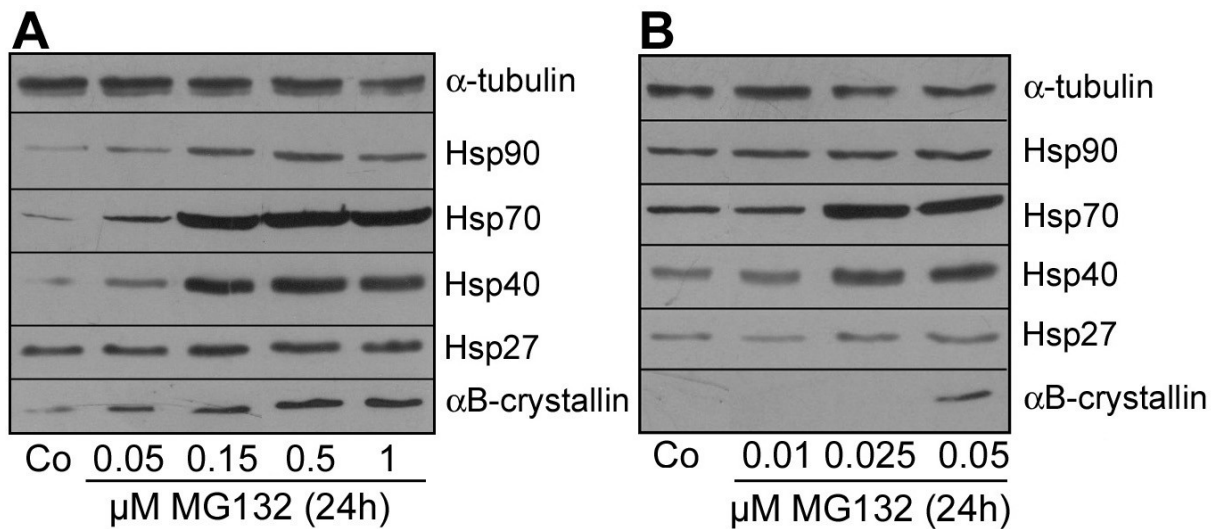
Die Induktion von Hsps gehört zu den Überlebenstrategien von Zellen. Viele Hsps sind molekulare Chaperone, die direkt mit denaturierten Proteinen interagieren, um sie rückzufalten oder dem Proteasom zuzuführen. Hsps sind deshalb auch in Alterungsprozessen von großer Bedeutung.

### **5.2.1 Auswirkungen proteasomaler Inhibition**

Um die Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf die Synthese von Hsps in Fibroblasten und Keratinocyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen MG132 behandelt. Die Analyse der Gesamtzelllysate ergab, dass Fibroblasten bei einer Behandlungsdauer von 24h ab einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 verstärkt die untersuchten Hitzeschockproteine Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27 und  $\alpha\text{B}$ -Crystallin synthetisieren (Abb. 11A). Eine Behandlung mit geringeren Konzentrationen führt nicht zu diesem Effekt. In Keratinocyten kann ab einer deutlich geringeren Konzentration (0,025  $\mu\text{M}$ ) bereits die Induktion von Hsp70 und Hsp40 nachgewiesen werden (Abb. 11B). Es ist nur eine leichte Induktion von Hsp27 und Hsp90 zu beobachten, eine Induktion von  $\alpha\text{B}$ -Crystallin erfolgt erst bei stärkerer Zellschädigung.

Zudem fiel auf, dass in Fibroblasten der endogene Level der sHsps Hsp27 und  $\alpha\text{B}$ -Crystallin höher ist als in Keratinocyten (Abb. 11). Für den in Abbildung 11 dargestellten Western Blot

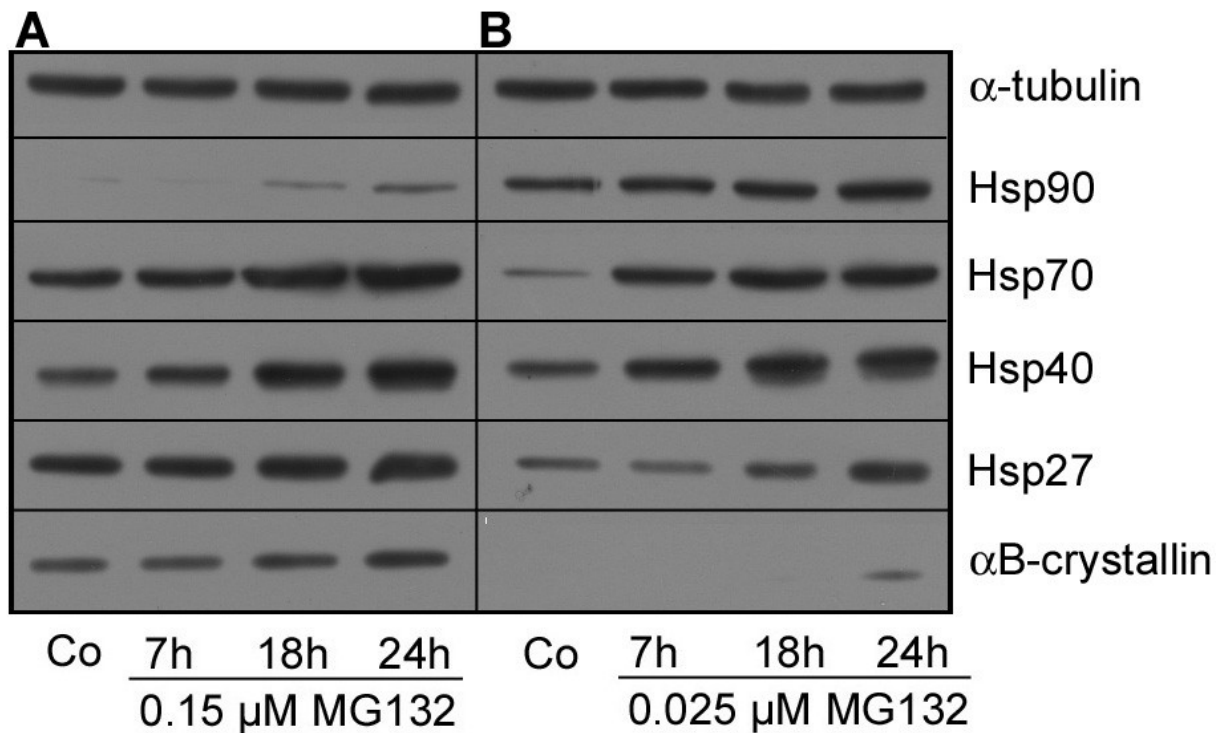
wurden für beide Zelltypen gleiche Proteinmengen aufgetragen und die Belichtungszeit war identisch.



**Abb. 11: Auswirkungen von MG132 auf die Induktion von Hsps in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe (A: 0,05 – 1,0  $\mu$ M; B: 0,01 - 0,05  $\mu$ M) für 24h mit MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Synthese der Hsps analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

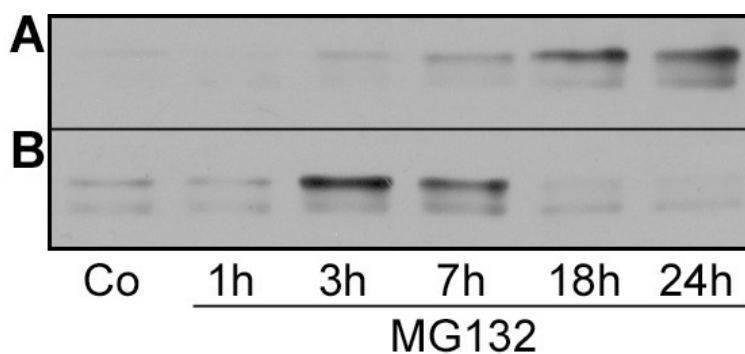
In einer Zeitreihe, in der Fibroblasten mit 0,15  $\mu$ M und Keratinocyten mit 0,025  $\mu$ M MG132 inkubiert wurden, ist die Induktion der Hsps in Fibroblasten nach 18 Stunden detektierbar (Abb. 12A), in Keratinocyten schon nach 7 Stunden (Abb. 12B).

Um sicherzustellen, dass die Induktion der Hsps durch MG132 mit der Aktivierung des HSF-1 und einer Hochregulation durch transkriptionelle Kontrolle einhergeht, wurde die Aktivierung von HSF-1 untersucht. In unbehandelten Zellen liegt HSF-1 als Monomer vor, das bei Stresseinwirkung hyperphosphoryliert und dann trimerisiert wird und an Hitzeschockelemente (HSEs) in den Promotorregionen der Hitzeschockgene bindet. Für die Analysen wurde ein Antikörper verwendet, der den an Serin 326 phosphorylierten HSF-1 erkennt.



**Abb. 12: Auswirkungen von MG132 auf die Induktion von Hsps in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Zeitreihe mit 0,15  $\mu\text{M}$  (A) oder 0,025  $\mu\text{M}$  (B) MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Synthese der Hsps analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Eine Aktivierung des HSF-1 ist in Fibroblasten erst nach 7h Behandlung mit 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 zu erkennen (Abb. 13A), in Keratinocyten bereits 3h nach Behandlung mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 (Abb. 13B). Die Aktivierung nimmt in Keratinocyten nach 7h wieder ab und ist nach 18 und 24h nicht mehr detektierbar (Abb. 13B). Die Aktivierung von HSF-1 erfolgt in Keratinocyten deutlich früher als in Fibroblasten, was die zeitnahe Induktion der Hsps durch MG132 in diesen Zellen im Vergleich zu Fibroblasten erklärt.



**Abb. 13: Auswirkungen von MG132 auf die Aktivierung des HSF-1 in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden zeitabhängig mit 0,15  $\mu\text{M}$  (A) oder 0,025  $\mu\text{M}$  (B) MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot auf eine Aktivierung des HSF-1 untersucht. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

### 5.2.2 Microarrayanalyse der Auswirkung von MG132 auf die Genexpression

Für eine Microarraystudie, die mit 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 behandelten Fibroblasten durchgeführt wurde, wurde zunächst die RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben und zugleich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die cDNA wurde mit DNA-Microarrays hybridisiert, wobei die markierten cDNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array binden. Die cDNA wurde auf insgesamt 12 Chips hybridisiert. Das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays wurde mittels eines Lasers ausgelesen und so die Aktivität ausgewählter Gene bestimmt. Die Fluoreszenzsignale wurden in numerische Daten umgewandelt. Wiesen Gene identische Fluoreszenz in der Kontrolle und der behandelten Probe auf, erhielten sie einen numerischen Wert von 1 und galten als nicht verändert reguliert. Gene, die Werte  $\geq 2$  erhielten, wurden als verstärkt exprimiert eingestuft. Werte  $\leq 0,5$  galten als reprimiert. Die Genexpression von 81 von 1275 Genen, die sich auf einem Chip befanden, wurde von MG132 beeinflusst. Davon wurden 32 Gene auf 70% der Chips unter Berücksichtigung der Signifikanzgrenzen reprimiert und 49 induziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl verschiedene Hsp-Gene durch proteasomale Inhibition verstärkt exprimiert werden (Tab. 10), als auch solche, die in Proteindegradationsprozesse involviert sind (Tab. 11). Zudem wird die Expression von Genen, die für Bestandteile der ECM kodieren, moduliert (Tab. 12).

Zu den durch MG132 verstärkt exprimierten Genen im Bereich der Hsps gehören Ubiquitin, Hsp10, das in den Mitochondrien mit Hsp60 als Chaperonin interagiert, Hsp27, Hsp32, Hsp47, das als Chaperon für Collagen dient, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und das cytosolische Protein HIP, das mit dem endogenen Hsc70 interagiert.

Die Proteine GRP75 und 78, deren Gene ebenfalls verstärkt exprimiert werden, gehören zu den Glucose-regulierten-Proteinen (GRPs). GRPs fungieren als Chaperone im Lumen des ER und der Mitochondrien und werden durch Glucosemangel und ER-Stress hochreguliert.

Hsp56 ist den Immunophilinen zuzuordnen. Sie spielen eine Rolle bei der Immunreaktion aber auch bei der Proteinfaltung und dem Transport von Proteinen. Hsp56 kann mit Hsp90 und Hsp70 assoziiert sein.

In dieser Microarraystudie, die es möglich machte, die Expression einer Vielzahl von hautrelevanten Genen gleichzeitig zu untersuchen, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass viele Gene der verschiedenen proteasomalen Untereinheiten nach Behandlung mit MG132 verstärkt exprimiert werden (Tab. 11).

<b>Hitzeschockproteine verstärkt exprimierte Gene</b>
Ubiquitin
Hsp10
Hsp27
Hsp32
Hsp47
Hsp56
Hsp60
Hsp70
GRP 75
GRP78
Hsp90
HIP

**Tab. 10: Einfluss von MG132 auf die Expression von Hsp-Genen.** Fibroblasten wurden für 7 oder 24h mit 0,15  $\mu$ M MG132 behandelt oder blieben unbehandelt. Die RNA der Zellen wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zugleich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays wurde mittels eines Lasers ausgelesen und die Aktivität der Hsp-Gene bestimmt.

Ein weiteres Protein, das dem Bereich der Proteindegradation zugeordnet werden kann, wird ebenso verstärkt exprimiert. Cathepsin L ist eine lysosomale Cystein-Protease, die eine große Anzahl von Proteinen hydrolysieren kann. Dazu gehören auch Collagen und Elastin.

Viele Gene, deren Produkte im Bereich der ECM eine Funktion besitzen, werden reprimiert (Tab. 12).

Die Ergebnisse der Microarraystudien insgesamt zeigen, dass MG132 in viele komplexe zelluläre Prozesse eingreift und so die zellulären Abläufe auf verschiedenen Arten modulieren kann.

**Tab. 11: Einflusses von MG132 auf die Expression von Genen, die bei Degradationsprozessen von Bedeutung sind.** Fibroblasten wurden für 7 oder 24h mit 0,15  $\mu$ M MG132 behandelt oder blieben unbehandelt. Die RNA der Zellen wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zugleich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays wurde mittels eines Lasers ausgelesen und die Aktivität der Gene, die an der Proteindegradation beteiligt sind, bestimmt.

<b>Proteindegradation</b>	
<b>verstärkt exprimierte Gene</b>	<b>reprimierte Gene</b>
PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE 5 PRECURSOR	ADAMTS1: A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN MOTIFS 1
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 11	ADAMTS6: A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN MOTIFS 6
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 6	
CATHEPSIN L PRECURSOR	
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 13	
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 2	
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 1	
PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 2	
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 12	
PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE 7 PRECURSOR	
26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 14	
26S PROTEASOME REGULATORY ATPASE SUBUNIT S10B	
PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE 4 PRECURSOR	
26S PROTEASOME REGULATORY ATPASE SUBUNIT 4	
26S PROTEASOME REGULATORY ATPASE SUBUNIT 8	
26S PROTEASOME REGULATORY ATPASE SUBUNIT 6B	

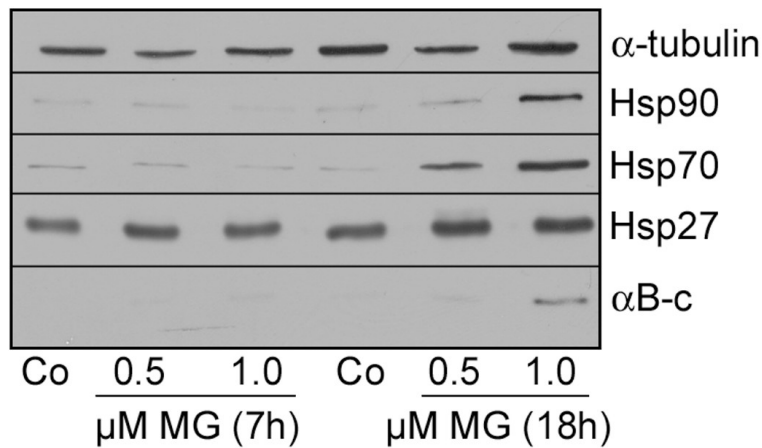


**Tab. 12: Einfluss von MG132 auf die Expression von Genen mit Funktionen im Bereich der ECM.** Fibroblasten wurden für 7 oder 24h mit 0,15  $\mu$ M MG132 behandelt oder blieben unbehandelt. Die RNA der Zellen wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zugleich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays wurde mittels eines Lasers ausgelesen und die Aktivität der Gene, die die ECM regulieren, bestimmt.

extrazelluläre Matrix	
verstärkt exprimierte Gene	reprimierte Gene
MATRIX METALLOPROTEINASE-3	LAMININ ALPHA-3 CHAIN PRECURSOR
	COLLAGEN ALPHA 1 CHAIN PRECURSOR
	DERMATOPONTIN PRECURSOR
	COLLAGEN ALPHA 2 CHAIN PRECURSOR.
	COL5A1 (PRO-ALPHA-1 TYPE V COLLAGEN)
	PCOLCE (PROCOLLAGEN C-PROTEINASE ENHANCER PROTEIN PRECURSOR)
	COL6A1
	CTGF (CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR PRECURSOR).
	MMP10 (MATRIX METALLOPROTEINASE-10)
	MMP14 Precursor
	BIGLYCAN
	FBLN1_4(FIBULIN-1 PRECURSOR)
	Thrombospondin 1
	CHM-1: (CHM-1) CHONDROMODULIN-I PRECURSOR (SMALL CARTILAGE-DERIVED GLYCOPROTEIN)
	ADAMTS1: A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN MOTIFS 1
	ADAMTS6: A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN MOTIFS 6

### 5.2.3 Auswirkungen von MG132 auf Hautmodelle

Um die Auswirkungen proteasomaler Inhibition auch im Gewebeverband und nicht nur in Monolayerkulturen zu charakterisieren, wurden Phenion<sup>®</sup>-Hautmodelle mit MG132 behandelt. Die Hautmodelle wurden für 7 oder 18h mit 0,5 oder 1  $\mu$ M MG132 behandelt. Ein Teil der Hautmodelle wurde in Rab-Puffer homogenisiert, mit 5xSB versetzt und im Western Blot auf das Vorkommen der Hsps analysiert. Nach einer Behandlungsdauer von 7h ist keine Induktion von Hsps zu erkennen. Diese setzt nach 18h Inkubation mit 0,5  $\mu$ M MG132 ein. Hsp70 und Hsp90 werden deutlich, Hsp27 leicht induziert (Abb. 14).  $\alpha$ B-Crystallin wird in den Hautmodellen erst nach 18h Inkubation mit 1  $\mu$ M MG132 induziert (Abb. 14).

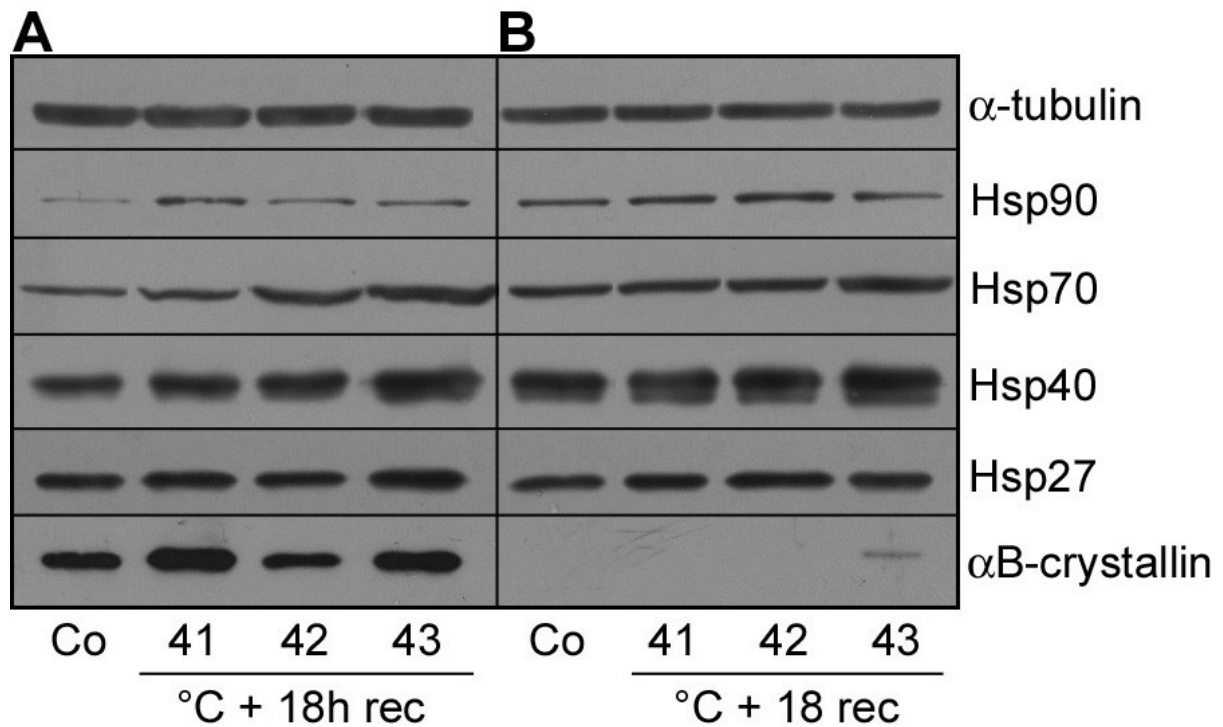


**Abb. 14: Auswirkungen von MG132 auf die Induktion von Hitzeschockproteinen in Hautmodellen.** Die Hautmodelle wurden für 7 oder 18h mit 0,5 oder 1,0 μM MG132 behandelt. Die Lysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Synthese der Hsps analysiert. α-Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 1

Die in der Zellkultur erzielten Ergebnisse konnten also in den Hautmodellen verifiziert werden. MG132 induziert die verstärkte Synthese von Hsps auch im Gewebeverband.

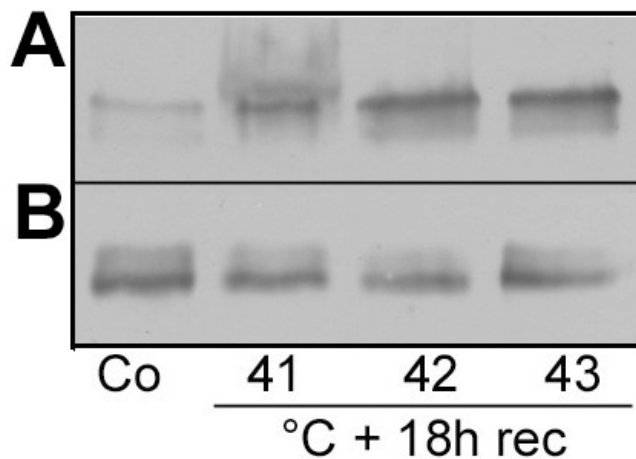
### 5.3 Induktion von Hitzeschockproteinen nach Hitzestress in Fibroblasten und Keratinocyten

Es konnte gezeigt werden, dass Keratinocyten bei Behandlung mit deutlich geringeren Konzentrationen MG132 Hsps induzieren als Fibroblasten. Um die Frage zu klären, ob eine Stressantwort in Form von Induktion der Hsps in Keratinocyten grundsätzlich schneller erfolgt als in Fibroblasten, wurden beide Zelltypen einem 30minütigen Hitzestress im Temperaturbereich von 41 bis 43 °C ausgesetzt. Nach einer Erholungsphase von 18h bei 37 °C wurde die Synthese von Hsps im ECL-Western Blot untersucht. Fibroblasten synthetisieren verstärkt die Hsps Hsp70, Hsp40, Hsp27 und αB-Crystallin nach einem Hitzestress von 42 - 43 °C (Abb. 15A). In Keratinocyten ist keine eindeutige Induktion der meisten Hsps zu erkennen. Hsp70 und αB-Crystallin werden nach einem Temperaturstress von 43 °C leicht induziert (Abb. 15B).



**Abb. 15: Auswirkung von Hitzestress auf die Synthese von Hitzeschockproteinen in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 30 Minuten Temperaturen von 41 bis 43 °C ausgesetzt. Nach einer Erholungszeit von 18h bei 37 °C wurden die Gesamtzelllysate mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Synthese der Hsps analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Bei einem Temperaturstress stellt sich die Stressantwort von Fibroblasten und Keratinocyten anders dar als im Falle von proteasomaler Inhibition. Fibroblasten induzieren nach Hitzestress Hsps. Keratinocyten reagieren relativ unempfindlich. Diese Beobachtung wird noch durch die Analyse der Aktivierung des HSF-1 untermauert. Abb. 16A zeigt eine Aktivierung des HSF-1 nach Hitzeeinwirkung in Fibroblasten. In Keratinocyten ist keine Aktivierung zu erkennen (Abb. 16B). Es ist aber nicht auszuschließen, dass Keratinocyten nach einem Hitzestress Hsps induzieren. Möglicherweise sind die Parameter bei diesen Zellen für einen Nachweis einer verstärkten Hsp-Synthese anders zu wählen (höhere Temperaturen, kürzere Erholungsphasen).



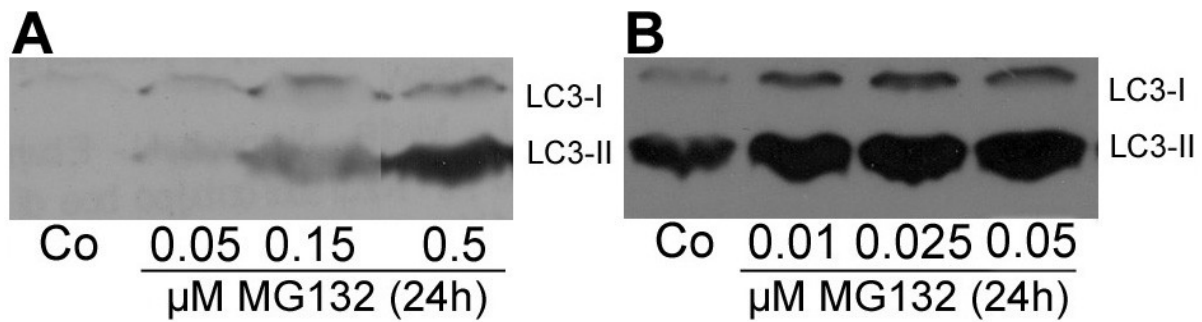
**Abb. 16: Aktivierung von HSF-1 nach Hitzestress in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 30 Minuten Temperaturen von 41 - 43 °C ausgesetzt. Nach einer Erholungszeit von 18h bei 37 °C wurden die Gesamtzelllysate mittels ECL-Westernblot auf die Aktivierung von HSF-1 analysiert. Hierfür wurde ein Antikörper gegen aktivierten HSF-1 (pSer326) verwendet. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

#### 5.4 Makroautophagie und proteasomale Inhibition in Fibroblasten und Keratinocyten

Die Induktion von Autophagie gehört neben der Induktion von Hsps zu den Überlebenstrategien von Zellen und spielt auch bei Alterungsprozessen eine Rolle.

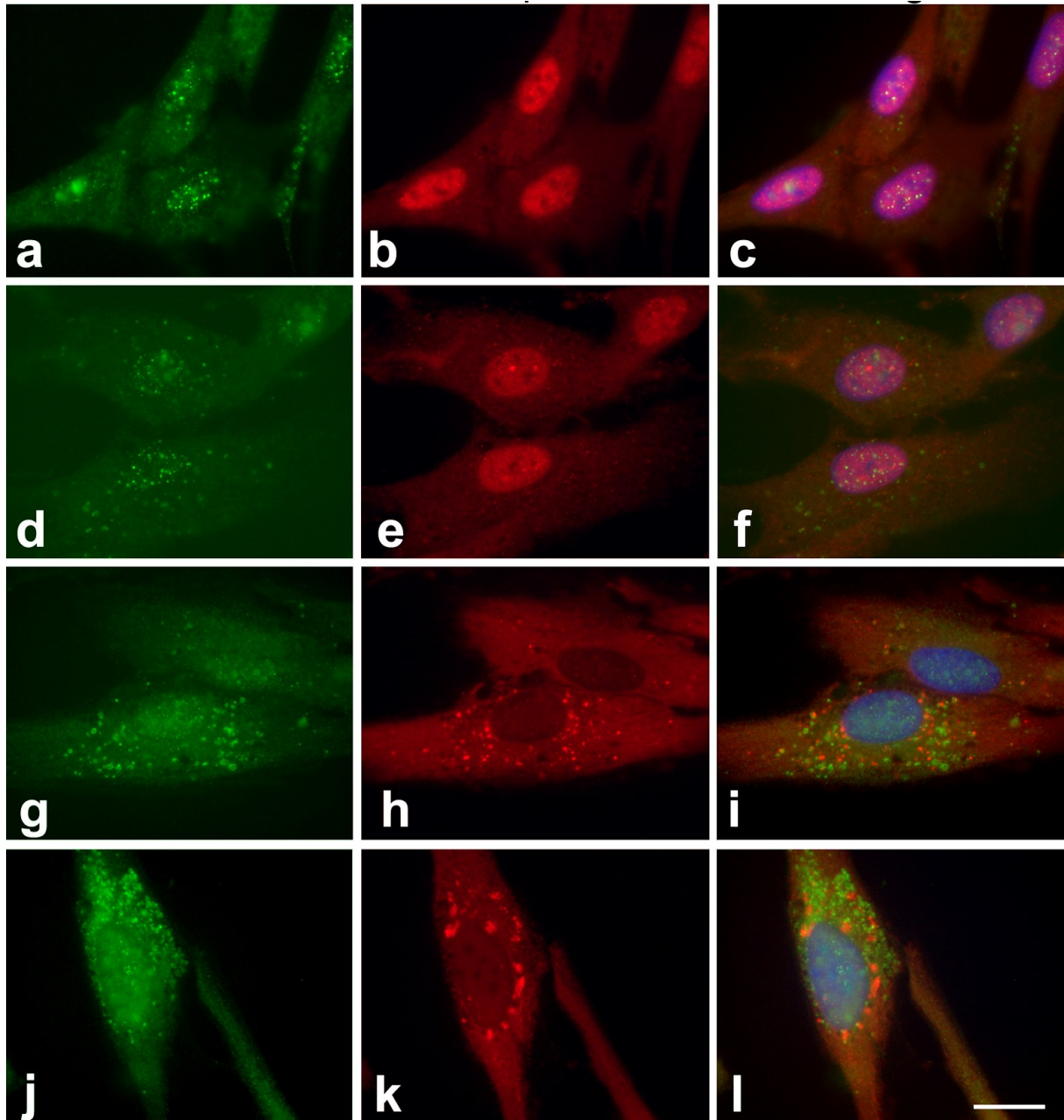
Es ist möglich, eine Induktion von MA mit Hilfe eines Antikörpers gegen LC3 im Western Blot zu untersuchen. Die zwei Formen des LC3-Proteins, LC3-I und -II, können mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dabei wandert LC3-II trotz des größeren Molekulargewichts schneller als LC3-I durch das Gel, da es stark hydrophob ist. Die LC3-I-Bande wird bei etwa 16 kDa detektiert, LC3-II bei etwa 14 kDa. Die Menge des LC3-II korreliert mit der Menge der Autophagosomen, da es Phosphatidylethanolamin-konjugiert und in der Membran von Autophagosomen lokalisiert ist.

Nach Behandlung von Fibroblasten und Keratinocyten mit MG132 ist in beiden Zelltypen eine deutliche konzentrationsabhängige Akkumulation von LC3-II zu erkennen. LC3-II kann in Fibroblasten nach Behandlung mit 0,15 µM MG132 (24h) bereits stärker als in den Kontrollen detektiert werden und nimmt bis zu einer Konzentration von 1,0 µM noch weiter zu (Abb. 17A). Ein ähnliches Bild stellt sich in den Keratinocyten dar, hier ist eine Zunahme von LC3-II bereits ab 0,01 µM MG132 zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Keratinocyten auf sehr geringe Konzentrationen von MG132 mit einer Induktion von MA reagieren.



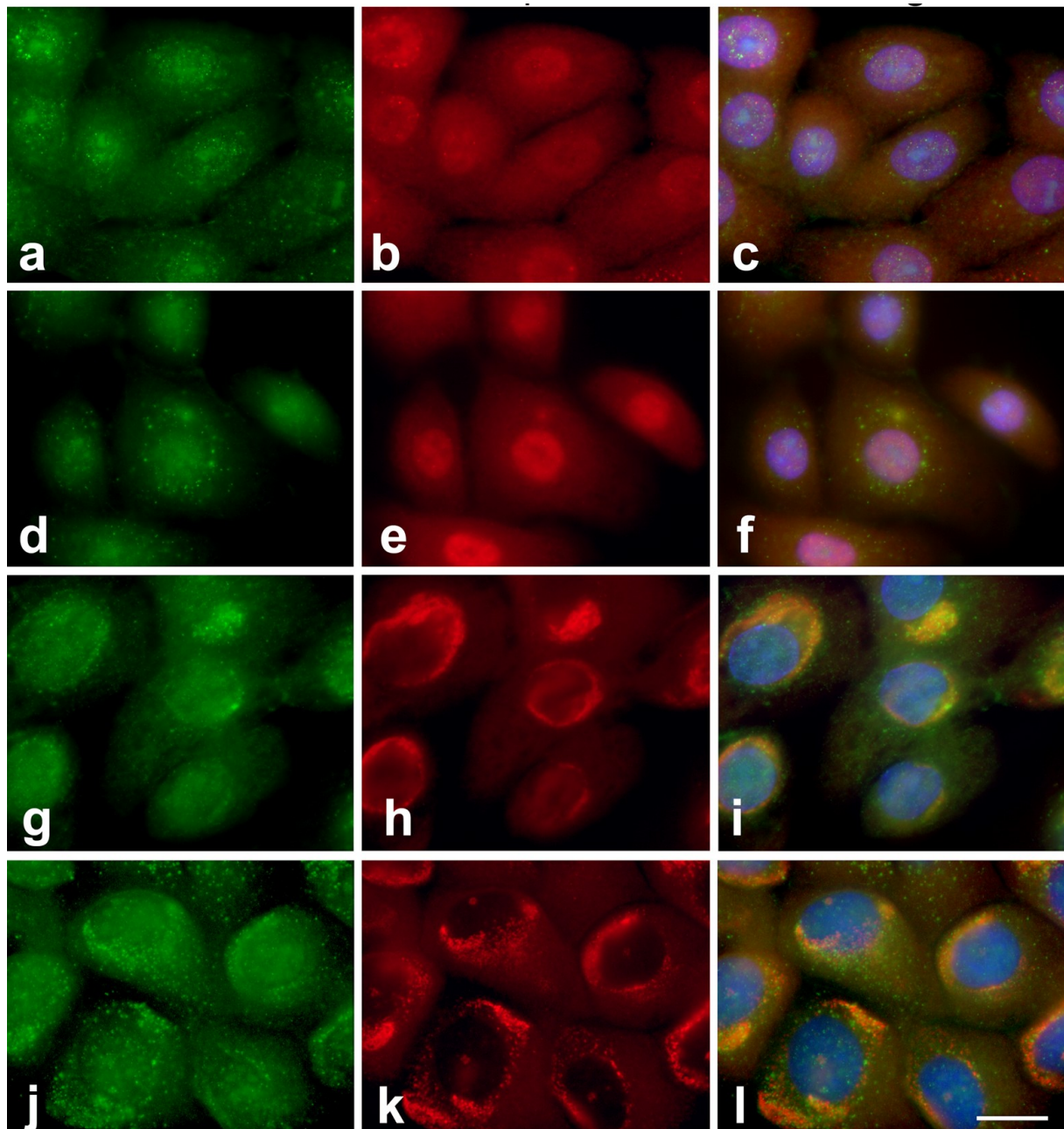
**Abb. 17: Induktion von MA nach proteasomaler Inhibition in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe (A: 0,05 – 0,5  $\mu\text{M}$ ; B: 0,01 - 0,05  $\mu\text{M}$ ) für 24h mit MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot und einem Antikörper gegen LC3 auf Induktion von MA untersucht. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Die Induktion von MA durch MG132 wurde zudem mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Antikörpers gegen LC3 untersucht, der die Autophagosomen als punktuelle Strukturen sichtbar macht. Parallel zur Detektion von Autophagosomen erfolgte die Detektion Ubiquitin-positiver Aggregate in den Zellen mit einem Antikörper gegen Ubiquitin. In Fibroblasten sind Autophagosomen unter Kontrollbedingungen am Kern lokalisiert. Behandlung mit MG132 führt ab einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 zu einer Zunahme der Autophagosomen, die nun auch vermehrt im Cytosol lokalisiert sind (Abb. 18). In Keratinocyten ist eine leichte Zunahme der Autophagosomen im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  MG132 zu erkennen, die bei steigenden Konzentrationen noch eindeutiger sichtbar wird. (Abb. 19). Die im Western Blot beobachtete Induktion von MA konnte mittels immunocytochemischer Detektion der Autophagosomen bestätigt werden. Sowohl in Fibroblasten als auch in Keratinocyten bilden sich nach proteasomaler Inhibition Ubiquitin-positive Proteinablagerungen. In Keratinocyten sind Ubiquitin-positive aggresomenartige Strukturen ab einer Konzentration von 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 zu detektieren (Abb. 19). Eine Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 führt in Fibroblasten zu ähnlichen cytotoxischen Effekten (siehe 5.1.1), Aggresomen sind bei dieser Konzentration aber noch nicht zu erkennen, lediglich Ubiquitin-positive Aggregate im Cytoplasma der Zellen (Abb. 18). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die größere Empfindlichkeit von Keratinocyten gegenüber MG132, die sich in einer schnelleren Ausbildung von Aggresomen äußert. In Keratinocyten sind Autophagosomen in den aggresomenartigen Strukturen zu detektieren (Abb. 19). Dies weist darauf hin, dass ubiquitinierte Proteine über MA abgebaut werden können. Eine Kollokalisierung von LC3-II und Ubiquitin ist in den Fibroblasten nicht eindeutig erkennbar (Abb. 18).



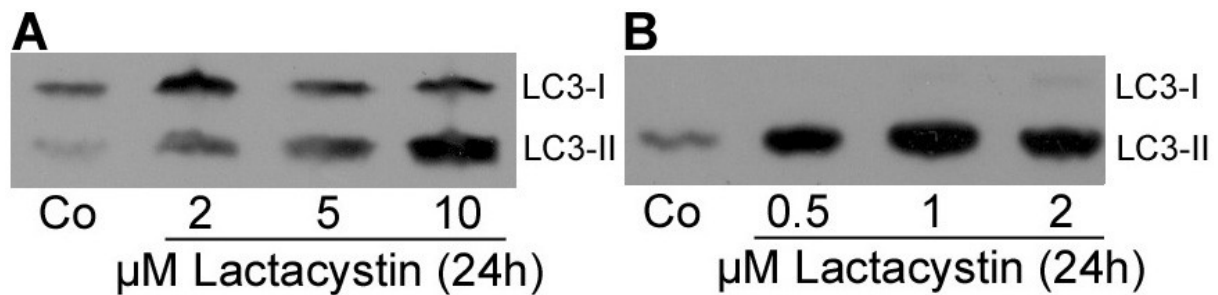
**Abb. 18: Immunocytochemische Analyse der Akkumulation von Autophagosomen nach proteasomaler Inhibition in Fibroblasten.** Die Zellen waren entweder unbehandelt (a, b, c) oder wurden 24h mit 0,025  $\mu\text{M}$  (d, e, f), 0,15  $\mu\text{M}$  (g, h, i) oder 1  $\mu\text{M}$  (j, k, l) MG132 behandelt, mit MeOH fixiert und einem Antikörper gegen LC3 (a, d, g, j) und Ubiquitin (b, e, h, k) inkubiert. Der Overlay wurde mit DAPI dargestellt (c, f, i, l). Messbalken = 10  $\mu\text{m}$ . n = 3





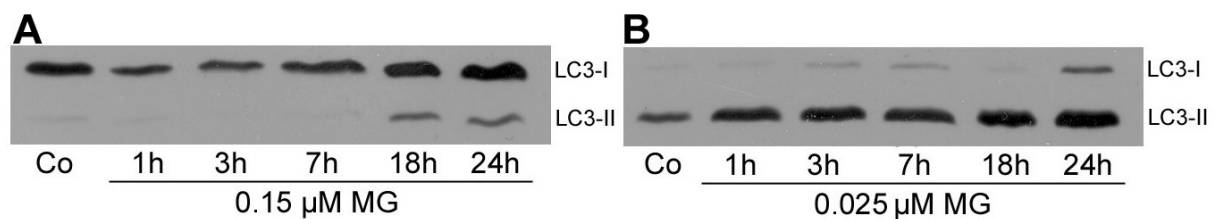
**Abb. 19: Immunocytochemische Analyse der Akkumulation von Autophagosomen nach proteasomaler Inhibition in Keratinocyten.** Die Zellen waren entweder unbehandelt (a, b, c) oder wurden 24h mit 0,01  $\mu\text{M}$  (d, e, f), 0,025  $\mu\text{M}$  (g, h, i) oder 0,05  $\mu\text{M}$  (j, k, l) MG132 behandelt, mit MeOH fixiert und einem Antikörper gegen LC3 (a, d, g, j) und Ubiquitin (b, e, h, k) inkubiert. Der Overlay wurde mit DAPI dargestellt (c, f, i, l). Messbalken = 10  $\mu\text{m}$ . n = 3

MG132 kann auch unspezifisch und konzentrationsabhängig lysosomale Cathepsine hemmen. Auch aus diesem Grund könnte eine Akkumulation von LC3-II stattfinden. Um dies auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch der spezifische Proteasomen-Inhibitor Lactacystin eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass proteasomale Hemmung tatsächlich zur Induktion von MA führt (Abb. 20).



**Abb. 20: Induktion von MA durch Lactacystin in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Konzentrationsreihe für 24h mit Lactacystin (A: 2 - 10 μM; B: 0,5 - 2 μM) behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot und einem Antikörper gegen LC3 auf Induktion von MA untersucht. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Eine Induktion von MA ist nach 24stündiger Behandlung mit 0,15 μM in Fibroblasten und 0,025 μM MG132 in Keratinocyten nachzuweisen. Bei diesen Konzentrationen werden in den Zellen auch Hsps induziert. Eine zeitabhängige Analyse von MA unter diesen Bedingungen zeigt, dass dieser Mechanismus in Fibroblasten erst nach 18h induziert wird (Abb. 21A), in Keratinocyten hingegen schon nach einstündiger Inkubation mit MG132 (Abb. 21B).



**Abb. 21: Auswirkungen von MG132 auf die zeitliche Induktion von MA in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Zeitreihe mit 0,15 (A) bzw. 0,025 μM (B) MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot und einem Antikörper gegen LC3 auf Induktion von MA untersucht. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

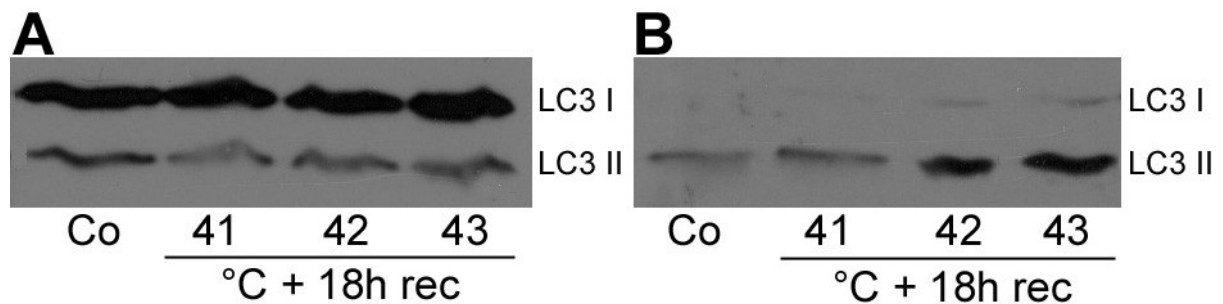
Die Ergebnisse zeigen, dass in Keratinocyten MA bei geringeren Konzentrationen von MG132 und auch zu einem früheren Zeitpunkt nach Zugabe induziert wird, als in Fibroblasten. Dies unterstützt den Befund, dass Keratinocyten weitaus sensitiver auf proteasomale Inhibition reagieren.

## 5.5 Induktion von Autophagie nach Hitzestress

Um die Frage zu klären, ob Hitzestress zur Induktion der MA führt und diese in Keratinocyten grundsätzlich schneller erfolgt als in Fibroblasten, wurden beide Zelltypen einem 30minütigen Hitzestress im Temperaturbereich von 41 bis 43 °C ausgesetzt. Nach einer Erholungsphase von 18h bei 37 °C wurde die Induktion von MA im ECL-Western Blot untersucht. Immunoblotanalysen von Gesamtzelllysaten ergaben, dass Fibroblasten nach



Hitzeeinwirkung in diesem Temperaturbereich keine Akkumulation von LC3-II aufweisen (Abb. 22A). In Keratinocyten hingegen wird nach 42 und 43 °C MA induziert (Abb. 22B).



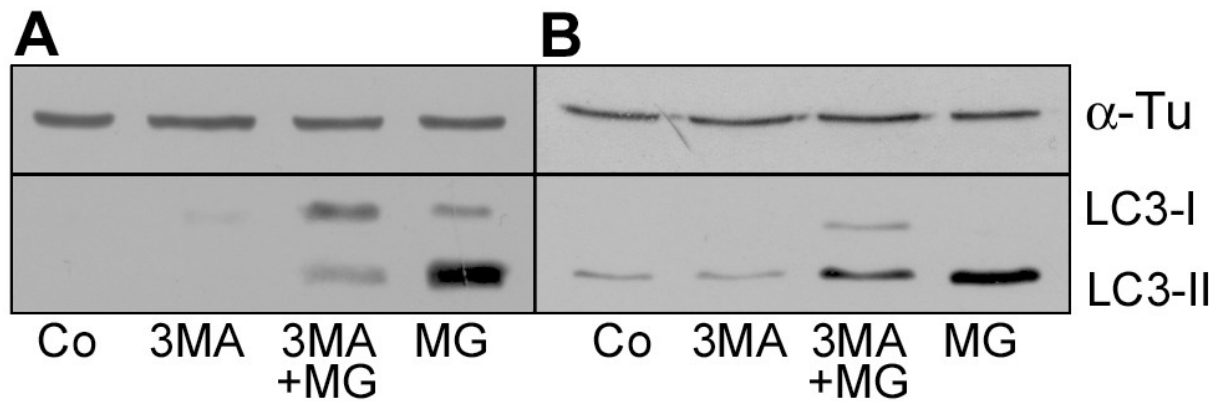
**Abb. 22: Hitzestress und MA in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 30 Minuten Temperaturen von 41, 42 oder 43 °C ausgesetzt. Anschließend folgte eine Erholungsphase von 18h bei 37 °C. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot und einem Antikörper gegen LC3 auf Induktion von MA untersucht. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Keratinocyten der Mechanismus der MA ein protektiver Mechanismus ist, der in Fibroblasten nicht so leicht induziert wird, da diese Zellen durch die Induktion von Hsps vor den Folgen eines Temperaturstress geschützt sind.

## 5.6 Wirkungen von 3-Methyladenin, einem Inhibitor der MA, auf Fibroblasten und Keratinocyten

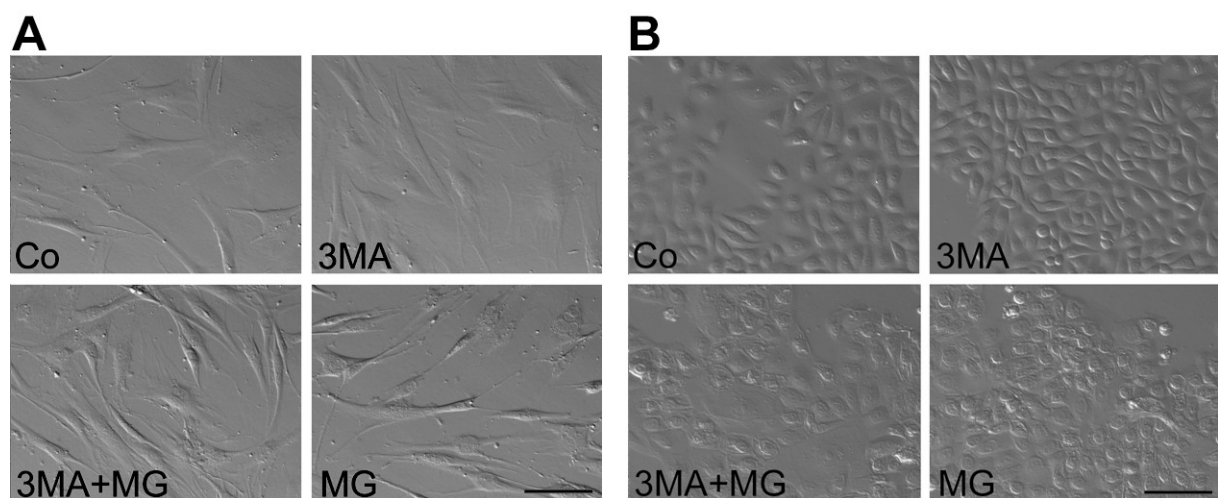
Proteasomale Inhibition führt in Fibroblasten und Keratinocyten zur Induktion von MA, was die Hypothese unterstützt, dass das UPS und das lysosomale System funktionell gekoppelt sind. Um die Rolle der MA im Zusammenhang mit dem UPS zu klären, wurden die Zellen mit 3-Methyladenin (3-MA), einem Inhibitor der MA, inkubiert.

Beide Zelltypen wurden für 24h mit 5 mM 3-MA oder mit 3-MA plus MG132 behandelt. Als Positivkontrolle für die Induktion von MA dienten mit MG132 behandelte Zellen (24h). Immunoblot-Analysen der Zelllysate zeigen, dass 3-MA die Induktion von MA durch proteasomalen Stress in beiden Zelltypen inhibiert (Abb. 23A und B).



**Abb. 23: Nachweis der Inhibition von MA durch 3-MA in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 24h mit 5 mM 3-MA (3MA), 1,0 bzw. 0,05  $\mu$ M MG132 als Positivkontrolle oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Die Induktion bzw. Inhibition von MA wurde mittels eines Antikörpers gegen LC3 untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (Co). n = 3

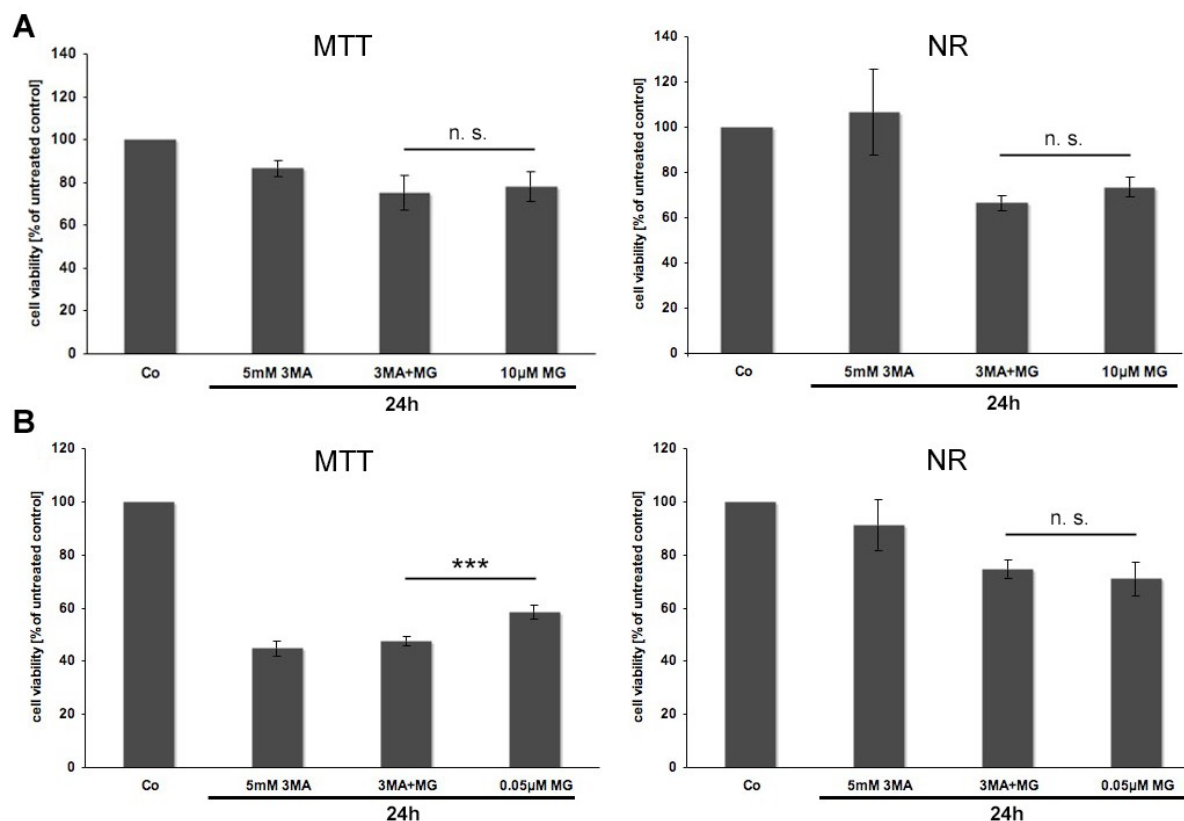
Die morphologischen Analysen zeigen, dass Fibroblasten und Keratinocyten nach alleiniger Zugabe von 3-MA keine Veränderungen ihrer Morphologie aufweisen (Abb. 24). Die Behandlung mit MG132 ruft in Fibroblasten und Keratinocyten die schon beschriebenen morphologischen Schädigungen hervor, in Fibroblasten erscheinen nach Behandlung von mit 3-MA plus MG132 diese Schädigungen weniger stark (Abb. 24A). Die Ausläufer ziehen sich nicht so stark zurück und die Zellen erscheinen weiter ausgebreitet. In Keratinocyten ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Sie weisen nach Behandlung mit MG132 sowie nach Behandlung mit MG132 plus 3-MA gleiche morphologische Veränderungen auf (Abb. 24B). Die Zellen flachen im Bereich des Zellkerns stark ab und lösen sich teilweise vom Schalenboden.



**Abb. 24: Morphologische Veränderungen von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach Inhibition von MA.** Die Zellen wurden für 24h mit 5 mM 3-MA (3MA), 1,0 bzw. 0,05  $\mu$ M MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Morphologische Veränderungen wurden mit dem HMK dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (Co). Messbalken = 50  $\mu$ m. n = 3

Die morphologischen Analysen lassen den Schluss zu, dass die Inhibition von MA bei proteasomalem Stress in Fibroblasten protektiv wirken kann. Möglicherweise wird durch MG132 induzierte Apoptose in diesen Zellen verhindert.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Cytotoxizitätsassays durchgeführt und apoptotische Prozesse analysiert. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und nach 24h MTT- und Neutralrottests durchgeführt.



**Abb. 25: Bestimmung der Zellviabilität von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach Behandlung mit 3-MA mittels MTT- und Neutralrot-Assay (NR).** Fibroblasten und Keratinocyten wurden mit 5 mM 3-MA (3MA), 10  $\mu$ M (A) bzw. 0,05  $\mu$ M (B) MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Nach 24h wurden der MTT- und Neutralrot-Assay durchgeführt. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

3-MA allein führt in Fibroblasten nur zu einer sehr geringen im MTT-Test messbaren Cytotoxizität, während im Neutralrot-Test keine Cytotoxizität messbar ist (Abb. 25A).

Wurde MG132 für 24h in niedrigen Konzentrationen eingesetzt (0,15 – 1  $\mu$ M), trat in Fibroblasten nur eine geringe mittels MTT- und Neutralrot-Assay messbare Zellschädigung ein und ein Unterschied in der Viabilität der Zellen nach MG132 oder MG132 plus 3-MA konnte nicht gemessen werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde eine hohe Konzentration

MG132 (10  $\mu$ M) eingesetzt, doch auch in diesem Konzentrationsbereich war kein Effekt durch 3-MA ersichtlich (Abb. 25A).

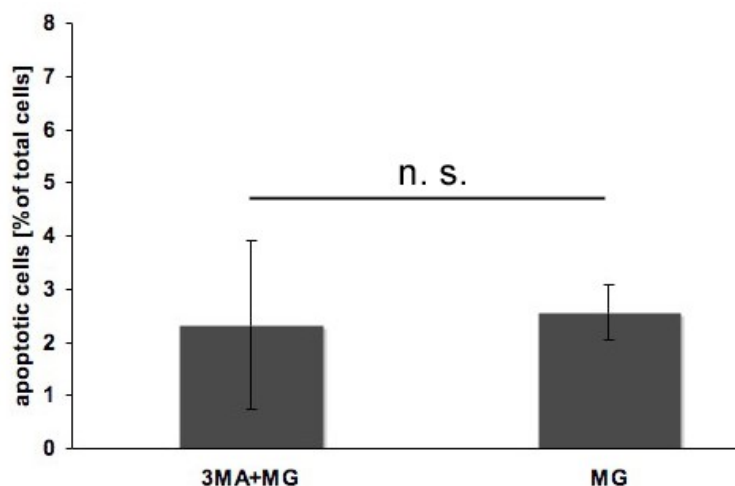
Die Untersuchungen mit Keratinocyten führen im MTT- und Neutralrotassay zu unterschiedlichen Ergebnissen. Im MTT-Test sinkt die Viabilität der Keratinocyten nach 3-MA allein auf etwa 50% (Abb. 25B). Im Neutralrot-Test ist dieser Effekt nicht ersichtlich (Abb. 25B). Zudem scheint laut MTT-Test die Inhibition der MA bei gleichzeitiger proteasomaler Inhibition die Viabilität der Zellen negativ zu beeinflussen, sie sinkt auf 45%. Nach alleiniger Behandlung mit MG132 liegt sie bei etwa 60% (Abb. 25B). Im Neutralrot-Test kommt es zu keinem messbaren Unterschied (Abb. 25B).

3-MA wirkt sich in Keratinocyten im Gegensatz zu Fibroblasten also stark auf den mitochondrialen Metabolismus der Zellen aus. Die Membranintegrität wird in beiden Zelltypen insgesamt wenig beeinflusst. Eine synergistische Schädigung wird in diesem Zusammenhang nicht beobachtet.

### 5.6.1 Einfluss von 3-Methyladenin auf Apoptose

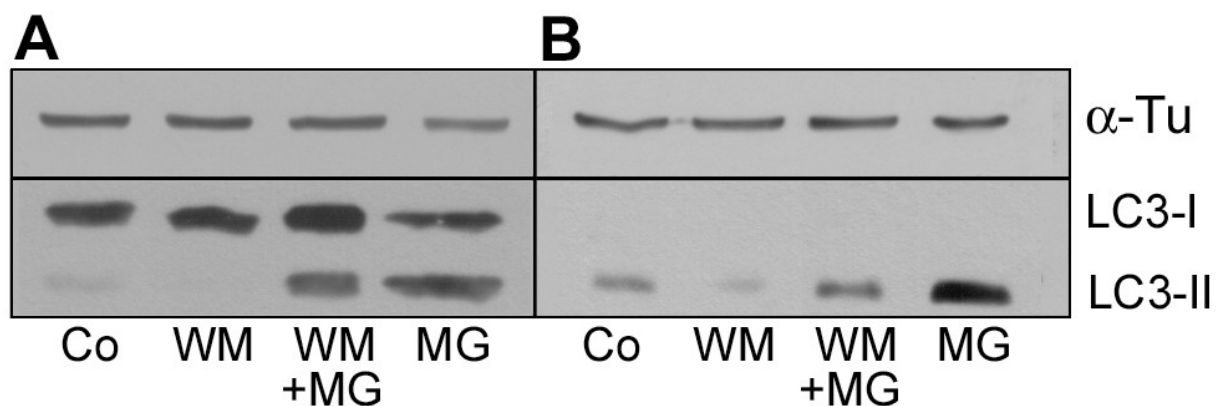
Um apoptotische Prozesse in den Zellen nachzuweisen, wurde ein Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 verwendet, und Caspase-3-positive Zellen detektiert und quantitativ ermittelt.

In Fibroblasten kam es zu keiner Einleitung von Apoptose. Es konnten keine Caspase-3-positiven Fibroblasten detektiert werden (nicht gezeigt). Unter den behandelten Keratinocyten waren nur wenige Zellen apoptotisch und es wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit MG132 oder MG132 plus 3-MA festgestellt (Abb. 26). 3-MA wirkt sich zwar auf die mitochondriale Aktivität aus, führt jedoch nicht zur Apoptose.



**Abb. 26: Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit MG132 und nach Inhibition der MA nach proteasomaler Inhibition in Keratinocyten.** Die Zellen wurden für 24h mit 5 mM 3-MA (3MA), in Kombination mit 0,05 $\mu$ M MG132 oder nur mit 0,05  $\mu$ M MG132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert und apoptotische Zellen mittels eines Antikörpers gegen Caspase 3 ermittelt. n = 3

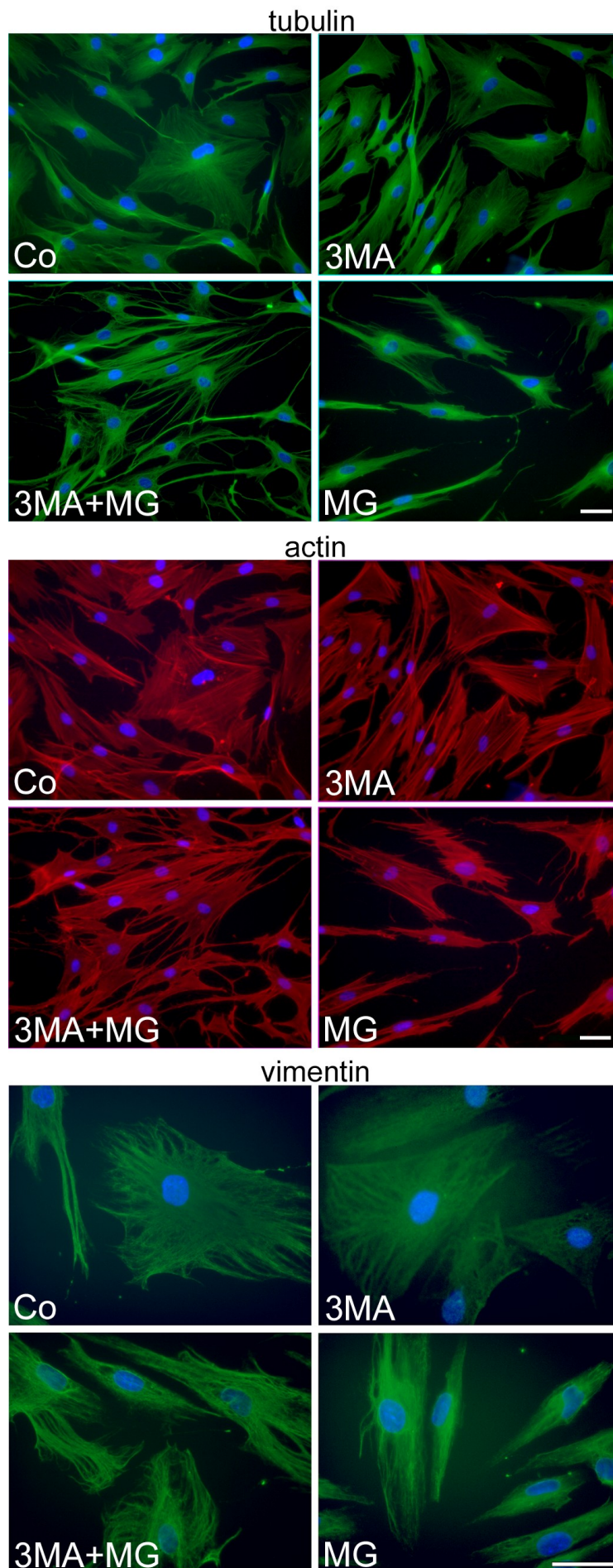
Da mit Hilfe der Cytotoxizitätsassays keine protektive Wirkung von 3-MA in Fibroblasten bei proteasomaler Inhibition nachgewiesen werden konnte, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob der beobachtete Effekt auf die Morphologie tatsächlich auf die Inhibition der MG132-induzierten MA zurückzuführen ist, oder möglicherweise auf Effekte, die die Substanz 3-MA an sich erzeugt. Hierfür wurden die Versuche mit dem MA-Inhibitor Wortmannin wiederholt. Abbildung 27 zeigt, dass auch Wortmannin die MG132-induzierte MA sowohl in Fibroblasten als auch in Keratinocyten inhibiert. Die durch 3-MA erzeugte Wirkung auf die Morphologie der Fibroblasten konnte mittels Wortmannin jedoch nicht verifiziert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 27: Nachweis der Inhibition von MA durch Wortmannin in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 24h mit 5  $\mu$ M Wortmannin (WM), 1,0 bzw. 0,05  $\mu$ M MG132 als Positivkontrolle oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Die Induktion bzw. Inhibition von MA wurde mittels eines Antikörpers gegen LC3 untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). n = 3

### 5.6.2 Einfluss von 3-Methyladenin auf das Cytoskelett

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob 3-MA die Architektur des Cytoskeletts in Fibroblasten verändert und Immunfluoreszenzstudien zur Untersuchung des Mikrotubulinnetzwerkes, des Actin- und des Vimentin-Cytoskeletts durchgeführt. Dabei zeigt 3-MA weder einen Effekt auf die Actinfilamente, noch auf das Mikrotubuli-Netzwerk oder die Intermediärfilamente (Abb. 28). Es wird zwar auch hier deutlich, dass Fibroblasten nach Behandlung mit 3-MA plus MG132 eine weniger geschädigt erscheinende Morphologie aufweisen als nach MG132 allein, trotzdem kann aufgrund dieser Studien kein Rückschluss auf eine stabilisierende Funktion von 3-MA auf das Cytoskelett von Fibroblasten getroffen werden.



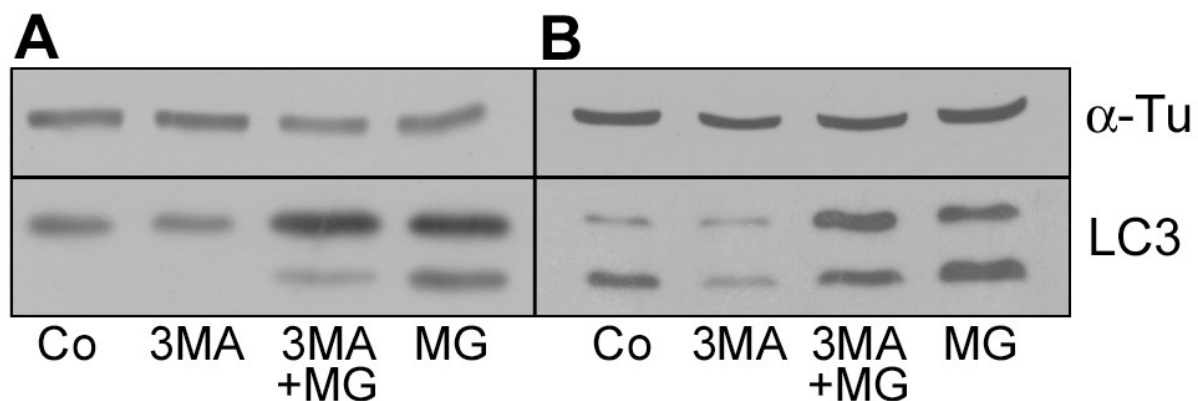
**Abb. 28: Auswirkungen der Inhibition von MA durch 3-MA auf das Cytoskelett von Fibroblasten.** Die Zellen wurden für 24h mit 5 mM 3-MA, 1,0  $\mu$ M MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Das Tubulin- und Vimentin-Cytoskelett wurde mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin und Vimentin detektiert, das Actin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC und die Zellkerne mit DAPI. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). Messbalken = 25  $\mu$ m. n = 3



### 5.6.3 Langzeitwirkung von 3-Methyladenin

Da unter den bisherigen Bedingungen weder ein protektiver noch ein negativer Effekt der Inhibition der MA in Fibroblasten und Keratinocyten eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde die Behandlungsdauer auf 48h erhöht. Möglicherweise wird durch eine längerfristige Inhibition von MA ihre Funktion deutlicher.

Auch nach 48h führt 3-MA in Fibroblasten und Keratinocyten zu einer Abnahme der MG132-induzierten MA. Dies konnte mittels ECL-Western Blot gezeigt werden (Abb. 29A und B).

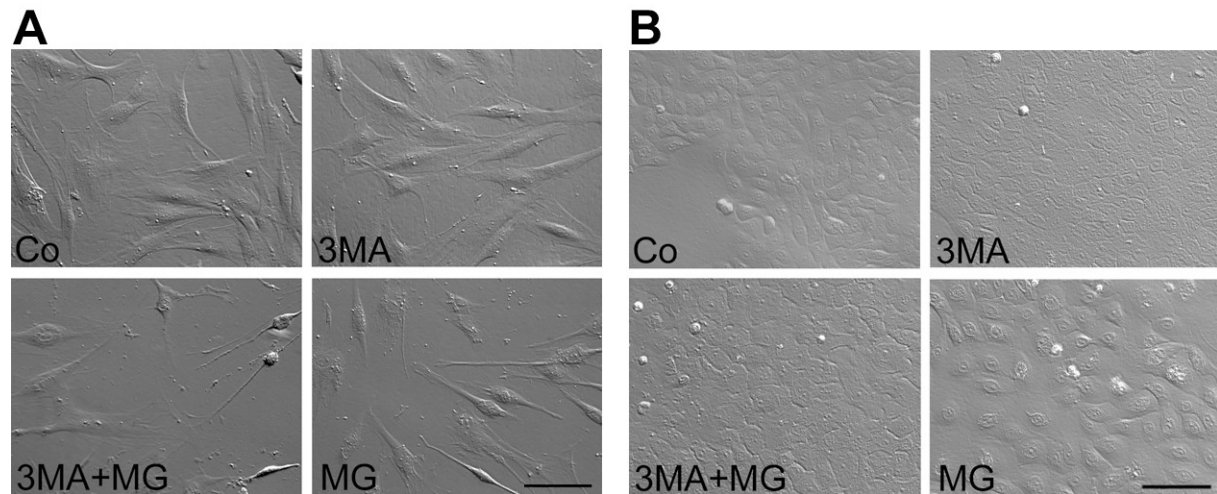


**Abb. 29: Langzeitwirkung von 3-MA auf Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 48h mit 5 mM 3-MA (3MA), 1,0  $\mu$ M (A) bzw. 0,05  $\mu$ M (B) MG132 als Positivkontrolle oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Die Induktion bzw. Inhibition von MA wurde mittels eines Antikörpers gegen LC3 untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). n = 3

Morphologisch reagieren Fibroblasten und Keratinocyten nach 48h unterschiedlich auf 3-MA. Fibroblasten weisen nach alleiniger Zugabe von 3-MA keine Veränderungen ihrer Morphologie auf (Abb. 30A), während Keratinocyten sich stark abflachen (Abb. 30B). Diese starke Abflachung der Zellen ist auch nach Behandlung mit 3-MA plus MG132 zu beobachten (Abb. 30B). Ob die Keratinocyten unter diesen Bedingungen stärker geschädigt sind als nach alleiniger Applikation von MG132, ist anhand der Morphologie nicht auszumachen (Abb. 30A). Morphologisch ist nach 48h in Fibroblasten kein Unterschied zwischen der Behandlung mit MG132 plus 3-MA und der alleinigen Behandlung mit MG132 festzustellen.

3-MA inhibiert die PI3-Kinasen der Klasse III nicht spezifisch, sondern kann auch auf die anderen Klassen der PI3-Kinasen inhibitorisch wirken. Ito et al. (2007) konnten in HT1080-Zellen eine Inhibition der PI3-Kinasen der Klassen I, II und III durch 3-MA zeigen. Zudem war in diesen Zellen die Ausbildung von Lamellipodien und Membran Ruffles eingeschränkt, was zu einer Inhibition der Zellmigration führte. Um die im Rahmen dieser Arbeit

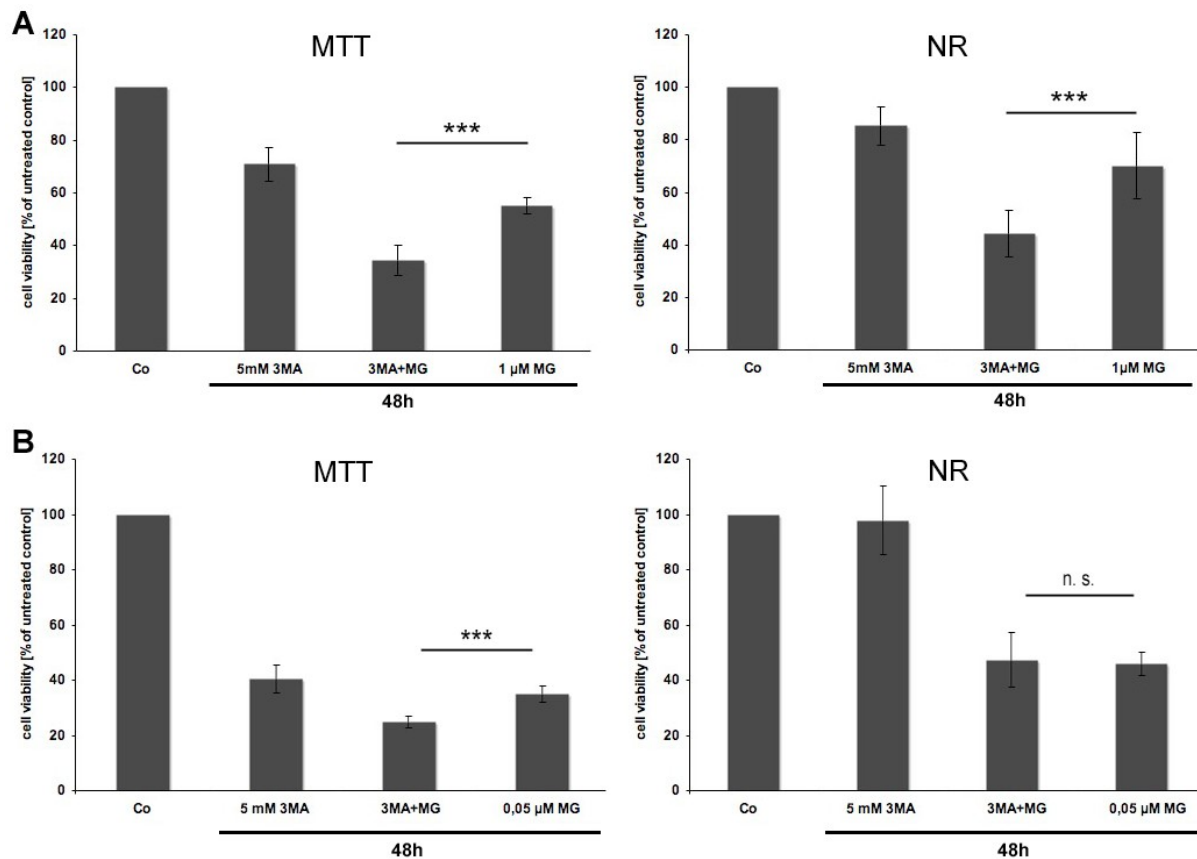
beobachteten Effekte von 3-MA auf die Morphologie der Fibroblasten erklären zu können, müsste weiter untersucht werden, welchen Einfluss 3-MA auf Zell-Zell-Interaktionen oder die Zelladhäsion hat.



**Abb. 30: Morphologische Veränderungen von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach 48-stündiger Behandlung mit 3-MA.** Die Zellen wurden für 48h mit 5 mM 3-MA, 1,0 bzw. 0,05  $\mu$ M MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Morphologische Veränderungen wurden mit dem HMK dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (Co). Messbalken = 50  $\mu$ m. n = 3

Um einen Effekt dieser längerfristigen Behandlung auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurden wiederum MTT- und Neutralrot-Tests durchgeführt. Nach einer Behandlungsdauer von 48h sinkt die Viabilität der Fibroblasten signifikant, wenn die durch MG132 induzierte MA inhibiert wird. Dieses Ergebnis zeigt sich im MTT- sowie im Neutralrot-Test (Abb. 31A). Zu diesem Zeitpunkt ist zudem ein Einfluss von 3-MA auf die mitochondriale Aktivität der Fibroblasten erkennbar (Abb. 31A). 3-MA wirkt sich allerdings in Fibroblasten nicht so stark auf die metabolische Aktivität der Mitochondrien aus wie in Keratinocyten (Abb. 31B).



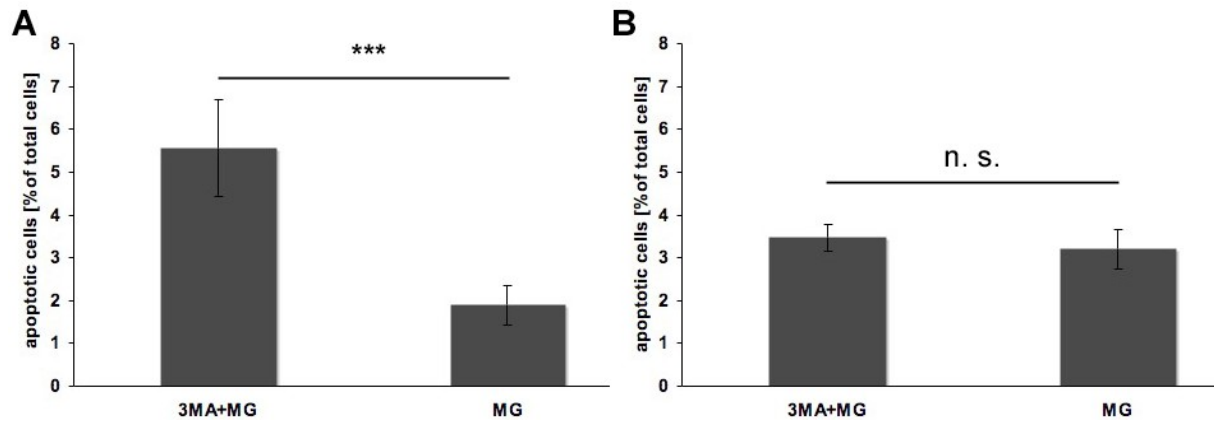


**Abb. 31: Bestimmung der Zellviabilität von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach 48-stündiger Behandlung mit 3-MA mittels MTT- und Neutralrot-Assay (NR).** Fibroblasten und Keratinocyten wurden mit 5 mM 3-MA (3MA), 10 μM (A) bzw. 0,05 μM (B) MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Nach 48h wurden der MTT- und Neutralrot-Assay durchgeführt. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Auch nach 48h zeigt sich in Keratinocyten im MTT-Test wieder eine signifikante Abnahme der Zellvitalität nach MG132 plus 3-MA im Vergleich zu MG132 allein (Abb. 31B). Und auch nach 48h ist dieser Effekt mittels Neutralrot-Test nicht nachweisbar (Abb. 31B).

Die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests spiegeln sich auch in dem Vorkommen apoptotischer Zellen nach 48h Behandlungsdauer wider. Die Behandlung mit MG132 plus 3-MA führt in Fibroblasten zu einer signifikant höheren Anzahl Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit MG132 (Abb. 32A). Die Anzahl apoptotischer Keratinocyten ist unter beiden Bedingungen gleich (Abb. 32B), was wie nach 24h dem Ergebnis des Neutralrot-Assays entspricht.

In Fibroblasten induziert proteasomaler Stress bei gleichzeitiger Inhibition von MA durch 3-MA also Apoptose, aber erst nach einer Behandlungsdauer von 48h. Die Induktion von MA könnte in Fibroblasten einen protektiven Mechanismus darstellen, der diese Zellen vor dem Zelltod durch Apoptose bewahrt.



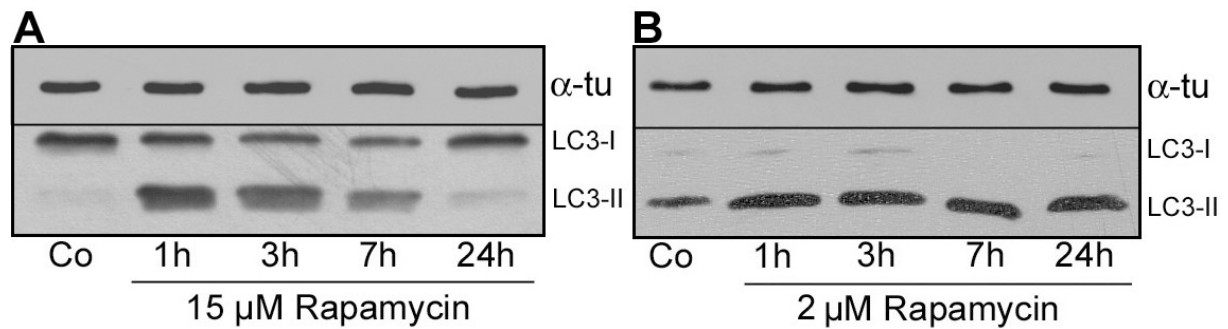
**Abb. 32: Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit MG132 und nach Inhibition der MA nach proteasomaler Inhibition in Fibroblasten (A) Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 48h mit 5 mM 3-MA (3MA) in Kombination mit 1,0 oder 0,05 $\mu$ M MG132 oder nur mit MG132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert und apoptotische Zellen mittels eines Antikörpers gegen Caspase 3 ermittelt. n = 3

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Fibroblasten die Induktion von MA nach proteasomaler Inhibition vor Zelltod schützt und zur Vitalität der Zellen beiträgt. Dass dieser Effekt erst nach längerer Behandlungszeit messbar ist, zeigt, dass MA nicht der wichtigste protektive Mechanismus in Fibroblasten ist und dieser Zelltyp möglicherweise durch andere Mechanismen vor proteasomalem Stress geschützt ist. In Keratinocyten ist MA in diesem Zusammenhang von größerer Bedeutung, spielt aber keine Rolle beim Zelltod.

## 5.7 Aktivierung von MA in Fibroblasten und Keratinocyten mittels Rapamycin

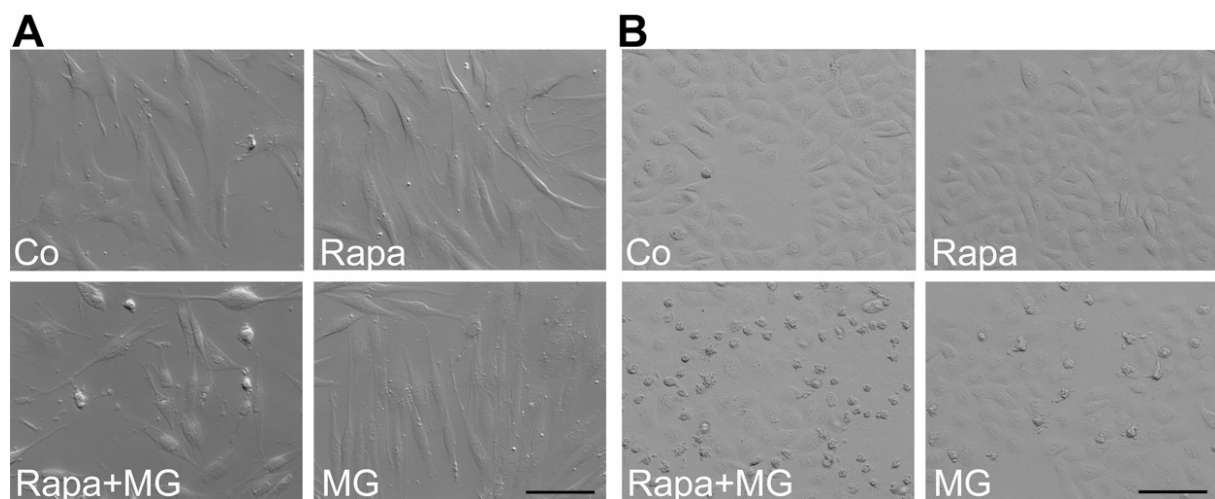
Rapamycin ist ein synthetischer Inhibitor der mTOR und induziert somit MA. Nach verschiedenen konzentrations- und zeitabhängigen Versuchen wurde ermittelt, dass 2  $\mu$ M Rapamycin in Keratinocyten schon nach einstündiger Behandlung MA induzieren, die auch nach 24h noch nachweisbar ist (Abb. 33B). Zur Induktion von MA in Fibroblasten ist eine sehr viel höhere Konzentration von Rapamycin (15  $\mu$ M) notwendig (Abb. 33A). MA wird bei dieser Konzentration nach einer Stunde induziert, ist nach 24 Stunden aber nicht weiter zu detektieren.

Beide Zelltypen zeigen durch Rapamycin allein keine morphologischen Veränderungen (Abb. 34). Die Betrachtung der morphologischen Aufnahmen führt aber zu der Annahme, dass eine Stimulation der MA durch Rapamycin zusätzlich zur MG132-induzierten MA beide Zelltypen stark schädigt. Die Fibroblasten weisen zusätzlich zu ihrer bipolaren Morphologie zum Teil starke Membraneinstülpungen auf und flachen stark ab (Abb. 34A). Ein Großteil der Keratinocyten löst sich vom Schalenboden (Abb. 34B).



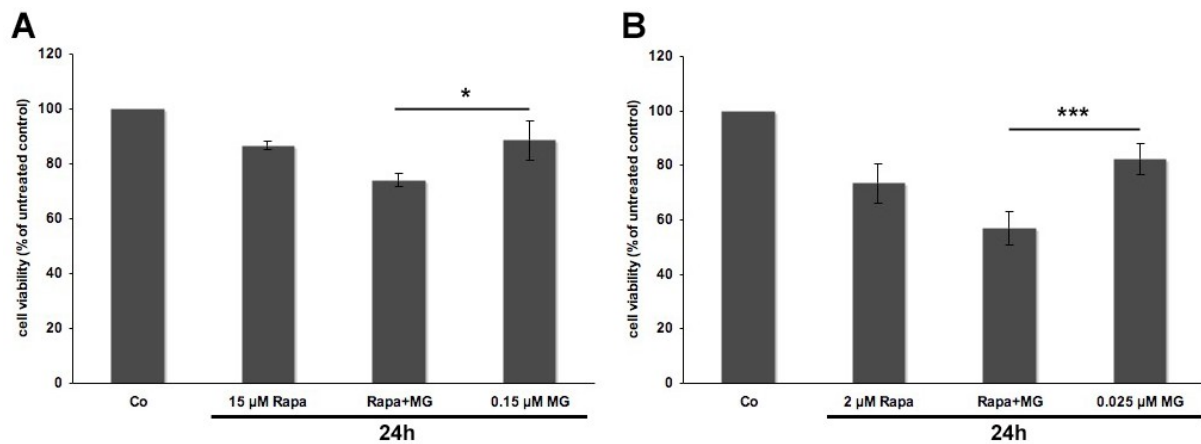
**Abb. 33: Effekt von Rapamycin auf Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Zeitreihe (1-24h) mit 15  $\mu\text{M}$  (A) oder 2  $\mu\text{M}$  (B) Rapamycin behandelt. Die Induktion bzw. Inhibition von MA wurde mittels eines Antikörpers gegen LC3 untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). n = 3

Die aus den morphologischen Aufnahmen gewonnenen Eindrücke bestätigen sich im MTT-Test. Die Viabilität der Fibroblasten sinkt im Vergleich zur Behandlung mit MG132 signifikant auf 70% (Abb. 35A), die der Keratinocyten auf 60% (Abb. 35B). Zudem fällt auf, dass die alleinige Applikation von Rapamycin die metabolische Aktivität der Keratinocyten stärker beeinflusst als die der Fibroblasten. In Keratinocyten sinkt sie auf etwa 70% (Abb. 35B), während sie in Fibroblasten bei ca. 90% liegt (Abb. 35A).



**Abb. 34: Morphologie von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach Behandlung mit Rapamycin.** Die Zellen wurden mit 15  $\mu\text{M}$  (A) oder 2  $\mu\text{M}$  (B) Rapamycin, 0,15  $\mu\text{M}$  (A) oder 0,025  $\mu\text{M}$  (B) MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Morphologische Veränderungen wurden mit dem HMK dokumentiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Co). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ . n = 3

Diese Versuche zeigen, dass der Eingriff in dieses System in Form einer Induktion von MA sich in Keratinocyten stärker negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkt als in Fibroblasten.

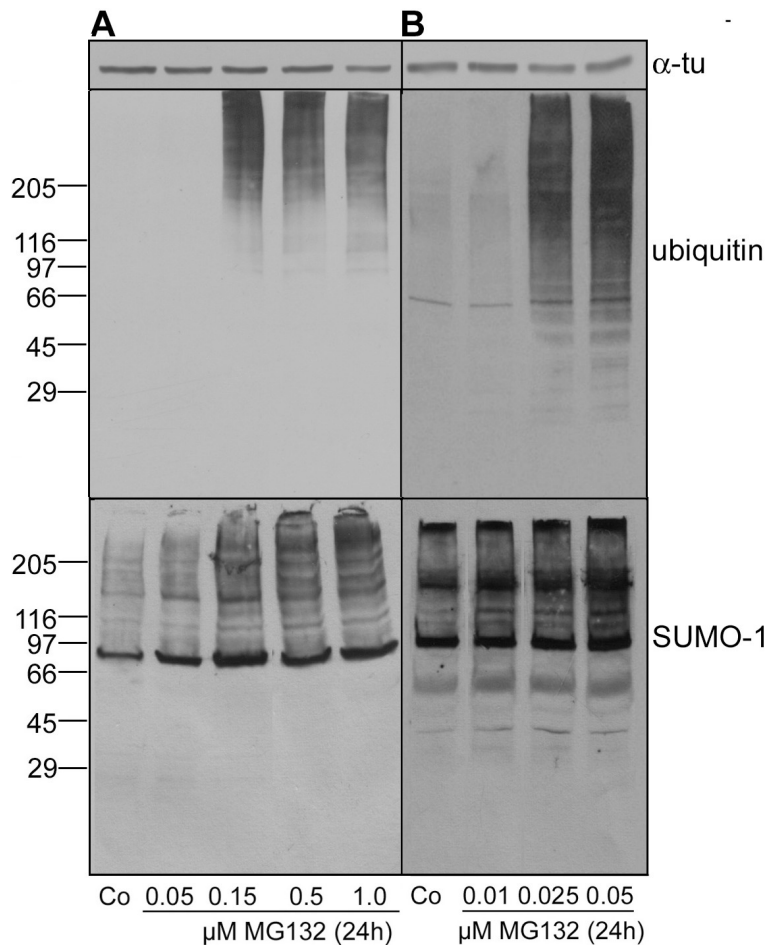


**Abb. 35: Bestimmung der Zellviabilität von Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B) nach Induktion der MA durch Rapamycin.** Die Zellen wurden mit 15  $\mu$ M (A) oder 2  $\mu$ M (B) Rapamycin, 0,15  $\mu$ M (A) oder 0,025  $\mu$ M (B) MG132 oder in Kombination mit beiden Substanzen behandelt. Nach 24h wurde der MTT-Assay durchgeführt. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

## 5.8 SUMOylierung und Ubiquitinierung von Proteinen in Fibroblasten und Keratinocyten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle SUMO-1 im UPS von Fibroblasten und Keratinocyten spielt. Hierfür wurde das Vorkommen ubiquitinerter und SUMOylierter Proteine nach Inhibition des Proteasoms durch MG132 im ECL-Western Blot verglichen. Es wurde ein Antikörper gegen SUMO-1 verwendet. Fibroblasten und Keratinocyten wurden in Konzentrationsreihen für 24h mit MG132 inkubiert.

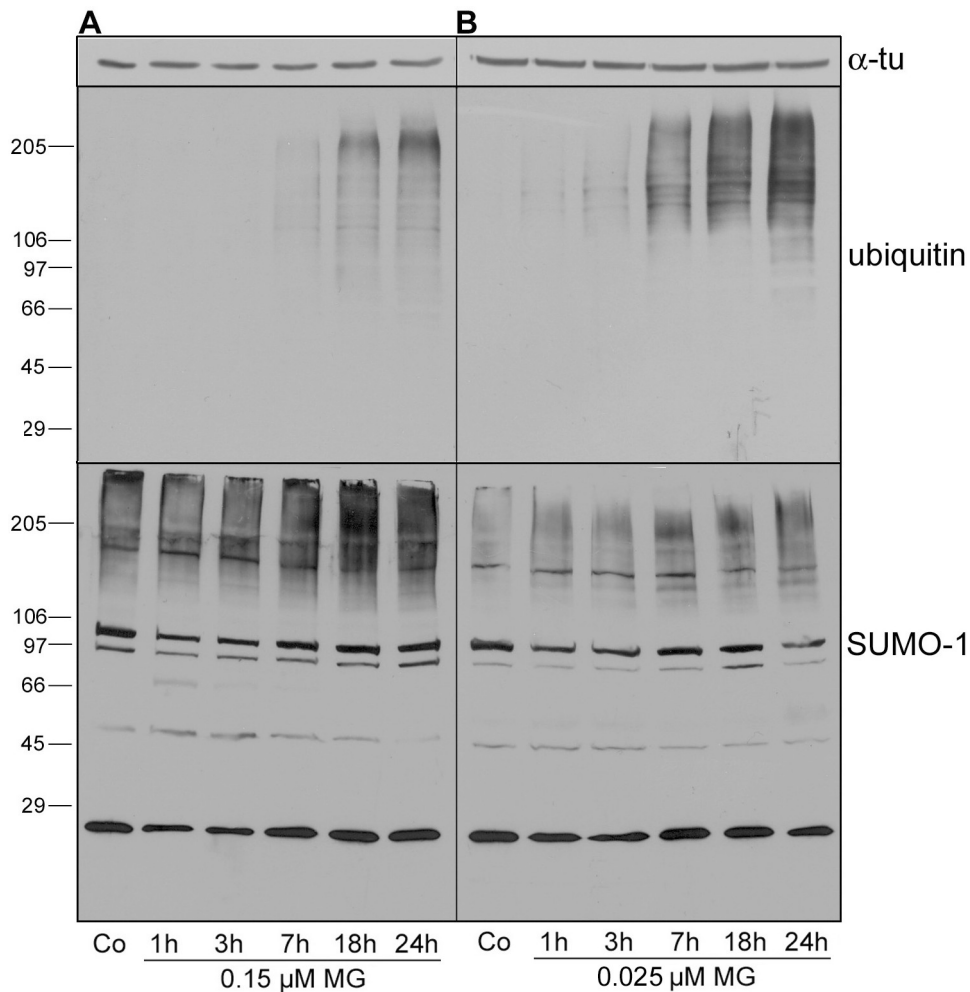
Ubiquitinierte Proteine akkumulieren in Fibroblasten ab einer Konzentration von 0,15  $\mu$ M MG132 (Abb. 36A), in Keratinocyten ab einer Konzentration von 0,025  $\mu$ M MG132 (Abb. 36B).



**Abb. 36: Auswirkungen von MG132 auf die Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 24h mit Konzentrationen von 0,05 – 1,0  $\mu\text{M}$  (A) oder 0,01 – 0,05  $\mu\text{M}$  (B) MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

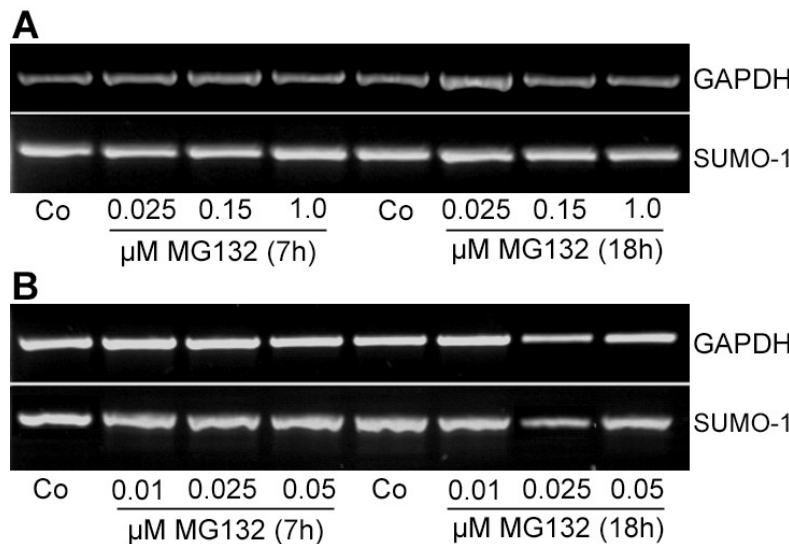
Bei diesen Konzentrationen werden in beiden Zelltypen auch vermehrt durch SUMO-1 modifizierte Proteine detektiert (Abb. 36). Die SUMOylierten Proteine befinden sich überwiegend im hochmolekularen Bereich. Das Bandenmuster verändert sich in beiden Zelltypen nicht.

In weiteren Versuchen wurde das Vorkommen SUMOylierter Proteine nach Inhibition des Proteasoms in einer Zeitreihe im ECL-Western Blot untersucht. Die Fibroblasten wurden mit 0,15  $\mu\text{M}$ , die Keratinocyten mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 inkubiert. In beiden Zelltypen werden durch SUMO-1 modifizierte sowie ubiquitinierte Proteine vermehrt ab einer Behandlungsdauer von 7h im Western Blot detektiert (Abb. 37).



**Abb. 37: Auswirkungen von MG132 auf die Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden in einer Zeitreihe mit Konzentrationen von 0,15 (A) bzw. 0,025  $\mu\text{M}$  (B) MG132 behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen der Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen durch SUMO-1 analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinmengen detektiert. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Ob es durch eine Behandlung mit MG132 zu einer Neusynthese von SUMO-1 und dadurch zu einer verstärkten SUMOylierung kommt, oder ob SUMOylierte Proteine aufgrund der Inhibition der Proteasomen nicht abgebaut werden können und deshalb in der Zelle akkumulieren, wurde mittels RT-PCR getestet. Nach 7h oder 18h Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen MG132 nimmt die SUMO-1-mRNA in beiden Zelltypen nicht zu (Abb. 38A und B). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MG132 keine Neusynthese des SUMO-1-Proteins induziert, sondern SUMOylierte Proteine durch die Hemmung des Proteasoms nicht abgebaut werden und sich in der Zelle anhäufen.

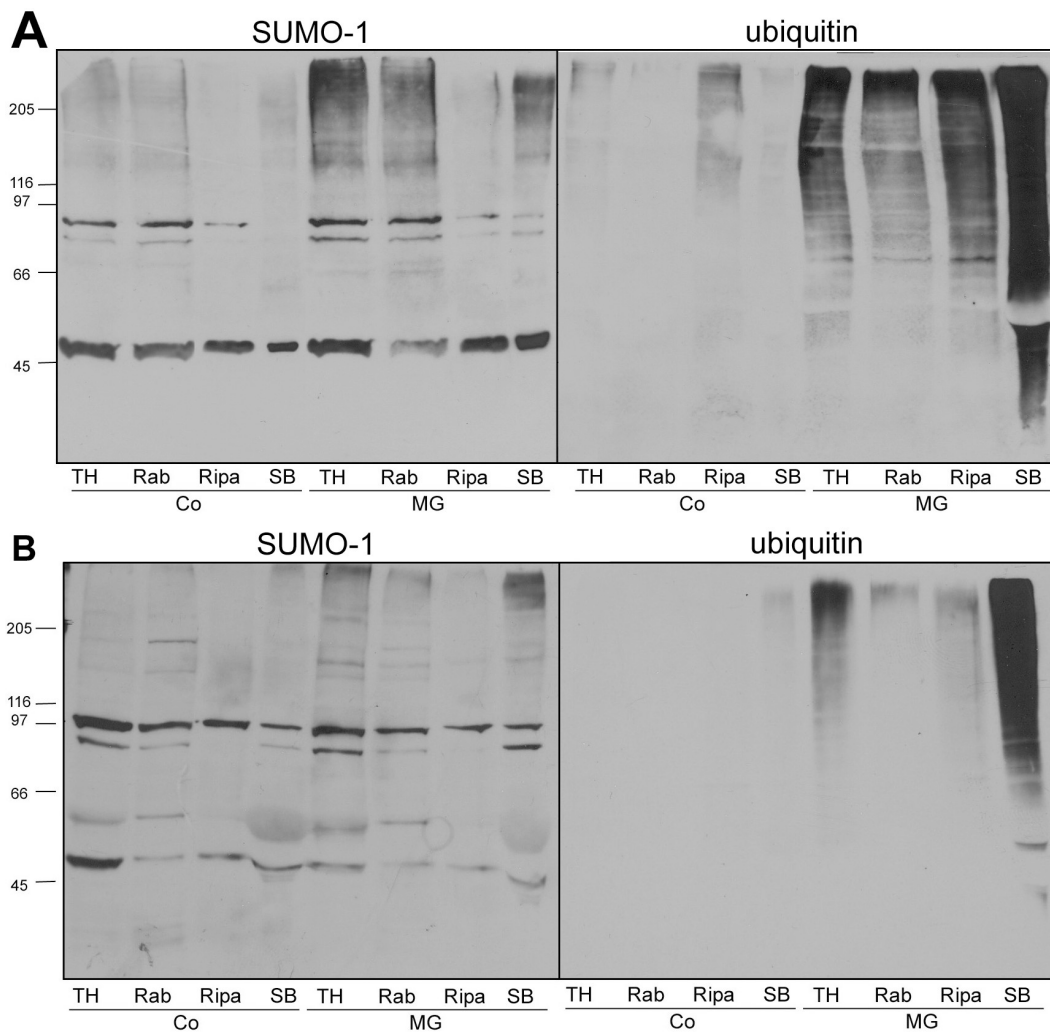


**Abb. 38: Expression des SUMO-1-Gens in mit MG132 behandelten Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die SUMO-1 Zellen wurden in einer Zeitreihe für 7 oder 18h mit 0,025, 0,15 und 1  $\mu\text{M}$  (A) oder 0,01, 0,025 und 0,05  $\mu\text{M}$  (B) MG132 behandelt. Die RNA wurde extrahiert und die Synthese der SUMO-1-mRNA mittels RT-PCR untersucht. GAPDH dient als Nachweis gleicher RNA-Mengen. Co = unbehandelte Kontrolle. n = 3

Die MG132-induzierte Zunahme ubiquitiniertes Proteine in beiden Zelltypen lässt auf die Bildung unlöslicher Proteinaggregate in den Zellen schließen. Um dies zu überprüfen, wurde eine sequentielle Extraktion in Puffern mit ansteigender Solubilisierungskapazität für Proteine durchgeführt. Die Gesamtzelllysate wurden sequentiell mit Rab-, Ripa-Puffer und 1x Probenpuffer extrahiert und die Fraktionen mittels Immunoblot analysiert.

In den Fraktionen der unbehandelten Zellen wurde kaum Ubiquitin detektiert (Abb. 39A und B). In den mit MG132 behandelten Fibroblasten und auch Keratinocyten erkennt man im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme ubiquitiniertes Proteine im Totalhomogenat (TH), die auch in der unlöslichen Fraktion (SB-Fraktion) zu detektieren sind. Ubiquitin wird also stark unlöslich (Abb. 39A und 39B). Im TH der behandelten Fibroblasten und auch Keratinocyten sind auch mehr SUMOylierte Proteine zu detektieren als im TH der Kontrolle (Abb. 39A und 39B). SUMOylierte Proteine befinden sich zudem in der SB-Fraktion (Abb. 39A und 39B). SUMO-1 wird nach proteasomaler Inhibition in beiden Zelltypen leicht unlöslich.

Ob SUMO-1 in Ubiquitin-positiven, unlöslichen Aggregaten lokalisiert ist, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. SUMO-1 und Ubiquitin sind in Fibroblasten und Keratinocyten unter Kontrollbedingungen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Abb. 40A). Im Cytoplasma sind beide Proteine nur sehr schwach zu detektieren. Auffallend ist, dass SUMO-1 in beiden Zelltypen im Bereich der Kernmembran als SUMO-1-positiver Ring lokalisiert ist.

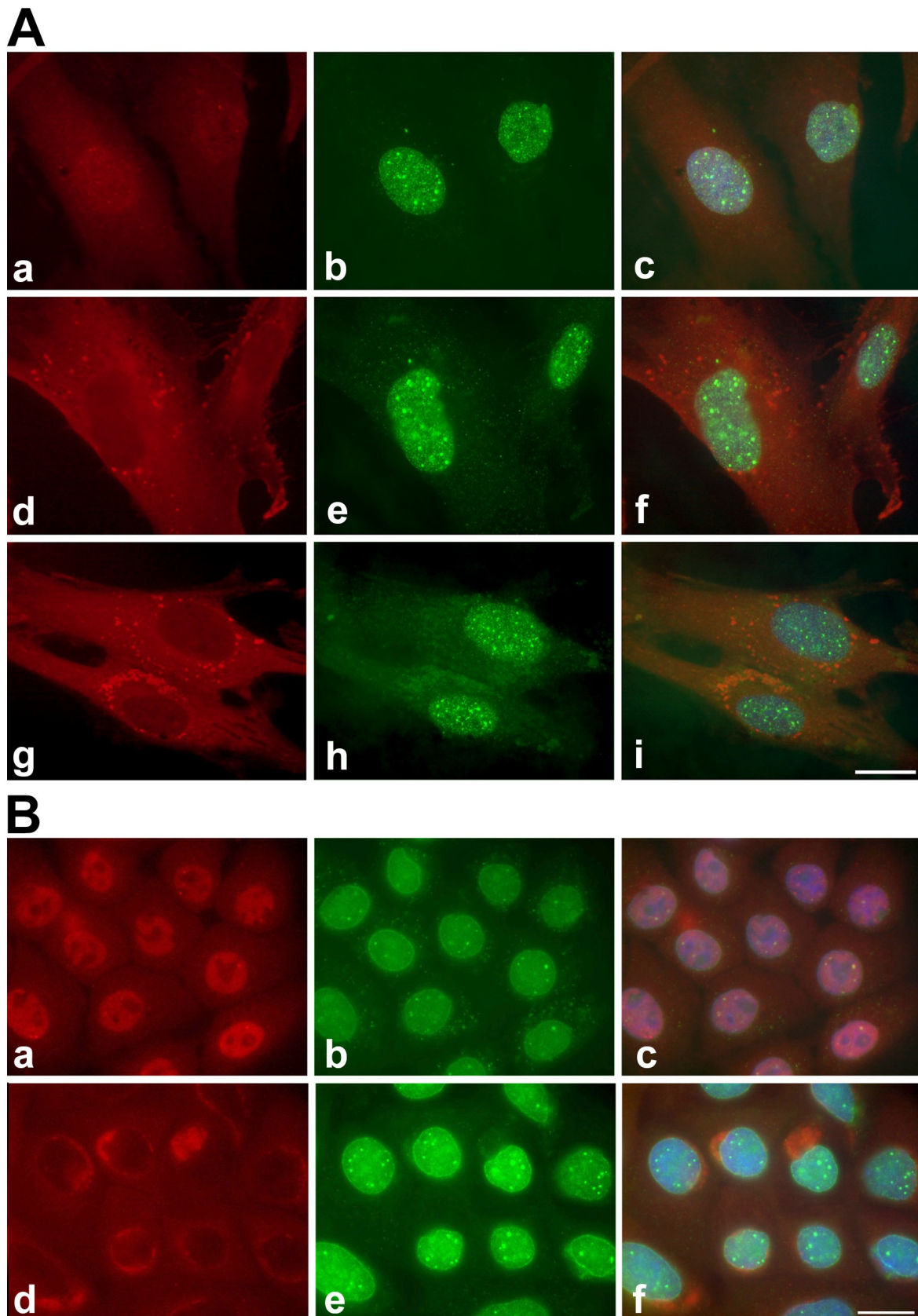


**Abb. 39: Löslichkeit von SUMO-1- und Ubiquitin-konjugierten Proteinen in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen wurden für 24h mit 0,15  $\mu$ M (A) oder 0,025  $\mu$ M (B) MG132 behandelt und die Gesamtzelllysate der behandelten und unbehandelten Zellen (Co) in Puffern mit ansteigender Fähigkeit zur Lösung von Proteinen extrahiert (Rab-, Ripa- und Probenpuffer (SB)). Vor der Extraktion wurde ein Teil des Totalhomogenats (TH) abgenommen. n = 3

Eine 24stündige Behandlung der Fibroblasten mit 0,15 oder 1  $\mu$ M MG132 führt dazu, dass Ubiquitin im Gegensatz zu SUMO-1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma transloziert. Dort ist es in Fibroblasten nach Behandlung mit 0,15  $\mu$ M MG132 in kleinen punktuellen Ablagerungen nachzuweisen (Abb. 40A). Behandlung mit 1  $\mu$ M MG132 führt zu größeren Ansammlungen am Zellkern, die Aggresomen ähneln (Abb. 40A). Diese großen Ablagerungen sind im Gegensatz zu den kleinen punktuellen Strukturen zum Teil SUMO-1-positiv (Abb. 40A).

Auch in Keratinocyten führt die Behandlung mit MG132 zur Umverteilung des Ubiquitins aus dem Zellkern in das Cytoplasma der Zellen. 0,025  $\mu$ M MG132 führen zu Ubiquitin-positiven Aggresomen am Zellkern, die wie in Fibroblasten zum Teil auch positiv für SUMO-1 sind (Abb. 40B).

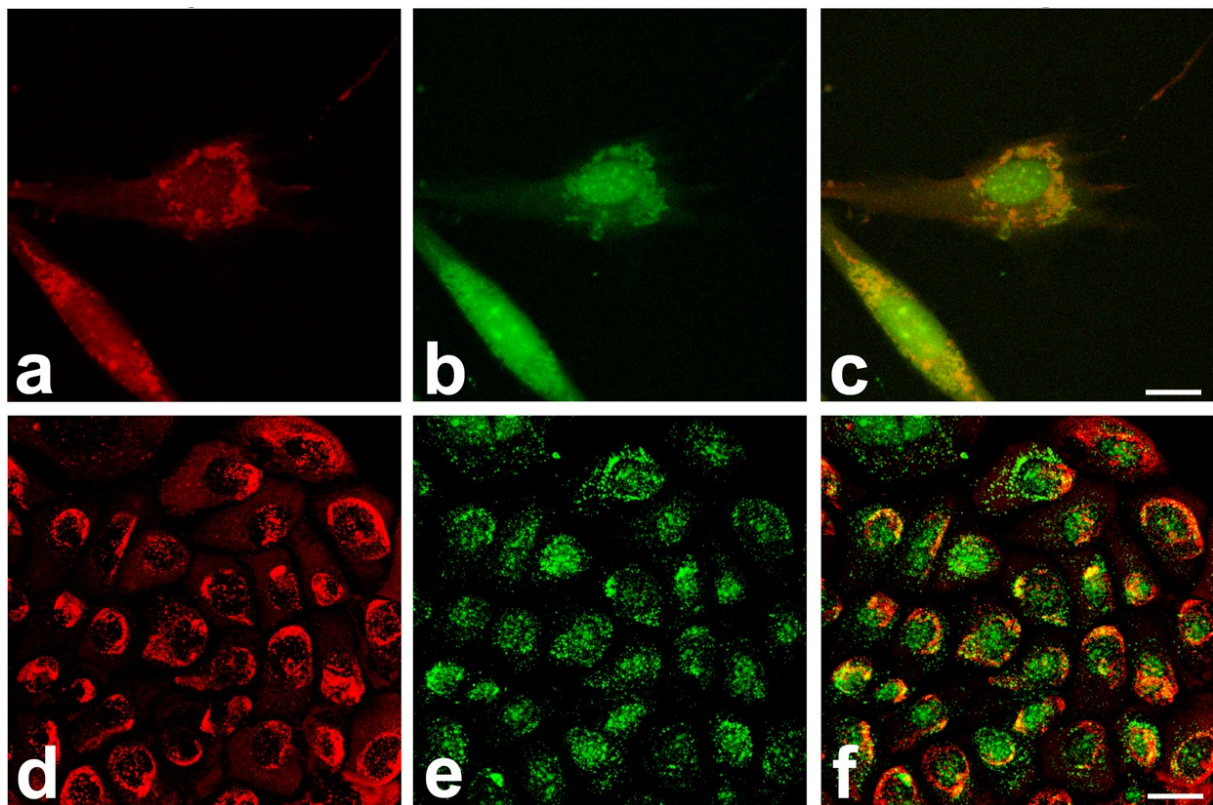




**Abb. 40: Immunocytochemische Analyse der Lokalisation von SUMO-1 nach proteasomaler Inhibition in Fibroblasten (A) und Keratinocyten (B).** Die Zellen waren entweder unbehandelt (a, b, c) oder wurden 24h mit 0,15  $\mu$ M (A: d, e, f) oder 1  $\mu$ M (A: g, h, i) bzw. 0,025  $\mu$ M (B: d, e, f) MG132 behandelt, mit PFA fixiert und mit einem Antikörper gegen SUMO-1 (b, e, h) und Ubiquitin (a, d, g) inkubiert. Der Overlay wurde mit DAPI dargestellt (c, f, i). Messbalken = 10  $\mu$ m.

Aufnahmen MG132-behandelter Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sollten diese Beobachtungen weiter stützen. Auch bei diesen Analysen stellte sich heraus, dass nicht alle Ubiquitin-positiven Aggregate und Aggresomen SUMO-1 enthalten. Vor allem in Keratinocyten sind nur manche dieser Strukturen positiv für SUMO-1 (Abb. 41). Dies ist in Fibroblasten eher der Fall (Abb. 41).

Das Vorkommen durch SUMO-1 SUMOylierter Proteine in Ubiquitin-positiven Aggregaten lässt auf einen Zusammenhang zwischen der SUMOylierung von Proteinen und dem UPS schließen.



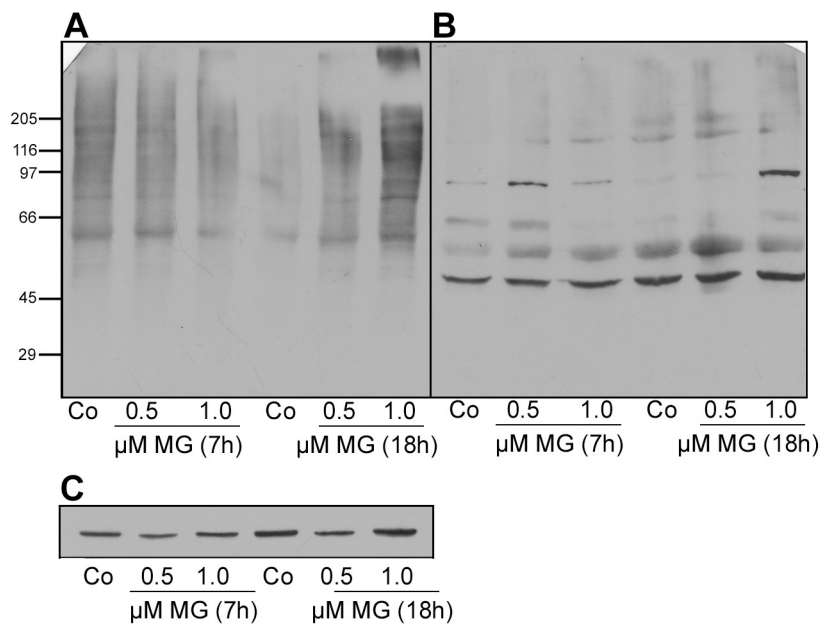
**Abb. 41: Immunocytochemische Analyse der Lokalisation von SUMO-1 nach proteasomaler Inhibition in Keratinocyten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.** Die Fibroblasten (a, b, c) wurden 24h mit 1,0  $\mu\text{M}$  und die Keratinocyten (d, e, f) mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 behandelt, mit PFA fixiert und einem Antikörper gegen SUMO-1 (b, e) und Ubiquitin (a, d) inkubiert. Overlay (c, f). Messbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

Auch die Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf die Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen sollte nicht nur in Monolayerkulturen, sondern auch im Gewebeverband analysiert werden. Hierfür wurden Phenion<sup>®</sup>-Hautmodelle mit MG132 behandelt.

Die Hautmodelle wurden für 7h oder 18h mit 0,5 oder 1  $\mu\text{M}$  MG132 behandelt. Ein Teil der Hautmodelle wurde in Rab-Puffer homogenisiert, mit 5xSB versetzt und auf das Vorkommen ubiquitiniertes oder SUMOylierter Proteine analysiert. Es werden nach 18h Behandlung mit

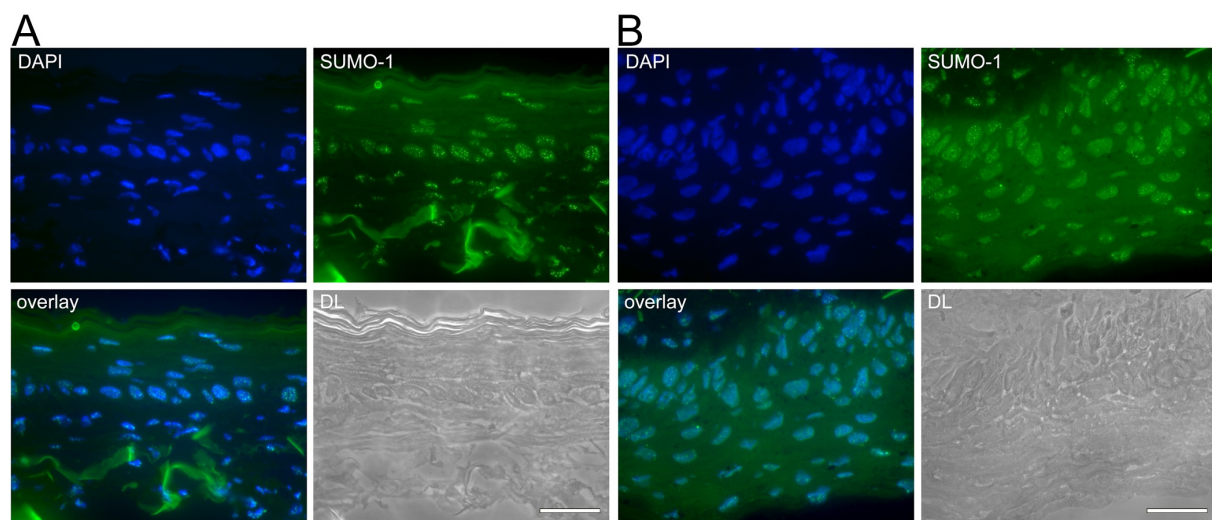


0,5 oder 1  $\mu\text{M}$  MG132 vermehrt ubiquitinierte Proteine detektiert (Abb. 42A). Eine Akkumulation SUMOylierter Proteine wurde nach 7 oder 18h nicht beobachtet (Abb. 42B).



**Abb. 42: Auswirkungen von MG132 auf die Ubiquitinierung (A) und SUMOylierung (B) von Proteinen in Haut-modellen.** Die Hautmodelle wurden für 7 oder 18h mit 0,5 oder 1,0  $\mu\text{M}$  MG132 behandelt. Die Lysate wurden mittels ECL-Westernblot auf Veränderungen von Ubiquitinierung (A) und SUMOylierung (B) von Proteinen analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Nachweis gleicher Proteinnengen detektiert (C). Co = unbehandelte Kontrolle. n = 1

Von den Hautmodellen wurden zusätzlich Kryoschnitte angefertigt. Auch die immunocytochemische Analyse von SUMO-1 in diesen Schnitten ist unauffällig. Es sind keine Akkumulationen SUMOylierter Proteine nach Behandlung mit MG132 zu detektieren (Abb. 43B).



**Abb. 43: Immunocytochemische Analyse der SUMOylierung von Proteinen nach Behandlung von Hautmodellen mit MG132.** Die Hautmodelle waren unbehandelt (A) oder wurden für 18h mit 1,0  $\mu\text{M}$  MG132 behandelt, in TissueTEK eingebettet und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Von den eingebetteten Stücken wurden Kryoschnitte angefertigt und diese mit einem Antikörper gegen SUMO-1 inkubiert. Der Overlay wurde mit DAPI dargestellt. DL = Durchlicht. Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ . n = 1

### 5.8.1 Ist Vimentin ein Zielprotein von SUMO-1?

In den Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass in Fibroblasten und Keratinocyten SUMOylierte Proteine vorliegen, die nach proteasomaler Inhibition akkumulieren. Um mögliche Zielproteine für SUMO-1 in Fibroblasten ausfindig zu machen, wurden verschiedene Methoden verwendet.

Zum einen wurden mittels der frei zugänglichen Online-Software SUMOplot™ der Firma Abgent (<http://abgent.com/doc/sumoplot>) mögliche SUMOylierungsstellen in verschiedenen für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit interessanten Proteinen gesucht und bewertet. SUMOplot™ berechnet nach Eingabe der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins in die Suchmaske des Programms die Wahrscheinlichkeit, mit der bestimmte Sequenzen des Proteins an SUMO konjugiert werden können. Auf diese Weise wurde u. a. Vimentin als mögliches Substrat von SUMO identifiziert. Vimentin weist vier mögliche SUMOylierungsstellen auf (Abb. 44), von denen zwei mit hoher Wahrscheinlichkeit SUMOyliert werden können sowie zwei mit geringerer Wahrscheinlichkeit.

#### SUMOplot™ Prediction

Developed by Abgent, copyright 2003-2010

<b>Protein ID:</b>	gi 62414289 ref NP_003371.2
<b>Defintion:</b>	vimentin [Homo sapiens]
<b>Length:</b>	466 aa

```

1 MSTRSVSSSS YRRMPGGPPT ASRPSSRSY VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51 SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEPKNTR
101 TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151 EEBMRELRQV VQQLTNDKAR VEVERDNLAE DIMRLREKLQ EEMLQREBAAE
201 NTLQSPRQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAPLKKLHEE EIQLQAQIQ
251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW YKSKPADLSE
301 AANRRNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351 FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSS LNLRETNLDS LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451 DGQVINETSQ HHDDLE

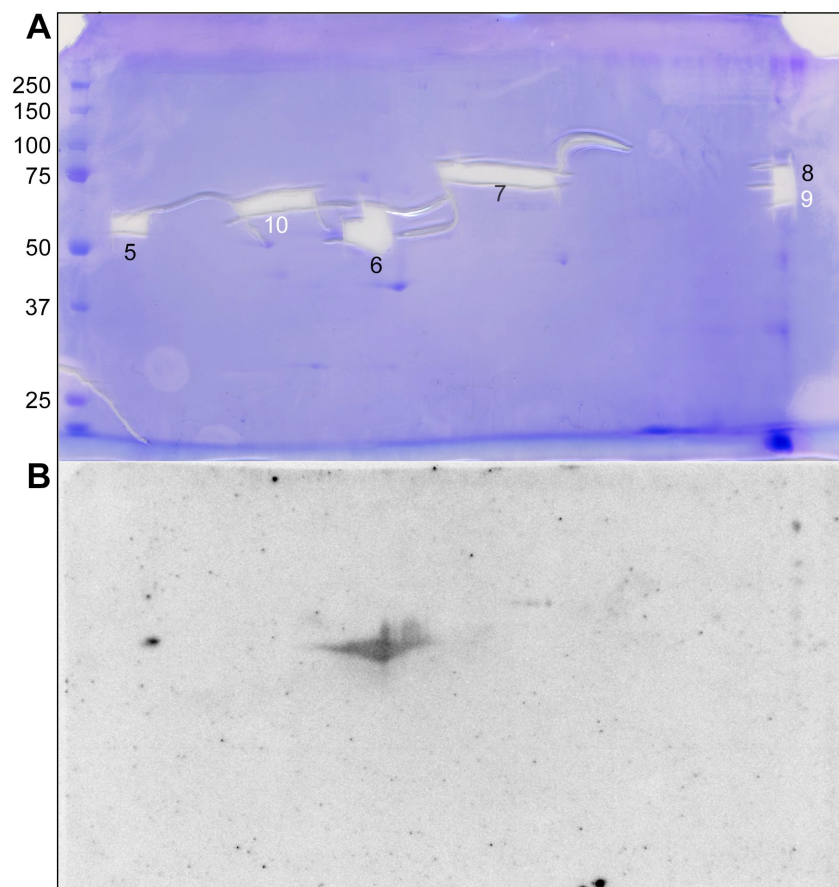
```

- Motifs with high probability
- Motifs with low probability
- Overlapping Motifs

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K373	DEIQN <b>MKEE</b> MARHL	0.80	3	K104	NTRTN <b>EKVE</b> LQELN	0.50
2	K313	DALRQ <b>AKQE</b> STEYR	0.79	4	K223	RLDLE <b>RKVE</b> SLQEE	0.44

**Abb. 44:** Mittels SUMOplot™ identifizierte mögliche SUMOylierungsstellen des Proteins Vimentin. Rot markierte Bereiche stellen Sequenzen dar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit SUMOyliert werden, blaue Bereiche werden nur mit geringer Wahrscheinlichkeit SUMOyliert.

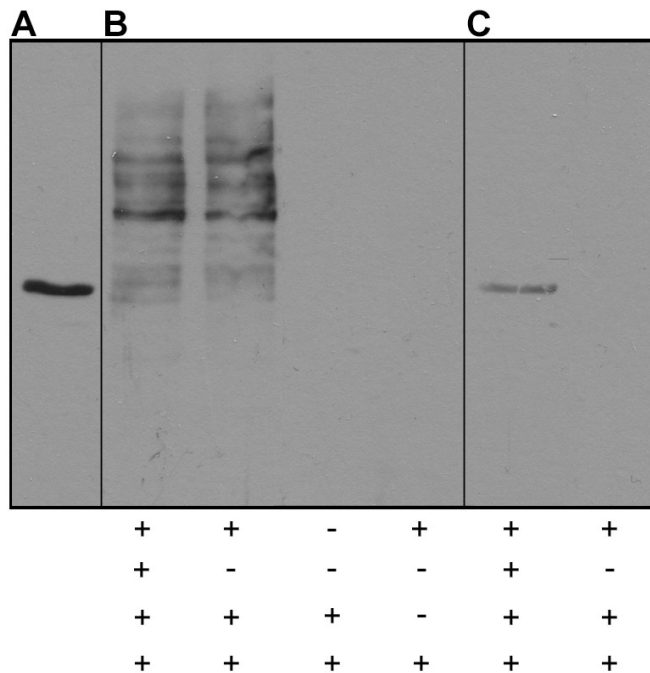
Zum anderen wurde als zweite Methode eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, um SUMOylierte Proteine in Fibroblasten zu identifizieren. Die Proteine eines Fibroblasten-Gesamtzelllysats wurden zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend in einem 10%igen IEF-Gel aufgetrennt. Ein Gel wurde zur immunochemischen Detektion von SUMO-1 geblottet (Abb. 45B). Ein zweites Gel wurde Coomassie-gefärbt (Abb. 45A). Die SUMO-1-Signale wurden den Spots auf dem Coomassie-gefärbten Gel zugeordnet, diese ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine mittels nanoLC-ESI-MSMS (ProteomeFactory, Berlin) identifiziert. In den Proben 5 und 6 war Vimentin enthalten.



**Abb. 45: Identifikation SUMOylierter Proteine in Fibroblasten mittels 2D-Gelelektrophorese.** Die Proteine aus einem Fibroblasten-Gesamtzelllysats wurden auf einem IPG-Strip (pH 3.0 - pH 10.0) aufgetrennt. Anschließend folgte eine SDS-Page in einem IEF-Gel (10%). Ein Gel wurde zur SUMO-1-Detektion mittels ECL-Western Blot verwendet (B), ein weiteres zur Coomassie-Färbung (A). 1-8: Nummerierung ausgeschnittener Proben. n = 1

Um Vimentin als Zielprotein von SUMO-1 zu bestätigen, wurde eine *in vitro*-SUMOylierung durchgeführt. Hierbei wurde rekombinantes SUMO-1 mit oder ohne rekombinantes Vimentin (Abb. 46A) zusammen mit ATP und den SUMO-Ligasen E1 und E2 inkubiert. Die Reaktionen wurden im ECL-Western Blot auf SUMOylierung von Vimentin durch SUMO-1 untersucht. Dabei konnte anhand dieser Methode keine SUMOylierung von Vimentin durch SUMO-1 festgestellt werden (Abb. 46B). Das Bandenmuster des SUMO-Western Blots der Reaktion mit Vimentin unterscheidet sich nicht von der ohne Vimentin (Abb. 46B). Die erkennbaren SUMO-1-positiven Banden müssen in einer Reaktion zwischen SUMO-1 und

den Enzymen E1 und E2 entstehen. Zusätzlich wurde in einem Vimentin-Western Blot die Laufhöhe des Vimentins nach der Reaktion überprüft, die sich nicht von der der Positivkontrolle unterscheidet (Abb. 46C). Eine SUMOylierung hätte zu einer Veränderung der Laufhöhe um etwa 11 kDa führen müssen.



**Abb. 46: In vitro-SUMOylierung durch SUMO-1 von Vimentin.** Rekombinantes SUMO-1 wurde mit (+) und ohne (-) Vimentin zusammen mit ATP und den SUMO-Ligasen E1 und E2 inkubiert. Die Reaktionen wurden im ECL-Western Blot auf SUMOylierung von Vimentin durch SUMO-1 untersucht. A. rekombinantes humanes Vimentin als Positivkontrolle B. SUMO-1-Western Blot nach der Reaktion C. Vimentin-Western-Blot nach der Reaktion

Dieses Ergebnis entspricht nicht den Resultaten der 2D-Gelelektrophorese und der SUMOplot™-Analyse. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Vimentin nicht durch SUMO-1 sondern durch SUMO-2/3 modifiziert wird. Zum anderen muss bedacht werden, dass Ergebnisse von in vitro-Versuchen nicht auf den lebenden Organismus übertragen werden können. Möglicherweise ist das Protein in vivo sehr wohl ein Substrat von SUMO-1. Vielleicht führen aber auch Stressreaktionen zu einer SUMOylierung von Vimentin. Dies muss in weiteren Studien überprüft werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut

Alterungsprozesse beeinflussen jedes Gewebe und Organ des menschlichen Körpers und können zu unterschiedlichsten Krankheitsbildern führen. Alterungsprozesse in der Haut beeinflussen ihre Schutzfunktion. Zudem verändern sie das äußere Erscheinungsbild des Menschen. Ein Großteil der dermatologischen Forschung beschäftigt sich damit, der Hautalterung entgegenzuwirken und ein verjüngtes Hautbild zu erlangen. U. a. steht die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut hierbei im Fokus.

Die äußere Hautschicht, die Epidermis, besteht hauptsächlich aus Keratinocyten und wird kontinuierlich durch die mitotische Aktivität der basalen Stammzellen und der aus ihnen hervorgehenden mitotischen transit amplifying (TA)-Zellen in der Basalschicht, die immer neue Keratinocyten bilden, erneuert. Zellen, die beim Differenzierungsprozess oder durch Hautverletzungen verloren gegangen sind, werden so ersetzt. Ein Ungleichgewicht in der Anzahl proliferierender oder differenzierender Keratinocyten kann zu einer Störung der Homöostase der Haut führen. Somit ist die Aufrechterhaltung der Proliferations- und Differenzierungsprozesse in der Epidermis von großer Bedeutung.

Fibroblasten sind der Hauptzelltyp in der Dermis, die als Stütz- und Bindegewebe dient. Im Alter akkumulieren senescente Fibroblasten in der Dermis, die nicht mehr an der Synthese der Bestandteile der ECM beteiligt sind. Sie sezernieren dann degradative Proteasen, Wachstumsfaktoren und inflammatorische Cytokine, die die Funktionen der mitotischen Fibroblasten und Keratinocyten im Gewebe beeinflussen können (reviewed in Vicencio et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Grundlagen für die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut durch Modulation der degradativen Systeme und der Hitzeschockantwort geschaffen, deren Aktivitäten altersbedingt sinken. Der Fokus lag hierbei auf der vergleichenden Untersuchung der durch Inhibition des UPS und der MA sowie durch Hitzestress hervorgerufenen Stressantworten in primären humanen Fibroblasten und Keratinocyten.

Eine Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 führte in beiden Zelltypen zu einer Induktion von Hsps und MA. Dies konnte nicht nur in Monolayerkulturen, sondern auch im Gewebeverband durch Untersuchungen an Hautmodellen nachgewiesen werden. Auch durch Hitzestress konnte in Fibroblasten eine Induktion von Hsps und in Keratinocyten eine

Induktion von MA erzielt werden. In Microarraystudien wurden die Stressantworten von Fibroblasten nach Behandlung mit MG132 in einem größeren Zusammenhang analysiert. Auch hierbei wurde eine verstärkte Expression der Hsp-Gene nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Gene, die für die proteasomalen Untereinheiten codieren, verstärkt exprimiert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zum Teil große Unterschiede in den Stressantworten von Fibroblasten und Keratinocyten gezeigt und dienen somit als Grundlage für weitere Untersuchungen, in denen die Dosierung von eventuellen Wirkstoffen auf beide Zelltypen angepasst werden kann.

Warum das UPS, das lysosomale System und die Hitzeschockantwort geeignete Parameter in der Haut darstellen, die durch hormetische Effekte moduliert werden können, wird im Folgenden diskutiert.

### **6.1.1 Stimulation des UPS als Ziel hormetischer Effekte in der Haut**

Die Aktivität des UPS nimmt in alternden Zellen und Organismen ab (Dasuri et al., 2009). Eine verminderte Expression der Proteasomen-Untereinheiten, Veränderungen in ihrer Zusammensetzung sowie Veränderungen der Substrate des Proteasoms durch die Zunahme oxidierter und akkumulierter Proteine und Lipide in alternden Zellen werden als Gründe hierfür diskutiert. Aber auch Veränderungen und Störungen in der Regulation der Ubiquitinierung und Deubiquitinierung werden als Ursachen gehandelt (reviewed in Martinez-Vicente et al., 2005). Altersbedingte Veränderungen des UPS konnten auch in der Haut beschrieben werden. Petropoulos et al. (2000) zeigten in primären humanen Keratinocyten eine altersbedingte Abnahme der proteasomalen Aktivität. Bulteau et al. (2000) fanden in 2D-Gelelektrophoreseanalysen Veränderungen in den Untereinheiten der Proteasomen in der Epidermis älterer Probanden, was zu der altersbedingten Abnahme der proteasomalen Aktivität in der Haut beitragen könnte.

Das proteasomale System dient dem kontrollierten Abbau mutierter und posttranslational geschädigter Proteine aus dem Cytosol, dem Nucleus und dem ER. Es degradiert aber auch kurzlebige Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus und des Zellwachstums, an Signaltransduktionsprozessen, sowie an Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Folgen einer Abnahme der proteasomalen Aktivität wären möglicherweise eine fehlerhafte oder verzögerte Degradation von Proteinen, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung regulieren, was sich negativ auf die Homöostase in der Epidermis, die essentiell für deren Funktion ist, auswirken könnte. Außerdem häufen sich fehlgefaltete und posttranslational



geschädigte Proteine an, die zu Aggregaten akkumulieren und zu toxischen Effekten in der Zelle führen. Dadurch kann die Vitalität der Basalzellen der Epidermis und der Fibroblasten in der Dermis beeinträchtigt werden. Chondrogianni et al. (2003) zeigten, dass eine teilweise Inhibition von Proteasomen in Fibroblasten zu einer Beeinträchtigung der Zellproliferation und Entstehung eines seneszenten Phänotyps führt.

Ein möglicher Weg, solchen Effekten in der alternden Haut vorzubeugen, könnte die Stimulierung des UPS durch hormetische Effekte proteasomaler Inhibitoren sein. Verschiedene Studien, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, weisen darauf hin (Lee et al., 2004; Kraft et al., 2006). Meiners et al. (2003) konnten in primären vaskulären glatten Muskelzellen zeigen, dass die Inhibition der Proteasomen eine gesteigerte Expression aller Gene der Untereinheiten des Proteasoms nach sich zieht sowie zur Neusynthese und Bildung der Proteasomen-Komplexe führt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarraystudien mit Fibroblasten führten zu ähnlichen Resultaten. Die Behandlung der Zellen mit MG132 verursachte eine verstärkte Expression der verschiedenen Gene, die für die Untereinheiten des Proteasoms codieren. Ob es auch zu einer Neusynthese der Untereinheiten kommt, wurde nicht überprüft. In weiteren Studien müssten diese Untersuchungen zudem auch mit Keratinocyten durchgeführt werden. Eine durch einen proteasomalen Inhibitor herbeigeführte Stimulation der Proteasomen könnte einer altersbedingten Abnahme der proteasomalen Aktivität und deren Folgen für die Haut entgegenwirken.

### **6.1.2 Stimulation von Autophagie als Ziel hormetischer Effekte in der Haut**

Ein weiteres Charakteristikum für zelluläres Altern ist die Abnahme autophagischer Prozesse. Dies betrifft sowohl MA (Bergamini et al., 2004; Del Roso et al., 2003) als auch CMA (Cuervo und Dice, 2000). Im Gegensatz zum UPS kann MA den Lysosomen nicht nur Proteine zur Degradation zuführen, sondern auch Proteinaggregate und ganze Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen und kontrolliert auf diesem Weg die Anzahl und Qualität der Zellorganellen. Es wird vermutet, dass die altersbedingte Abnahme von MA ein Grund für die Akkumulation geschädigter Mitochondrien und Zunahme oxidativen Stresses im Alter ist (Stroikin et al., 2004). Verschiedene Studien weisen darauf hin. Cavallini et al. (2007) konnten beispielsweise in Ratten zeigen, dass der Abbau von Mitochondrien mit zunehmendem Alter abnimmt. Stimulation von MA in alternden Ratten konnte diesem Effekt entgegen wirken. Auch die Arbeiten von Donati et al. (2001) kommen zu diesem Resultat.

Was sind weitere Folgen einer Abnahme von MA im Alter und was könnte eine Stimulation von MA durch hormetische Effekte bewirken? Eine experimentelle Inhibition von Autophagie

bedingt in Fibroblasten Veränderungen, die einer zellulären Seneszenz ähneln (Stroikin et al., 2004). Zelluläre Seneszenz dient als Mechanismus zur Unterdrückung der Proliferation geschädigter Zellen, um beispielsweise einer Krebsentwicklung entgegenzuwirken (reviewed in Vicencio et al., 2008). Zu den Stimuli, die Seneszenz einleiten, gehören Verkürzung der Telomere, DNA-Schäden und oxidativer Stress. Seneszenten Zellen verbleiben in der G1-Phase des Zellzyklus. Replikative Seneszenz tritt aber auch unabhängig von zellulären Schädigungen ein und wird als Maß für zelluläres Altern angesehen. In diesem Zusammenhang hat sie durchaus negative Effekte. Akkumulierende seneszenten Zellen in proliferativen Geweben wie der Dermis in der Haut sezernieren dort degradative Proteasen und inflammatorische Cytokine, die die Funktionen der mitotischen Zellen im Gewebe negativ beeinflussen können (reviewed in Vicencio et al., 2008). In seneszenten Fibroblasten, die sich nicht mitotisch erneuern können, müssen die sich anhäufenden geschädigten Organellen und oxidierte, fehlgefaltete Proteine schnell entfernt werden, um Schäden vorzubeugen, die dann das gesamte Gewebe oder den Organismus betreffen können. In diesem Falle ist Autophagie in vielen Zelltypen der Hauptmechanismus zum Abbau dieser Produkte (reviewed in Vicencio et al., 2008). Stroikin et al. (2004) zeigten, dass in humanen seneszenten Fibroblasten eine Inhibition von MA durch 3-MA eine Zunahme des Lipofuscins in den Zellen herbeiführt. Die Forscher führen dies auf eine verringerte Degradation der Lysosomen selbst durch MA zurück. Zudem akkumulieren geschädigte Mitochondrien in den Fibroblasten.

Ein Ziel der kosmetischen Forschung ist es, das Eintreten von Fibroblasten in die zelluläre Seneszenz zu verhindern bzw. seneszenten Zellen zu eliminieren, um die synthetische Aktivität des Bindegewebes aufrechtzuerhalten. Eine Stimulation von MA könnte den Eintritt von alternden Fibroblasten in die Seneszenz verhindern. Sollte diese schon eingetreten sein, könnte ein gesteigerter Prozess der MA in diesen seneszenten Zellen der Akkumulation von Lipofuscin und geschädigten Organellen und damit der Entstehung von Altersflecken und der Produktion von ROS entgegenwirken. Torres und Perez (2008) zeigten, dass Seneszenz ebenso wie proteasomale Inhibition zur ROS-Produktion in Fibroblasten beiträgt.

MA ist scheinbar auch ein bedeutungsvoller Prozess in der Epidermis (Aymard et al., 2010). MA wird während der Differenzierung primärer Keratinocyten induziert (Haruna et al., 2008). Die Forscher vermuten einen Zusammenhang zwischen Autophagie und der Degradation von Organellen bei Differenzierungsprozessen der Epidermis.

Das Anschalten autophagischer Prozesse könnte neben der Stimulation des UPS eine geeignete Strategie sein, Alterungsprozessen entgegenzuwirken (reviewed in Vicencio et al.,

2008). Die exakten Mechanismen, durch die Autophagie dem Altern der Haut entgegenwirken kann, sind noch zu erforschen. Dass die degradativen Systeme und ihre Modulation durch hormetische Effekte dabei von Bedeutung sind, ist aber anzunehmen.

### **6.1.3 Stimulation der Hitzestressantwort als Ziel hormetischer Effekte in der Haut**

Es wurde bereits beschrieben, dass die proteasomale Aktivität altersbedingt abnimmt, d.h. die Degradation posttranslational geschädigter und fehlgefalteter Proteine beeinträchtigt ist (Dasuri et al., 2009). Diese Proteine können akkumulieren, aggregieren und toxische Effekte in der Zelle herbeiführen. Unter solchen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor HSF-1 aktiviert und eine Hitzeschockantwort eingeleitet. Denaturierte Proteine können mit Hilfe von Hsps oder molekularen Chaperonen rückgefaltet oder der Degradation über das Proteasom zugeführt werden. Hsps wie Hsp27 oder Hsp70 können Zellen zudem schützen, indem sie direkt in apoptotische Prozesse eingreifen. Während Alterungsprozessen erfährt jedoch auch die Hitzeschockantwort eine Abschwächung (reviewed in Calderwood et al., 2009; Njemini et al., 2002). Als ein Grund hierfür wird eine Überlastung der Hsps diskutiert, da der Bedarf an Chaperonen in alternden Zellen größer ist als ihr Vorkommen. Die Abnahme dieses Schutzmechanismus der Zellen führt zu Defekten in Signaltransduktionsprozessen, im Proteintransport, in der Immunfunktion und bei der zellulären Organisation (reviewed in Söti und Csermely, 2003; 2007).

Verschiedene Studien beschreiben die Abnahme der Expression von Hsps, wie beispielsweise Hsp70 und Hsp90, in alternden Zellen (Fonager et al., 2002; reviewed in Jonak et al., 2006; Njemini et al., 2002). Hsp90 ist ein cytoplasmatisches Protein und in sehr viele Signaltransduktionsprozesse (Zhao et al., 2005) und in die Aktivierung von HSF1 involviert (reviewed in Rattan et al., 2004). Zudem ist Hsp90 in Kooperation mit Hsp70 an der Degradation fehlgefalteter Proteine beteiligt. Hsp90 und Hsp70 und seine Co-Chaperone Hsp40, BAG-1 und CHIP erkennen und binden denaturierte Proteine, die dann entweder degradiert oder rückgefaltet werden. CHIP stellt hier eine Verbindung zwischen den molekularen Chaperonen und dem UPS dar, indem es an der Ubiquitinierung der fehlerhaften Proteine beteiligt ist und zugleich mit Hsp70 und Hsp90 interagiert. So markiert CHIP an Hsp70, Hsc70 oder Hsp90 gebundene, denaturierte Proteine für den proteasomalen Abbau. Eine verminderte Expression dieser Hsps hat eine verminderte Degradation fehlerhafter Proteine zur Folge (Verbeke et al., 2000).

Hsp27 und Hsp70 sind in der Epidermis von besonderer Bedeutung. Die Expression von

Hsp27 korreliert mit der Differenzierung von Keratinocyten und steigt von der Basalschicht bis zum Stratum granulosum an. Es wird angenommen, dass Hsp27 in der Epidermis in die Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung involviert ist (reviewed in Jonak et al., 2006). Hsp70 besitzt eine schützende Wirkung vor UVB-Strahlung. Im Alter bleibt die Expression von Hsp70 weitestgehend stabil, während die von Hsp27 ansteigt. Die Fähigkeit zur Induktion von Hsp27 nimmt jedoch ab (reviewed in Jonak et al., 2006).

Hsps spielen neben ihrer Funktion im UPS auch eine Rolle bei der CMA. CMA ist für die Degradation von 30% der cytosolischen Proteine verantwortlich, die eine KFERQ-Sequenz tragen. Bei der CMA bindet Hsc70 an die KFERQ-Sequenz dieser Proteinsubstrate, führt sie den Lysosomen zu und vermittelt die Aufnahme in die Lysosomen, indem dieser Komplex über den Rezeptor Lamp2a an die lysosomale Membran bindet. Dort wird das Substrat durch den molekularen Chaperonkomplex entfaltet und mit Hilfe des lysosomalen Hsc70 dann in die Lysosomen transportiert und degradiert. Der molekulare Chaperonkomplex besteht aus den Proteinen Hsc70, Hsp40, Hop, Hsp90 und Bag-1. Ein Rückgang der Expression von Hsps könnte sich auch auf diesen wichtigen Mechanismus auswirken.

Hsps spielen beim Schutz vor Proteinschädigungen in Alterungsprozessen eine wichtige Rolle. Ihre Expression und Induktion ist essentiell, erfährt jedoch einen Rückgang bei der Alterung des Organismus. Hormetische Stimulation der Hsp-Synthese könnte ein Ansatz in der dermatologischen Forschung sein, um degenerative Prozesse in der Haut aufzuhalten. Eine Stimulation der Hitzestressantwort und dadurch erzielte hormetische Effekte konnten bereits in Fibroblasten und Keratinocyten nachgewiesen werden. Ein wiederholter milder Hitzestress führte in humanen Fibroblasten zu einer gesteigerten Expression verschiedener Hsps. Auch in humanen Keratinocyten waren unter diesen Bedingungen hormetische Effekte zu beobachten. Dazu gehörten eine verlängerte replikative Lebensspanne und eine gesteigerte proteasomale Aktivität (Rattan, 2004; Rattan und Ali, 2007). Auch die Fähigkeit zur Differenzierung könnte in Keratinocyten durch Hitzestress stimuliert werden (Berge et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls Hitzestress für die Erzielung hormetischer Effekte in Form einer Induktion von Hsps angewendet. Der direkte Vergleich der Stressantworten von Fibroblasten und Keratinocyten legt nahe, dass die Zelltypen unterschiedlich empfindlich auf Hitzestress reagieren. In Fibroblasten werden unter den gewählten Bedingungen die Hsps Hsp70, Hsp40, Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin induziert, aber keine MA. Keratinocyten verhalten

sich gegenteilig und induzieren MA, aber keine Hsps. Eine Induktion von Hsps wird in der Literatur auch für Keratinocyten beschrieben. Möglicherweise müssen für eine Induktion von Hsps durch Hitzestress in Keratinocyten die Parameter anders gewählt werden oder die Reaktion war nach 18h nicht mehr nachweisbar. In diesem Zusammenhang wird aber ein Unterschied in der Stressantwort zu den Fibroblasten deutlich. Eine Induktion von Hsps nach proteasomalem Stress wurde hingegen in beiden Zelltypen beobachtet. In Fibroblasten werden die Hsps Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin induziert, in Keratinocyten Hsp70 und Hsp40. Eine Induktion von Hsp90, Hsp70, Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin wurde auch in Hautmodellen beobachtet. Es ist bekannt, dass Behandlung von Zellen mit Proteasomen-Inhibitoren zur Aktivierung von HSF-1 und Expression von Hsps führen (Kim et al., 1999).

## **6.2 Vergleich der Stressantworten von Fibroblasten und Keratinocyten**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stressantworten der Fibroblasten und Keratinocyten auf proteasomale Inhibition und Hitzestress wiesen zum Teil auffällige Unterschiede auf, die nun im Folgenden diskutiert werden.

### **6.2.1 Unterschiede in den Auswirkungen proteasomaler Inhibition auf Fibroblasten und Keratinocyten**

Anhand morphologischer Untersuchungen, der Bestimmung der Zellviabilität sowie der Messung der proteasomalen Aktivität wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Keratinocyten deutlich empfindlicher auf proteasomalen Stress reagieren als Fibroblasten.

Konzentrationen von 0,15  $\mu$ M in Fibroblasten und 0,025  $\mu$ M MG132 in Keratinocyten führen zu vergleichbaren leichten cytotoxischen Effekten, verbunden mit mitochondrialer Schädigung. Die Konzentrationen inhibieren die Proteasomen in ähnlichem Maße und bedingen leichte Veränderungen der Morphologie in beiden Zelltypen. Der Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber MG132 wurde auch in Immunfluoreszenzstudien deutlich. Bei den in ihrer Wirkung vergleichbaren Konzentrationen von MG132 wurden in Keratinocyten schon Ubiquitin-positive aggresomenartige Strukturen ausgebildet, wohingegen in Fibroblasten nur kleine Aggregate im Cytoplasma zu erkennen waren. Molekulare Chaperone können der Bildung von Aggresomen entgegenwirken und die Zellen bei proteasomalem Stress schützen. Auch die sHsps Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin besitzen Chaperonaktivität (Ehnsperger et al., 1997; Jakob et al., 1993; Thériault et al., 2004). Die Bildung von Proteinaggregaten könnte in Fibroblasten im Vergleich zu Keratinocyten durch ihren höheren endogenen Level an sHsps und die zusätzliche Induktion dieser Proteine verzögert werden. So

konnten Bolhuis und Richter-Landsberg (2010) zeigen, dass die stabile Transfektion von Zellen der oligodendroglialen Zelllinie OLN93 aus Ratten mit humanem Hsp27 in diesen Zellen eine verlangsamte Ausbildung von Aggresomen nach Behandlung der Zellen mit MG132 im Vergleich zu den Wildtypzellen zur Folge hatte. Eine Stimulation der Induktion von Hsps in Keratinocyten durch proteasomale Inhibitoren oder Hitzestress könnte diese Zellen vor einer altersbedingten Bildung von Proteinaggregaten und den toxischen Folgen schützen.

Eine weitere Beobachtung beim Vergleich der Stressantworten der beiden Zelltypen auf MG132 war, dass Keratinocyten auf die Behandlung mit MG132 schnell mit einer Induktion von MA reagierten. Auch dies weist auf eine größere Sensibilität gegenüber proteasomalem Stress hin. MA wird oft bei proteasomaler Inhibition induziert (Iwata et al., 2005) und deshalb als ein kompensatorischer Mechanismus zum UPS diskutiert. Fortun et al. (2007) leiteten in Schwann-Zellen aus Mäusen mittels MG132 die Bildung von Aggresomen ein. Eine Induktion von MA unter diesen Bedingungen konnte die Bildung von Aggregaten aufhalten. Eine simultane Inhibition von MA und der Proteasomen hingegen unterstützte die Formierung von Aggresomen. In Immunfluoreszenzstudien mit Keratinocyten im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass nach einer Behandlung mit MG132 Autophagosomen in Ubiquitin-positiven Aggresomen lokalisiert sind. Dies weist darauf hin, dass MA als kompensatorischer Mechanismus induziert wird. Da Keratinocyten weniger sHsps exprimieren als Fibroblasten, wäre es denkbar, dass diese Zellen MA als protektiven Mechanismus schneller induzieren als Fibroblasten.

Die eben beschriebenen Beobachtungen führten zu einer weiteren Überlegung. Da Fibroblasten MA erst spät induzieren, ist es möglich dass MA in diesen Zellen nicht als protektiver Mechanismus fungiert, sondern den programmierten Zelltod Typ II bedingt. Die Bedeutung von MA bei proteasomalem Stress in Fibroblasten und Keratinocyten wurde in weiteren Versuchen daher bezüglich Zelltod und Überleben näher untersucht.

### **6.2.2 Die Bedeutung der MG132-induzierten Makroautophagie**

Um zu analysieren, ob MA einen eher cytotoxischen Effekt hat oder das Überleben der Zellen steigert, wurden die Zellen simultan mit MG132 und 3-MA behandelt und dann die Morphologie und Vitalität der Zellen untersucht.

In Keratinocyten sinkt die Vitalität der Keratinocyten nach Behandlung mit MG132 plus 3-MA schon nach 24h signifikant im Vergleich zu alleiniger proteasomaler Inhibition. Dieser

signifikante Unterschied zeigt sich allerdings nur im MTT-Test und wird im Neutralrot-Test auch nach 48h nicht beobachtet. Die Inhibition von MA bei proteasomalem Stress wirkt sich also in Keratinocyten frühzeitig auf die mitochondriale Aktivität der Zellen aus. 3-MA zeigt in Fibroblasten bei proteasomaler Inhibition nach 24h keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. Die Abnahme der Zellvitalität beruht zu diesem Zeitpunkt allein auf der Wirkung von MG132. Erst nach längerfristiger Inhibition mit 3-MA (48h) zeigt sich ein negativer Effekt auf die mitochondriale Aktivität sowie die lysosomale Integrität. Die Ergebnisse zeigen, dass MA als Stressantwort auf proteasomale Inhibition in Fibroblasten von nicht allzu großer Bedeutung ist. Doch insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die MG132-induzierte MA in beiden Zelltypen ein protektiver Mechanismus ist, der der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus der Zellen dient und in Fibroblasten zusätzlich die Integrität der Membranen stützt.

Worauf könnte diese unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber 3-MA beruhen? Der mögliche Einfluss der Hsps wurde schon erwähnt. Weiter wäre zu beachten, dass der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Bedeutung von MA lag. Eine mögliche Induktion anderer Typen der Autophagie wie CMA wurde nicht untersucht. Eine Kompensation des Ausfalls der MA durch CMA in Fibroblasten könnte die weniger ausgeprägte Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber proteasomalem Stress ebenso erklären. So wurde gezeigt, dass Inhibition von MA in Fibroblasten zur Aktivierung von CMA führt (Kaushik et al., 2008). Es könnte zudem sein, dass dieser Mechanismus in Fibroblasten schneller induziert wird als in Keratinocyten.

Warum wirkt sich 3-MA in Keratinocyten so stark auf die metabolische Aktivität aus? Mitochondrien sind essentiell für die Energieproduktion in eukaryotischen Zellen. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als unvermeidbares Nebenprodukt des mitochondrialen Metabolismus und können die mitochondriale DNA schädigen oder zu Störungen der mitochondrialen Aktivität führen. In humanen Fibroblasten ist nach proteasomaler Inhibition ein Anstieg von ROS sowie ein negativer Effekt auf die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransporter zu verzeichnen (Torres und Perez, 2008). Es wird vermutet, dass proteasomale Inhibition die mitochondriale Aktivität stört und so die Produktion von ROS gesteigert wird.

Zudem ist inzwischen bekannt, dass Mitochondrien über MA selektiv den Lysosomen zur Degradation zugeführt werden können. Dieser Mechanismus wird als Mitophagie bezeichnet. In der Hefe wurde das mitochondriale Membranprotein Uth1p als Signal für Mitophagie

identifiziert (Kissová et al., 2004). Vor allem geschädigte Mitochondrien werden selektiv degradiert. Werden die durch MG132 geschädigten Mitochondrien nicht eliminiert, weil MA nicht stattfinden kann, reichern sich ROS in der Zelle an, was die Zellen und die Mitochondrien weiter schädigen kann. Diesem Prozess könnten in Fibroblasten wiederum Hsps entgegenwirken. Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin können vor oxidativem Stress und ROS schützen und man vermutet, dass Hsp27 zu einem ansteigenden intrazellulären Glutathion-Level führt. Glutathion wirkt in Zellen als Antioxidanz (reviewed in Concannon et al., 2003). Der im Vergleich zu Fibroblasten geringere Gehalt an sHsps könnte die Folgen der proteasomalen Inhibition für Keratinocyten auch in diesem Zusammenhang verschlimmern.

### **6.2.2.1 Makroautophagie und Apoptose in Fibroblasten und Keratinocyten**

Es existieren zwei Formen des programmierten Zelltods: Apoptose oder programmierter Zelltod Typ I und Zelltod durch Autophagie oder programmierter Zelltod Typ II. Diese zwei Prozesse laufen nicht zwangsläufig unabhängig von einander ab. Verschiedene Studien beschreiben auch Interaktionen dieser beiden Wege, die zum Zelltod führen (Boya et al., 2005; Bursch et al., 1996 und 2004; Gonzalez-Polo et al., 2005; Xue et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine langfristige pharmakologische Inhibierung von MA eine Sensibilisierung von Fibroblasten gegenüber MG132-induziertem apoptotischen Zelltod zur Folge hat. Dies wurde mittels der Detektion Caspase-3-positiver Zellen nachgewiesen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die MG132-induzierte MA in Fibroblasten ein Mechanismus ist, der dem apoptotischen Zelltod entgegenwirkt. Welcher Mechanismus zu diesem Resultat führt, muss weiter untersucht werden. Die induzierte MA könnte einer Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien und der daraus resultierenden Spaltung der Caspase-3 entgegenwirken, indem geschädigte Mitochondrien selektiv degradiert werden.

Auch die Induktion von CMA kann vor Apoptose schützen. Eine Inhibition von CMA durch RNAi gegen Lamp-2A führte in Fibroblasten aus der Maus zu einer stärkeren Aktivierung von Apoptose (Massey et al., 2006). Dies wurde durch die zusätzliche Inhibition der kompensatorischen MA noch verstärkt. Auch in diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, eine mögliche Bedeutung der CMA in Fibroblasten zu untersuchen.

Keratinocyten sind einem MG132-induzierten Zelltod gegenüber sensibler als Fibroblasten, die Apoptose erst nach 48h einleiten. Da manche Hsps anti-apoptotische Wirkungen aufweisen, könnten Fibroblasten auch in diesem Zusammenhang von ihrem hohen Gehalt an



sHsps profitieren. Hsp27 besitzt beispielsweise eine Apoptose inhibierende Funktion (Garrido et al., 1999). Es kann Cytochrom c und Pro-Caspase-3 binden und so die Bildung eines Apoptosoms verhindern. Zudem besitzt Hsp27 die Fähigkeit, die Bindung von Daxx an den Fas-Rezeptor zu blockieren und greift so in den extrinsischen Signalweg der Apoptose ein (reviewed in Concannon et al., 2003). Goldbaum et al. (2009) vermuten, dass Astrocyten aus Ratten durch ihren hohen Gehalt an Hsp25 vor proteasomalem Stress besser geschützt sind als Oligodendrocyten. Sie fanden heraus, dass Oligodendrocyten bei proteasomalem Stress schneller Apoptose einleiten als Astrocyten. Wurde die Expression von Hsp25 in Astrocyten durch siRNA vermindert, reagierten die Zellen deutlich empfindlicher auf eine Behandlung mit MG132.

In Keratinocyten gibt es unter der Bedingung des proteasomalen Stresses keinen Zusammenhang zwischen MA und Apoptose. Weder erhöht 3-MA die Anzahl apoptotischer Keratinocyten noch wirkt es Apoptose entgegen. Es konnte nur gezeigt werden, dass die Induktion der MA bei proteasomalem Stress der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus dient. Möglicherweise reguliert MA in mitotisch aktiven Keratinocyten die Zellhomöostase und leitet erst im seneszenten Stadium den Zelltod ein. Letzteres vermuten Gosselin et al. (2009). Es wird angenommen, dass seneszente Fibroblasten durch den programmierten Zelltod Typ II sterben (Gerland et al., 2003).

Für die Aufrechterhaltung der Zellvitalität ist ein Gleichgewicht von Synthese, Degradation und dem Recycling verschiedener Proteine und zellulärer Komponenten von großer Bedeutung. Auf die Inhibition der basalen MA reagieren Keratinocyten sehr schnell mit einer rapiden Abnahme der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Auch eine Induktion von MA durch Rapamycin lässt die mitochondriale Aktivität in Keratinocyten sinken. In Fibroblasten sind diese schwerwiegenden Auswirkungen nicht zu erkennen. Ein Eingreifen in das Gleichgewicht der basalen MA hat also weitaus negativere Folgen für die Vitalität von Keratinocyten als für Fibroblasten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein funktionierender Ablauf der basalen MA für die Vitalität von Keratinocyten entscheidend und die Bedeutung der MA zelltypspezifisch ist.

### **6.3 Bedeutung der SUMOylierung von Proteinen in Fibroblasten und Keratinocyten**

Das eben erwähnte Gleichgewicht von der Synthese und Degradation von Proteinen wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert und ist für die Zellhomöostase von großer Bedeutung. Lange wurde angenommen, dass die SUMOylierung von Proteinen keinen Einfluss auf ihre Degradation besitzt und stattdessen in vielen Fällen antagonistisch zur Ubiquitinierung agiert (Desterro et al., 1998). Es gibt aber inzwischen vermehrt Hinweise auf ein Zusammenspiel von Ubiquitinierung und SUMOylierung von Proteinen nach Inhibition der Proteasomen. So wird nach Behandlung von Zellen mit Inhibitoren der Proteasomen eine Zunahme SUMOylierter Proteine beobachtet (Uzunova et al., 2007). Die Erkennung und Bindung von Substraten wird im UPS durch eine Reihe von Ubiquitin-Ligasen oder E3-Enzymen vermittelt. Einige dieser Enzyme tragen auch SIMs (SUMO-interacting motifs), Sequenzen, über die Proteine nicht-kovalent an SUMO binden können. Diese E3-Enzyme werden Ubiquitin-Ligasen für SUMO-Konjugate (ULS) genannt. Über SIMs können SUMOylierte Proteine von E3-Enzymen erkannt und zusätzlich ubiquitiniert werden und dem Proteasom zugeführt werden (reviewed in Miteva et al., 2010). Eine SUMOylierung von Proteinen kann somit als sekundäres Signal dienen, das eine Degradation über Proteasomen vermittelt (Uzunova et al., 2007).

Um in Fibroblasten und Keratinocyten nach einem Link zwischen dem SUMO-1 und dem UPS zu suchen, wurden die Auswirkungen von MG132 auf das Vorkommen SUMOylierter Proteine sowie deren Löslichkeit und die subzelluläre Lokalisation von SUMO-1 untersucht. Fibroblasten und Keratinocyten verhalten sich in Bezug auf die SUMOylierung von Proteinen durch SUMO-1 ähnlich. Im Western Blot ist in beiden Zelltypen nach Behandlung mit MG132 eine Akkumulation SUMOylierter Proteine zu beobachten, wobei sich das Bandenmuster jeweils nicht verändert. MG132 scheint keine SUMOylierung neuer Zielproteine zu bedingen. Eine Zunahme der SUMO-1-mRNA ist nach Behandlung mit MG132 nicht zu beobachten. Bailey und O'Hare (2005) sehen nach proteasomaler Inhibition in Hep2-Zellen eine Akkumulation SUMOylierter Proteine im Western Blot und zugleich eine Abnahme des unkonjugierten SUMO-1. Aufhebung der proteasomalen Inhibition bei gleichzeitiger Inhibition der Proteinsynthese lässt die Menge des freien SUMO-1 wieder ansteigen. Die Forscher schließen aus ihren Versuchen, dass der Pool des unkonjugierten SUMO-1 durch Recycling der SUMO-1-Proteine, die von ihren Substraten abgespalten werden, aufrechterhalten wird. Dies könnte auch auf Fibroblasten und Keratinocyten zutreffen.

Mittels sequentieller Extraktionen mit Totalhomogenaten unbehandelter und mit MG132 behandelter Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich SUMO-1 nach Behandlung mit MG132 in unlöslichen zellulären Fraktionen befindet. In anschließenden Immunfluoreszenzstudien wurde SUMO-1 teilweise in Ubiquitin-positiven Aggresomen detektiert. Zusätzliche Untersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurden durchgeführt, um zu analysieren, ob sich SUMO-1 und Ubiquitin-positive Ablagerungen in den Zellen überlagern. Es stellte sich heraus, dass nicht alle Ubiquitin-positiven Aggregate und Aggresomen SUMO-1 enthalten. Vor allem in Keratinocyten sind nur manche dieser Strukturen auch positiv für SUMO-1. Dies ist in Fibroblasten vermehrt zu beobachten. Dass nicht alle Ubiquitin-positiven Aggregate auch für SUMO-1 positiv sind, deutet darauf hin, dass SUMO-1 in manchen Fällen neben Ubiquitin als sekundäres Signal für den proteasomalen Abbau dient, was auch Uzunova et al. (2007) vermuten.

Matafora et al. (2009) sahen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit MG132, dass SUMO-1 im Zellkern in großen Strukturen akkumuliert. Die Forscher vermuten, dass SUMOylierung von Proteinen in Koordination mit dem UPS stattfindet und die Aufrechterhaltung der nucleären Integrität reguliert. Nach proteasomaler Inhibition in HeLa-Zellen nahm die Menge SUMOylierter Proteine im Nucleus, die dort in nucleären Strukturen akkumulierten, zu. Die Forscher identifizierten 193 Substrate von SUMO-1, von denen viele zugleich ubiquitiniert vorlagen, und die meist nucleären Proteinfamilien angehören. In Fibroblasten und Keratinocyten waren solche Akkumulationen von SUMO-1 nach Behandlung mit MG132 im Zellkern nicht zu beobachten.

### **6.3.1 Zielproteine für SUMO-1 in Fibroblasten**

Bis heute wurden in fast allen Zelltypen und Bereichen der Zelle Zielproteine für SUMO identifiziert. Proteinmodifikationen durch SUMO werden mit immer mehr zellulären Prozessen in Verbindung gebracht. Auch ein Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zielproteine für SUMO-1 in Fibroblasten zu finden. Mittels 2D-Gelelektrophorese von einem Fibroblasten-Gesamtzelllysat und Analysen mit der Online-Software SUMOplot™ wurde Vimentin als mögliches Zielprotein identifiziert. Vimentin ist im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur proteasomalen Inhibition ein interessantes Target, da dieses Protein die käfigartigen Strukturen ausbildet, die Aggresomen umschließen (Johnston et al., 1998). Ob Vimentin eine SUMO-1-Konsensussequenz besitzt, wurde mit dem Programm SUMOplot

untersucht und bestätigt. Eine SUMOylierung von Vimentin konnte mittels verschiedener Methoden, wie der *in vitro* SUMOylierung, allerdings nicht nachgewiesen werden.

Auch Snider et al. (2011) verwendeten die Methode der *in vitro* SUMOylierung, um eine SUMOylierung von Vimentin und verschiedenen Keratinen zu untersuchen. Die Forscher publizierten einen Nachweis der SUMOylierung dieser Proteine. Allerdings fehlt in ihren Versuchen eine Negativ-Kontrolle, die im entsprechenden Versuch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde und eindeutig zeigt, dass Vimentin unter diesen Bedingungen *in vitro* nicht SUMOyliert wird. Das Bandenmuster der Probe mit Vimentin unterscheidet sich nicht vom Bandenmuster der Negativkontrolle ohne Vimentin, was darauf hindeutet, dass dieses aufgrund einer Reaktion zwischen SUMO-1 und E1/E2 entstehen muss. Eine Veränderung des Bandenmusters im Bereich des Molekulargewichtes von Vimentin ist nach der *in vitro*-SUMOylierung ebenfalls nicht erkennbar.

Um ein für die Haut interessantes Zielprotein für SUMO-1 zu finden, das auch eine Funktion im UPS übernimmt, sollte die SUMOylierung von Hsps untersucht werden. Einige Hsps besitzen ebenso wie Vimentin SUMO-1-Konsensussequenzen. Zudem ist bekannt, dass SUMO-1 an der Aktivierung des HSF-1 beteiligt ist (Hong et al., 2001).

### **6.3.2 Bedeutung von SUMO in der Haut**

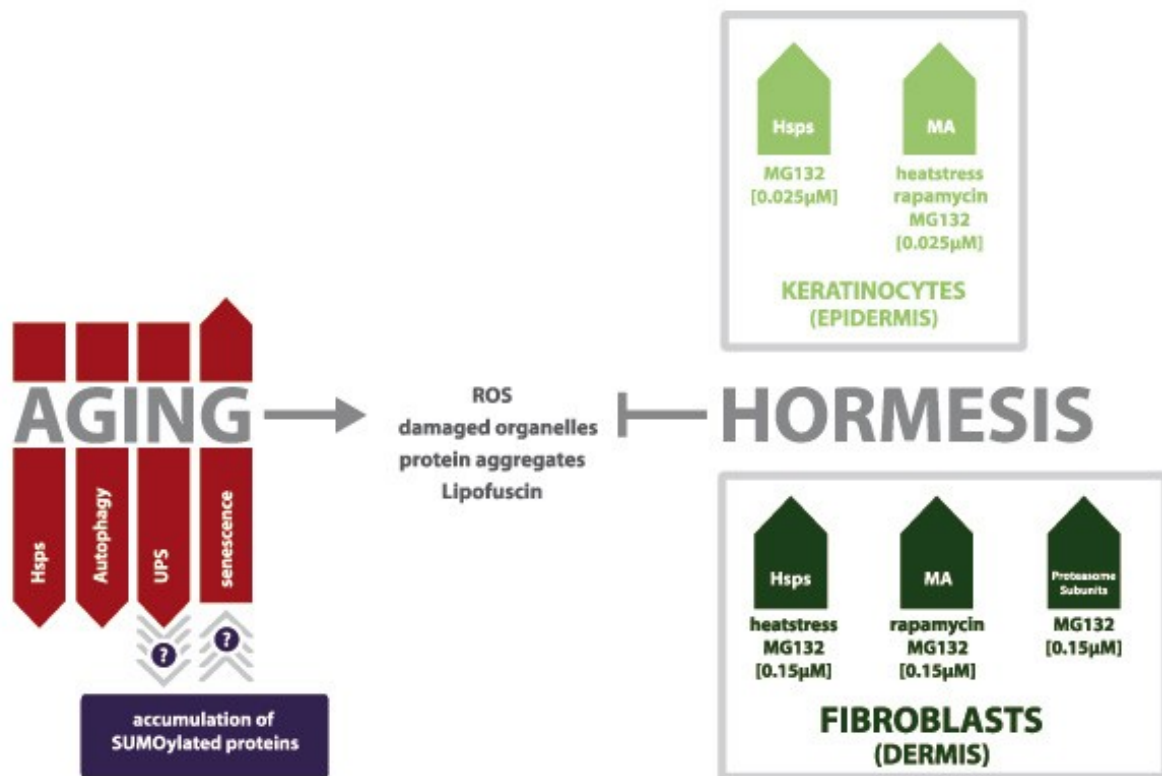
Über die SUMOylierung von Proteinen und die zugrunde liegenden Mechanismen in der Haut ist wenig bekannt. Die Rolle von SUMO-1 bei der Modifikation von PML und der Bildung von NB in primären embryonalen Fibroblasten und Keratinocyten aus Mäusen wurde von Zhong et al. (2000) beschrieben. Inzwischen wird an der Bedeutung der SUMOylierung bei Differenzierungsprozessen in der Haut geforscht. Ein neues Charakteristikum bei der Differenzierung von Keratinocyten ist die Hochregulation von Proteinen, die am Prozess der SUMOylierung beteiligt sind. Dazu gehören SAE1/2, Ubc9, SENP1 und SUMO-2/3 (Deyrieux et al., 2007; Vivo et al., 2009). Deyrieux et al. (2007) konnten zudem zeigen, dass eine Störung der SUMOylierungsprozesse zu abnormalen Differenzierungsprozessen in HaCaT-Zellen und primären Keratinocyten führt. Für einen korrekten Ablauf der Differenzierung ist die richtige Koordination von Transkriptionsfaktoren erforderlich. Es wird vermutet, dass SUMO hierbei von Bedeutung ist. Der Transkriptionsfaktor p63 reguliert und induziert beispielsweise die proliferative Aktivität von Keratinocyten und wird während Differenzierungsprozessen möglicherweise durch SUMOylierung herunterreguliert (Vivo et al., 2009).

SUMO ist auch in Bezug auf Alterungsprozesse ein Ziel der Forschung und könnte auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung junger Haut spielen. In verschiedenen Geweben wurde eine altersbedingte Zunahme SUMOylierter Proteine gefunden (Li et al., 2008; Zhang et al., 2007). Des Weiteren sind eine Reihe von mit zellulärer Seneszenz assoziierten Proteinen Zielproteine für SUMO und eine verstärkte SUMOylierung von bestimmten Proteinen kann zu einer verfrühten zellulären Seneszenz führen. Zu diesen Proteinen gehören p53 und pRB. p53 reguliert die Expression von Genen, deren Produkte Seneszenz einleiten. Li et al. (2006) konnten zeigen, dass eine Überexpression von SUMO-2/3 einen seneszenten Phänotyp von HEK293-Zellen und MEFs (mouse embryonic fibroblasts) zur Folge hat und führen dies auf die verstärkte SUMOylierung von p53 und pRB zurück. Überexpression der E3-SUMO-Ligase PIASy fördert die SUMOylierung und damit die Aktivierung von p53 und pRB. Auf diese Weise reguliert PIASy also die Induktion von zellulärer Seneszenz (Bischof et al., 2006). Die SUMO-Protease SENP1 wirkt ihr entgegen (Yates et al., 2008).

Die Funktion der Telomere ist für die Aufrechterhaltung der Proliferation von Zellen erforderlich. Auch in diesen Prozess ist SUMO involviert. In der Hefe führt die Deletion von SUMO und PIAS zu verlängerten Telomeren, was darauf hinweist, dass SUMO die Länge der Telomere negativ kontrolliert (reviewed in Andreou und Tavernarakis, 2010). Diese Arbeiten lassen den Schluss zu, dass SUMO eine Funktion beim Einleiten von Alterungsprozessen in der Haut besitzt. In anderen Geweben, wie der Milz von Nagetieren oder Gehirnen von Mäusen, wurde schon eine auf Alterungsprozesse zurückzuführende Zunahme SUMOylierter Proteine gefunden (reviewed in Andreou und Tavernarakis, 2010).

## 6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die Auslösung hormetischer Effekte in der Haut ein viel versprechendes Ziel darstellt und zu einer Aufrechterhaltung junger Haut beitragen kann. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, dass zelltypspezifische Antworten ausgelöst werden und Fibroblasten und Keratinocyten unterschiedliche Empfindlichkeiten und Stressantworten aufweisen. Eine Zusammenfassung, wie hormetische Effekte Alterungsprozessen und deren Folgen in der Haut entgegenwirken könnten, ist in der Übersicht dargestellt (Abb. 47).



**Abb. 47: Hormetische Einflüsse auf Alterungsprozesse in der Haut.** In der alternden Haut nimmt die Fähigkeit zur Induktion der Hsps ab, die Aktivität der degradativen Systeme sinkt und seneszente Zellen akkumulieren. Die Abschwächung des UPS könnte eine Anreicherung SUMOylierter Proteine bedingen, die u. a. den Eintritt von Zellen in die Seneszenz regulieren und diese so fördern. Hormetische Effekte können durch MG132, Hitzestress oder Rapamycin erzielt werden. 0,025 µM MG132 führen in Keratinocyten zur Induktion von Hsps und MA. Hierfür sind in Fibroblasten höhere Konzentrationen von 0,15 µM MG132 notwendig. In beiden Zelltypen führt Rapamycin zur Induktion von MA. Hitzestress induziert in Keratinocyten MA und in Fibroblasten Hsps. Als Wirkstoff, mit dem hormetische Effekte in der Haut in Form einer Stimulation der degradativen Systeme und der Induktion von Hsps erzielt werden können, wäre ein proteasomaler Inhibitor denkbar.

In Alterungsprozessen nimmt in vielen Geweben die Fähigkeit zur Induktion von Hsps ab (reviewed in Calderwood et al., 2009), die Aktivität der degradativen Systeme sinkt (Bergamini et al., 2004; Del Roso et al., 2003; Dasuri et al., 2009) und seneszente Zellen

häufen sich an (reviewed in Vicencio et al., 2008). Diese Zusammenhänge sind auch für die Haut beschrieben (Bulteau et al., 2000; Petropoulos et al., 2000) (Abb. 47). Ob auch der Prozess der Autophagie in der alternden Haut abgeschwächt wird, muss in weiteren Studien untersucht werden. Folgen dieser Alterungsprozesse in der Haut sind u. a. der Anstieg von ROS, die Akkumulation geschädigter Organellen (Stroikin et al., 2004), Entstehung von Proteinaggregaten sowie Akkumulation von Lipofuscin (Stroikin et al., 2004) (Abb. 47). Dies kann zu Störungen bei der Zelldifferenzierung und Zellproliferation führen, die Zellhomöostase und die Homöostase in den Hautschichten stören und letztendlich zu Gewebeschädigungen und einem alternden Hautbild führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass proteasomale Inhibition und Behandlung mit Rapamycin in Keratinocyten und auch in Fibroblasten zu einer Induktion von MA führen. In beiden Zelltypen ist es zudem möglich, die Hitzeschockantwort durch proteasomale Inhibition zu induzieren (Abb. 47). Ein proteasomaler Inhibitor wäre somit als Wirkstoff denkbar, mit dem hormetische Effekte in der Haut in Form einer Stimulation der degradativen Systeme und der Induktion von Hsps erzielt werden können. In diesem Zusammenhang stellt allerdings die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Zelltypen auf proteasomale Inhibition ein Problem dar. Die Stressantworten der Fibroblasten in der Dermis werden erst bei Konzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132, die für die Keratinocyten in der darüber liegenden Epidermis cytotoxisch sind, stimuliert. Um die Keratinocyten in der Epidermis nicht zu stark zu schädigen, müsste ein auf proteasomaler Inhibition basierender Wirkstoff gering dosiert eingesetzt werden, würde dann aber die Fibroblasten in der Dermis nicht stimulieren. Eine Möglichkeit, die Zellen beider Hautschichten zu stimulieren, wäre Hitzestress. Dieser könnte durch Wirkstoffe erzielt werden, die auf der Haut Hitze produzieren.

Welche Rolle SUMO in der Haut spielt, muss weiter untersucht werden. Die vorliegende Arbeit lässt den Schluss zu, dass SUMOylierte Proteine in Fibroblasten und Keratinocyten dem Proteasom zur Degradation zugeführt werden, da dessen Inhibition zu einer Akkumulation SUMOylierter Proteine führt. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch in diesem Zusammenhang die Stimulation der degradativen Systeme durch hormetische Effekte in der alternden Haut von Bedeutung ist. Der korrekte Ablauf von SUMOylierungsprozessen ist entscheidend für die Differenzierungsprozesse in der Epidermis (Deyrieux et al., 2007). In alternden Geweben wurde eine Akkumulation SUMOylierter Proteine gefunden (Li et al., 2008; Zhang et al., 2007). Möglicherweise ist eine Abschwächung der Aktivität der

degradativen Systeme hierfür der Grund (Abb. 47). Dann wäre es möglich, dass eine Akkumulation SUMOylierter Proteine an der Anhäufung seneszenten Zellen in alternden Geweben beteiligt ist, da viele Proteine, die Seneszenz regulieren, durch SUMOylierung kontrolliert werden (Li et al., 2006) (Abb. 47).

Um Wirkstoffe, die hormetische Effekte in der Haut erzielen, zu entwickeln, bedarf es noch weiterer ausgeprägter Forschung. Microarraystudien wären eine geeignete Methode, um die komplexen Abläufe in der Haut in einem großen Zusammenhang zu untersuchen und um die Auswirkungen verschiedener Substanzen nicht nur im Zellkulturmodell, sondern vor allem im Gewebeverband charakterisieren zu können. Die Haut beinhaltet neben Fibroblasten und Keratinocyten noch weitere hoch differenzierte Zelltypen wie Melanocyten, Adipocyten und Langerhanszellen, die elementare Funktionen in der Haut übernehmen. Es ist wichtig, auch die Reaktionen dieser Zelltypen auf proteasomalen Stress und Hitzeeinwirkung abzuklären. Dies muss in weiteren Studien geschehen.

Darüber hinaus ist die Haut für die weitere grundlegende Erforschung hormetischer Effekte ein interessantes Organ, da sie eine Anzahl verschiedener Zell- und Gewebetypen beinhaltet. In der Haut befinden sich Stammzellen und es laufen komplexe Signaltransduktionswege und Differenzierungsprozesse ab. Entzündliche Prozesse und Krebs spielen in der Haut ebenfalls eine große Rolle. Des Weiteren ist die Haut leicht zugänglich für Studien. All dies macht sie zu einem interessanten Studienobjekt.



## 7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob über eine Inhibition des proteasomalen Apparates hormetische Effekte in Hautzellen erzielt werden können, die Hautalterungsprozessen entgegenwirken können. Unter Hormesis werden positive physiologische Auswirkungen verstanden, die durch sehr geringe Konzentrationen von anderweitig cytotoxischen Substanzen ausgelöst werden und vermutlich durch die Anregung zellulärer Reparaturmechanismen entstehen. Hierfür wurden humane Fibroblasten und Keratinocyten, die aus Biopsiematerial von verschiedenen Spendern stammten, kultiviert und mit MG132, einem synthetischen Inhibitor des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS), behandelt. Um hormetische Effekte zu erfassen, wurden folgende Parameter charakterisiert:

- (1) Die Induktion von Hitzeschockproteinen (Hsps), deren Produktion bei Alterungsprozessen abnimmt und denen eine protektive Wirkung zugesprochen wird.
- (2) Die Aktivierung von Makroautophagie (MA), einem lysosomalen Proteinabbauweg, über den nicht-essentielle oder defekte Organellen und größere Proteinaggregate aus den Zellen beseitigt werden, was Zellüberleben fördern und eine adaptive Antwort auf zelluläre Stresssituationen darstellen kann.
- (3) Posttranslationale Veränderungen von Proteinen durch SUMO (small ubiquitin related modifier), i.e. eine SUMOylierung, die bei Differenzierungs- und Alterungsprozessen beteiligt sein kann.

Cytotoxizitätsassays verdeutlichen, dass Keratinocyten empfindlicher auf proteasomalen Stress reagieren als Fibroblasten. In Fibroblasten führt MG132 in Konzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$  und in Keratinocyten in Konzentrationen von 0,025  $\mu\text{M}$  zu vergleichbaren cytotoxischen Effekten und vergleichbarer Inhibition der Proteasomen. Der Konzentrationsunterschied in der Sensitivität gegenüber MG132 wird auch in Immunfluoreszenzstudien deutlich, die zeigen, dass eine Behandlung von Keratinocyten mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 bereits nach 24h Ubiquitin-positive, aggresomenartige Strukturen entstehen lässt, die hingegen in Fibroblasten bei dieser Konzentration nicht zu erkennen sind. Erst ab einer Konzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 bilden sich im Cytoplasma der Fibroblasten kleine Aggregate. Aggresomen entstehen in diesen Zellen bei hohen Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  MG132. Zudem wird in Keratinocyten bei proteasomalem Stress bereits nach 24h der apoptotische Zelltod induziert, während dieser in Fibroblasten erst nach 48h eintritt.

MG132 führt in beiden Zelltypen zu einer Induktion von Hsps. Diese Stressantwort wird ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erzielt. In Fibroblasten führen Konzentrationen von 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 zur Induktion der Hsps Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27 und  $\alpha\text{B}$ -Crystallin. In Keratinocyten induzieren deutlich geringere Konzentrationen von 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 die verstärkte Synthese von Hsp90, Hsp70, Hsp40 und Hsp27.

Die Induktion von Hsps konnte in Microarraystudien auf mRNA-Ebene für Fibroblasten bestätigt werden. Ebenso wurde eine Induktion von Hsp90, Hsp70, Hsp27 und  $\alpha\text{B}$ -Crystallin durch MG132 in Hautmodellen beobachtet.

Proteasomaler Stress induziert in Fibroblasten und Keratinocyten neben Hsps auch MA. Nach Behandlung mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 ist in Keratinocyten schon nach 1h eine Zunahme von MA zu detektieren. 0,15  $\mu\text{M}$  MG132 führen in Fibroblasten erst nach 18h zu dieser Reaktion. Auch dies weist auf die größere Empfindlichkeit von Keratinocyten gegenüber MG132 hin.

Die Bedeutung der MA wurde durch Applikation von 3-Methyladenin (3-MA), einem Inhibitor der MA, analysiert. 5 mM 3-MA sensibilisieren Keratinocyten nach 24h für proteasomalen Stress signifikant, Fibroblasten erst nach 48h. Diese Ergebnisse zeigen, dass die MG132-induzierte MA in beiden Zelltypen als ein protektiver Mechanismus angesehen werden kann, der eine verminderte Aktivität des Proteasoms kompensiert.

Die langfristige pharmakologische Inhibierung von MA hat im Gegensatz zu Keratinocyten eine Sensibilisierung von Fibroblasten gegenüber MG132-induziertem apoptotischen Zelltod zur Folge, was darauf hindeutet, dass die MG132-induzierte MA in Fibroblasten ein Mechanismus ist, der dem apoptotischen Zelltod entgegenwirkt.

Ein dritter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Bedeutung der SUMOylierung von Proteinen im UPS. Nach proteasomaler Inhibition verhalten sich Fibroblasten und Keratinocyten in Bezug auf die SUMOylierung von Proteinen durch SUMO-1 ähnlich. Im Western Blot ist nach Behandlung von Fibroblasten mit 0,15  $\mu\text{M}$  und von Keratinocyten mit 0,025  $\mu\text{M}$  MG132 eine Akkumulation SUMOylierter Proteine zu beobachten, wobei sich das Bandenmuster jeweils nicht verändert.

Mittels sequentieller Extraktionen von Totalhomogenaten unbehandelter und mit MG132 behandelter Zellen in Puffern mit ansteigender Solubilisierungskapazität für Proteine konnte gezeigt werden, dass sich Ubiquitin und SUMO-1 nach proteasomaler Inhibition in beiden Zelltypen in unlöslichen zellulären Fraktionen befinden. In anschließenden Immunfluoreszenzstudien wurde SUMO-1 teilweise in Ubiquitin-positiven Aggresomen

detektiert. Zusätzliche Untersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zeigten, dass nicht alle Ubiquitin-positiven Aggregate und Aggresomen SUMO-1 enthalten, was darauf hindeutet, dass SUMO-1 in manchen Fällen neben Ubiquitin als sekundäres Signal für den proteasomalen Abbau dient.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Grundlagen für die Erzielung hormetischer Effekte in der Haut durch Modulation der degradativen Systeme und der Hitzeschockantwort in primären humanen Fibroblasten und Keratinocyten geschaffen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Alterungsprozessen in der Haut, wie beispielsweise einer verringerten Aktivität der degradativen Systeme und einer abgeschwächten Hitzeschockantwort, durch hormetische Effekte entgegengewirkt werden kann. Als Wirkstoffe kämen Proteasomeninhibitoren in Frage, oder Substanzen, die auf der Haut Wärme produzieren. Hierbei sind die Unterschiede in den Reaktionen von Fibroblasten und Keratinocyten auf diese Stimuli zu beachten.

## 8 Summary

The aim of this thesis was to determine, whether hormetic effects, attenuating aging processes in skin cells, can be achieved by inhibiting the proteasomal system. The term hormesis describes positive physiological effects of low concentrations of otherwise harmful agents by stimulating cellular repair mechanisms. For this purpose human fibroblasts and keratinocytes derived from biopsies of different donors were cultured and incubated with MG132, a proteasomal inhibitor. In order to characterize hormetic effects, the following parameters were evaluated:

- (1) Induction of heat shock proteins (Hsps), which have cell protecting functions and whose production decreases in aging processes.
- (2) Induction of macroautophagy (MA), a lysosomal protein degradation pathway to remove non essential and defective organelles and protein aggregates from the cell. This mechanism enhances cell survival and can be an adaptive response to cellular stress.
- (3) Posttranslational modifications of proteins by SUMO (small ubiquitin related modifier), i.e. a SUMOylation, which can be involved in cell differentiation and aging.

Cytotoxicity assays demonstrate, that keratinocytes are much more sensitive to proteasomal stress than fibroblasts. 0.15  $\mu\text{M}$  concentrations of MG132 in fibroblasts and 0.025  $\mu\text{M}$  concentrations of MG132 in keratinocytes lead to comparable cytotoxic effects and comparable proteasomal inhibition. This difference in sensitivity to MG132 was also apparent in indirect immunofluorescence studies. In keratinocytes a 24h treatment with 0.025  $\mu\text{M}$  MG132 results in the formation of ubiquitin-positive aggresomal structures, which cannot be detected in fibroblasts. In fibroblasts cytoplasmic ubiquitin-positive aggregates are only detectable using MG132 concentrations of 0.15  $\mu\text{M}$  or higher and aggresomes are visible after the treatment with 1  $\mu\text{M}$ . Furthermore, during proteasomal stress after 24h treatment apoptosis is induced in keratinocytes, while in fibroblasts apoptotic death is found to be activated only after a 48h treatment.

Furthermore, incubation with MG132 leads to the induction of Hsps in both cell types. This stress response is also achieved by different concentration ranges. In fibroblasts 0.15  $\mu\text{M}$  of MG132 causes the induction of Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27 and  $\alpha\text{B}$ -crystallin (24h). In keratinocytes Hsp90, Hsp70, Hsp40 and Hsp27 are upregulated at a much lower concentration of 0.025  $\mu\text{M}$  MG132.

An increased expression of Hsp-genes in fibroblasts could also be shown using DNA microarray approaches. Additionally, an induction of Hsp90, Hsp70, Hsp27 und  $\alpha$ B-crystallin by MG132 was detected in tissues using skin models.

Proteasomal stress induces also MA in fibroblasts and keratinocytes in addition to Hsps. A 1h treatment with 0.025  $\mu$ M MG132 leads to an increase of MA in keratinocytes, while this reaction can be detected in fibroblasts after a 18h treatment with 0.15  $\mu$ M MG132.

The impact of MA was analyzed by application of 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of MA. 5 mM 3-MA sensitize keratinocytes to proteasomal stress after 24h significantly, fibroblasts after 48h. These results show that MA induced by MG132 functions as a protective mechanism that can compensate a decreased proteasomal activity in both cell types.

A continued pharmacological inhibition of MA causes a sensitization of fibroblasts and not of keratinocytes to MG132 induced apoptosis. This leads to the assumption, that MA induced by MG132 functions in fibroblasts as a mechanism to protect them from apoptosis.

The study further demonstrates that protein SUMOylation is modified by proteasomal inhibition. As shown by Western blot analysis, fibroblasts and keratinocytes similarly respond to proteasomal inhibition in regard to SUMOylation of proteins by SUMO-1. Treatment of fibroblasts with 0.15  $\mu$ M MG132 and of keratinocytes with 0.025  $\mu$ M MG132 leads to an accumulation of SUMOylated proteins, without any obvious changes in the protein pattern of the detected bands. Sequential protein extraction was carried out with total cell homogenates of untreated and MG132-treated fibroblasts and keratinocytes in buffers with increasing capability to solubilize proteins. Ubiquitin and SUMO-1 are found in the insoluble fractions after treatment with MG132. Immunofluorescence studies showed that SUMO-1 is located partly in ubiquitin-positive aggresomes. Confocal laser scanning microscopy analysis indicates that SUMO-1 is located only in some of the ubiquitin-positive aggregates and aggresomes. These observations indicate that SUMO-1, besides ubiquitin, may serve as a secondary signal for proteasomal degradation.

To summarize, the present study demonstrates that hormetic effects in the skin by modulating the protein degradation systems and the heat shock responses may be achieved in primary human fibroblasts and/or keratinocytes. The results indicate that hormetic effects may ameliorate skin aging processes by stimulating the activity of the protein degradation systems

and by augmenting the heat stress response. Proteasomal inhibitors or substances generating thermal stress on the skin are probable agents. However, the differences in sensitivity of fibroblasts and keratinocytes to these stimuli have to be considered.

## 9 Literatur

**Andreou** AM, Tavernarakis N. (2010) Roles for SUMO modification during senescence. *Adv Exp Med Biol.* 694:160-71. Review.

**Aymard** E, Barruche V, Naves T, Bordes S, Closs B, Verdier M, Ratinaud MH. (2010) Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp Dermatol.* doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01157.x. [Epub ahead of print]

**Bailey** D, O'Hare P. (2005) Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem J.* 392(Pt 2):271-81.

**Beedholm** R, Clark BF, Rattan SI (2004) Mild heat stress stimulates 20S proteasome and its 11S activator in human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Cell Stress Chaperones.* 9(1):49-57.

**Bergamini** E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. (2004) The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed Pharmacother.* 57(5-6):203-8. Review.

**Berge** U, Kristensen P, Rattan SI. (2008) Hormetic modulation of differentiation of normal human epidermal keratinocytes undergoing replicative senescence in vitro. *Exp Gerontol.* 43(7):658-62.

**Bischof** O, Schwamborn K, Martin N, Werner A, Sustmann C, Grosschedl R, Dejean A. (2006) The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol Cell.* 2006 Jun 23;22(6):783-94.

**Bohren** KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 279(26):27233-8.

**Bolhuis** S, Richter-Landsberg C. (2010) Effect of proteasome inhibition by MG-132 on HSP27 oligomerization, phosphorylation, and aggresome formation in the OLN-93 oligodendroglia cell line. *J Neurochem.* 114(4):960-71.

**Boya** P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 25(3):1025-40.

**Bulteau** AL, Petropoulos I, Friguet B. (2000) Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol.* 35(6-7):767-77.

**Bursch** W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS. (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis.* 17(8):1595-607.

**Bursch** W. (2004) Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Res.* 5(2):101-10.

**Calderwood** SK, Murshid A, Prince T. (2009) The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology.* 55(5):550-8.

**Cavallini** G, Donati A, Taddei M, Bergamini E. (2007) Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging. *Autophagy.* 3(1):26-7.

- Chondrogianni** N, Stratford FL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ, Gonos ES. (2003) Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem.* 278(30):28026-37.
- Chung** JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. (2000) Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2000 Aug;115(2):177-82.
- Ciechanover**, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17(24): 7151-7160
- Concannon** CG, Gorman AM, Samali A. (2003) On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis.* 8(1):61-70.
- Cuervo** AM, Dice JF. (2000) Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 275(40):31505-13.
- Cuervo** AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A. (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy.* 1(3):131-40. Review.
- Dasuri** K, Zhang L, Ebenezer P, Liu Y, Fernandez-Kim SO, Keller JN. (2009) Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver. *Mech Ageing Dev.* 130(11-12):777-83.
- Del Rosso** A, Vittorini S, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Masini M, Pollera M, Bergamini E. (2003) Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol.* 38(5):519-27.
- Desterro** JM, Rodriguez MS, Hay RT (1998) SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell.* 2(2):233-9.
- Deyrieux** AF, Rosas-Acosta G, Ozburn MA, Wilson VG (2007) Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *J Cell Sci.* 120(Pt 1):125-36.
- Dice** JF. (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 3(4):295-9. Review.
- Ding** WX, Yin XM. (2008) Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 4(2):141-50.
- Donati** A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, Bergamini E. (2001) Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 56(7):B288-93.
- Dorval** V, Fraser PE. (2006) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 281(15):9919-24.
- Downing** DT. (1992) Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res.* 33(3):301-13. Review.
- Ehrnsperger** M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J. (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16(2): 221-229
- Elias** PM, Ghadially R. (2002) The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities. *Clin Geriatr Med.* 18(1):103-20, vii. Review.



- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ.** (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15(12):2286-7.
- Fimia GM, Piacentini M.** (2010) Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 67(10):1581-8. Review.
- Flight MH** (2007) Axonal transport: SUMMed back to the nucleus - NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE, 2007 - nature.com
- Fonager J, Beedholm R, Clark BF, Rattan SI** (2002) Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol.* 37(10-11):1223-8.
- Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L.** (2007) The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis.* 25(2):252-65.
- Gareau JR, Lima CD.** (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(12):861-71.
- Garrido C, Solary E** (2003) A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ.* 10(6): 619-620
- Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, French M.** (2003) Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol.* 38(8):887-95.
- Gerstein AD, Phillips TJ, Rogers GS, Gilchrest BA** (1993) Wound healing and aging. *Dermatol Clin.* 11(4):749-57.
- Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, Voellmy R.** (2005) Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6:4.
- Goldbaum O, Riedel M, Stahnke T, Richter-Landsberg C.** (2009) The small heat shock protein HSP25 protects astrocytes against stress induced by proteasomal inhibition. *Glia.* 57(14):1566-77.
- Gosselin K, Deruy E, Martien S, Vercamer C, Bouali F, Dujardin T, Slomianny C, Houel-Renault L, Chelli F, De Launoit Y, Abbadie C.** (2009) Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am J Pathol.* 174(2):423-35.
- Hamasaki M, Yoshimori T.** (2010) Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett.* 584(7):1296-301.
- Haruna K, Suga Y, Muramatsu S, Taneda K, Mizuno Y, Ikeda S, Ueno T, Kominami E, Tanida I, Tanida I, Hanada K.** (2008) Differentiation-specific expression and localization of an autophagosomal marker protein (LC3) in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 52(3):213-5.
- Hay, R. T.** (2001) Protein modification by SUMO. *Trends in Biochem. Sci.* 26(5): 332-333
- Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L.** (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol.* 23(8):2953-68.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD.** (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 276(43):40263-7.

**Huang S**, Bjornsti MA, Houghton PJ. (2003) Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther.* 2(3):222-32.

**Huang TT**, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. (2003) Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.* 115(5):565-76.

**Isik S**, Sano K, Tsutsui K, Seki M, Enomoto T, Saitoh H, Tsutsui K. (2003) The SUMO pathway is required for selective degradation of DNA topoisomerase IIbeta induced by a catalytic inhibitor ICRF-193(1). *FEBS Lett.* 546(2-3):374-8.

**Ito S**, Koshikawa N, Mochizuki S, Takenaga K. (2007) 3-Methyladenine suppresses cell migration and invasion of HT1080 fibrosarcoma cells through inhibiting phosphoinositide 3-kinases independently of autophagy inhibition. *Int J Oncol.* 31(2):261-8.

**Iwata A**, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem.* 280(48):40282-92.

**Jakob U**, Gaestel M, Engel K, Buchner J. (1993) Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem.* 268(3): 1517-1520

**Jänen SB**, Chaachouay H, Richter-Landsberg C. (2010) Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia.* 58(14):1766-74.

**Jia L**, Dourmashkin RR, Allen PD, Gray AB, Newland AC, Kelsey SM. (1997) Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol.* 98(3):673-85.

**Johnston JA**, Ward CL, Kopito RR. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143(7):1883-98.

**Jonak C**, Klosner G, Trautinger F. (2006) Heat shock proteins in the skin. *Int J Cosmet Sci.* 28(4):233-41.

**Kaiser P**, Fon EA. (2007) Expanding horizons at Big Sky. Symposium on ubiquitin and signaling. *EMBO Rep.* 8(9):817-22.

**Kaushik S**, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM. (2008) Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol Biol Cell.* 19(5):2179-92.

**Kim D**, Kim SH, Li GC. (1999) Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 254(1):264-8.

**Kissová I**, Deffieu M, Manon S, Camougrand N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem.* 279(37):39068-74.

**Kitanaka C**, Kuchino Y. (1999) Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 16(6):508-15. Review.

**Klionsky DJ**, Cuervo AM, Seglen PO. (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.* 3(3):181-206.

**Klionsky DJ**. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11):931-7.

- Kopito**, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10(12): 524-530
- Kraft** DC, Deocaris CC, Wadhwa R, Rattan SI. (2006) Preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 enhances proteasome activity via the Nrf2 transcription factor in aging human skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1067:420-4.
- Kraft** C, Peter M, Hofmann K. (2010) Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol.* 12(9):836-41.
- Lawen** A. (2003) Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 25(9):888-96. Review.
- Lecker**, S. H., A. L. Goldberg, W. E. Mitch (2006) Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 1807-1819
- Lee**, D. H., A. L. Goldberg (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists.
- Lee** CS, Tee LY, Warmke T, Vinjamoori A, Cai A, Fagan AM, Snider BJ. (2004) A proteasomal stress response: pre-treatment with proteasome inhibitors increases proteasome activity and reduces neuronal vulnerability to oxidative injury. *J Neurochem.* 91(4):996-1006.
- Li** T, Santockyte R, Shen RF, Tekle E, Wang G, Yang DC, Chock PB. (2006) Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J Biol Chem.* 0281(47):36221-7.
- Li** F, Zhang L, Craddock J, Bruce-Keller AJ, Dasuri K, Nguyen A, Keller JN. (2008) Aging and dietary restriction effects on ubiquitination, sumoylation, and the proteasome in the heart. *Mech Ageing Dev.* 129(9):515-21.
- Liang** XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol.* 72(11):8586-96.
- Mahajan** R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 88(1):97-107.
- Martinez-Vicente** M, Sovak G, Cuervo AM. (2005) Protein degradation and aging. *Exp Gerontol.* 40(8-9):622-33. Review.
- Massey** AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, Cuervo AM. (2006) Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103(15):5805-10.
- Matafora** V, D'Amato A, Mori S, Blasi F, Bachi A. (2009) Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Mol Cell Proteomics.* 8(10):2243-55.
- Matunis** MJ, Coutavas E, Blobel G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 135(6 Pt 1):1457-70.
- Mehrpour** M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. (2010) Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 20(7):748-62. Review.
- Meiners** S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, Krüger E. (2003) Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem.* 278(24):21517-25.

- Miteva M**, Keusekotten K, Hofmann K, Praefcke GJ, Dohmen RJ. (2010) Sumoylation as a signal for polyubiquitylation and proteasomal degradation. *Subcell Biochem.* 2010;54:195-214.
- Mizushima N**, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 27(6):421-9.
- Mizushima N.** (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(12):2491-502. Review.
- Myung, J.**, K. B. Kim, C. M. Crews (2001) The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21(4): 245-273
- Neuhoff V**, Philipp K, Zimmer HG, Mesecke S. (1979) A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 360(11):1657-70.
- Nielsen ER**, Eskildsen-Helmond YE, Rattan SIS (2006) MAP kinases and heat shock-induced hormesis in human fibroblasts during serial passaging in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1067:343-8.
- Nixon RA.** (2006) Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci.* 29(9):528-35
- Njemini R**, Abeele MV, Demanet C, Lambert M, Vandebosch S, Mets T. (2002) Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol.* 22(4):195-205.
- Pattingre S**, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 122(6):927-39.
- Pattingre S**, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 90(2):313-23. Review
- Petropoulos I**, Conconi M, Wang X, Hoemel B, Brégégère F, Milner Y, Friguet B. (2000) Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55(5):B220-7.
- Pyo JO**, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Ohsumi Y, Jung YK. (2005) Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem.* 280(21):20722-9.
- Rattan SIS** (2004) Slowing down aging from within: mechanistic aspects of anti-aging hormetic effects of mild heat stress on human cells. *Acta Biochim Pol.* 51(2):481-92. Review.
- Rattan SIS** (2005) Principles and practice of hormesis as an aging intervention. In: Rattan SIS (ed) *Aging interventions and therapies.* World Scientific, Singapore, pp 365–377
- Rattan SI**, Ali RE. (2007) Hormetic prevention of molecular damage during cellular aging of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:424-30.
- Richter-Landsberg, C.**, O. Goldbaum (2003) Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease. *Cell Mol. Life. Sci.* 60(2): 337-349
- Rodriguez-Enriquez S**, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. (2006) Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy.* (1):39-46.

- Rosas-Acosta** G, Russell WK, Deyrieux A, Russell DH, Wilson VG. (2005) A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics*. 4(1):56-72.
- Rubinsztein** DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A. (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. 1(1):11-22. Review.
- Saeki** K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F. (2000) Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ*. 7(12):1263-9.
- Saitoh** H, Hinchey J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*. 275(9):6252-8.
- Schimmel** J, Larsen KM, Matic I, van Hagen M, Cox J, Mann M, Andersen JS, Vertegaal AC. (2008) The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol Cell Proteomics*. (11):2107-22.
- Söti** C, Csermely P. (2007) Aging cellular networks: chaperones as major participants. *Exp Gerontol*. 42(1-2):113-9. Review
- Söti** C, Csermely P. (2003) Aging and molecular chaperones. *Exp Gerontol*. (10):1037-40. Review
- Seglen** PO, Gordon PB. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(6):1889-92.
- Shimizu** S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. 6(12):1221-8.
- Snider** NT, Weerasinghe SV, Iñiguez-Lluhí JA, Herrmann H, Omary MB. (2011) Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation. *J Biol Chem*. 286(3):2273-84.
- Steffan** JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*. 304(5667):100-4.
- Stroikin** Y, Dalen H, Löf S, Terman A. (2004) Inhibition of autophagy with 3-methyladenine results in impaired turnover of lysosomes and accumulation of lipofuscin-like material. *Eur J Cell Biol*. 83(10):583-90.
- Sunderkötter** C, Kalden H, Luger TA. (1997) Aging and the skin immune system. *Arch Dermatol*. 133(10):1256-62. Review.
- Suter** MM, Schulze K, Bergman W, Welle M, Roosje P, Müller EJ. (2009) The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol*. 20(5-6):515-32. Review.
- Thériault**, J. R., H. Lambert, A. T. Chávez-Zobel, G. Charest, P. Lavigne, J. Landry (2004) Essential role of the NH<sub>2</sub>-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J. Biol. Chem*. 279(22): 23463-71
- Thorburn** A. (2008) Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 13(1):1-9. Review.

- Torres CA, Perez VI.** (2008) Proteasome modulates mitochondrial function during cellular senescence. *Free Radic Biol Med.* 44(3):403-14.
- Uzunova K, Götttsche K, Miteva M, Weisshaar SR, Glanemann C, Schnellhardt M, Niessen M, Scheel H, Hofmann K, Johnson ES, Praefcke GJ, Dohmen RJ.** (2007) Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem.* 282(47):34167-75.
- van Niekerk EA, Willis DE, Chang JH, Reumann K, Heise T, Twiss JL.** (2007) Sumoylation in axons triggers retrograde transport of the RNA-binding protein La. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(31):12913-8.
- Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH.** (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 20(15):5454-68.
- Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ, Voorhees JJ.** (2000) Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol.* 114(3):480-6.
- Verbeke P, Clark BF, Rattan SI.** (2000) Modulating cellular aging in vitro: hormetic effects of repeated mild heat stress on protein oxidation and glycation. *Exp Gerontol.* 35(6-7):787-94. Review.
- Verbeke P, Clark BF, Rattan SI.** (2001) Reduced levels of oxidized and glycoxidized proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging in vitro. *Free Radic Biol Med.* 31(12):1593-602.
- Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G.** (2008) Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology.* 54(2):92-9. Review.
- Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V, La Mantia G.** (2009) Downregulation of DeltaNp63alpha in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle.* 8(21):3537-43.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM.** (2001) Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* 2001 Mar 6;11(5):361-5.
- Yates KE, Korbel GA, Shtutman M, Roninson IB, DiMaio D.** (2008) Repression of the SUMO-specific protease Senp1 induces p53-dependent premature senescence in normal human fibroblasts. *Aging Cell.* 7(5):609-21.
- Zhang L, Li F, Dimayuga E, Craddock J, Keller JN.** (2007) Effects of aging and dietary restriction on ubiquitination, sumoylation, and the proteasome in the spleen. *FEBS Lett.* 581(28):5543-7.
- Zhao R., M. Davey, Y. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt** (2005) Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone. *Cell* 120(5):715 – 727
- Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP.** (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 95(9):2748-52.

## 10 Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat, mich während meiner Promotion sehr intensiv betreut hat, immer ein offenes Ohr hatte und viel Zeit und Energie in meine Doktorarbeit investiert hat. Dafür danke ich ihr sehr.

Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch für sein Interesse an meiner Doktorarbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Diese Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung der Beiersdorf AG ermöglicht. Dr. Thomas Blatt und Dr. Annika Schrader danke ich für die effektive Zusammenarbeit in diesem sehr interessanten Kooperationsprojekt. Dr. Ute Breitenbach hat die ersten Monate dieses Projektes begleitet. Auch ihr danke ich für die gute Zusammenarbeit während dieser Zeit. Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Labors „Trockene Altershaut“ für die experimentelle Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und die nette Zeit während meiner Besuche in Hamburg bedanken.

Den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Neurobiologie“ danke ich für ihre Unterstützung bei fachlichen und experimentellen Fragen, sowie für ihre große Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit. Insbesondere möchte ich mich bei Olaf Goldbaum, Lisa Schwarz, Angelika Spanjer und Michael Riedel bedanken, die mich in vielen Momenten mit hilfreichen Gesprächen und Diskussionen unterstützt und mich während der letzten Jahre immer freundschaftlich begleitet haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Anke und Julian. Ihr habt mich immer gestärkt und mir auf unterschiedlichste Weise den Rückhalt gegeben, den ich für die Fertigstellung dieser Arbeit gebraucht habe.

## 11 Curriculum vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname: Sandra Annette Bolhuis  
Ammerländer Heerstr. 245  
26129 Oldenburg

Geburtsdatum: 17.11.1980

Geburtsort: Leer

### STUDIUM

**10/2007 – 06/2011 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg**  
Promotion in der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie/Neurochemie in Kooperation mit der Beiersdorf AG unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg mit dem Thema „Auswirkungen und zugrunde liegende Mechanismen von hormetischen Stimuli auf das Reparatur- und Regenerationsvermögen der Haut“

**08/2006 – 09/2007 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg**  
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie/Neurochemie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg mit dem Thema „Die Bedeutung von Hsp27 in OLN93-Zellen“

**03/2004 - 07/2006 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg**  
Hauptstudium im Diplomstudiengang Biologie

**10/2001 - 03/2004 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg**  
Grundstudium im Diplomstudiengang Biologie

### SCHULBILDUNG

**2000 Teletta-Groß-Gymnasium, Leer**  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife



## 12 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Oldenburg, d. 11.04.2011

S. Bolhuis

