

1. Einleitung

1.1 Proteinfaltung und Missfaltung

Der Mechanismus, wie Polypeptidketten in spezifische 3-dimensionale Proteinstrukturen übertragen werden, ist nicht bis in seine letzten Einzelheiten bekannt. Kodiert durch ihre Aminosäuresequenz scheint der Faltungsprozess über ein Transitionalstadium bis hin zum nativen Protein nicht über eine festgelegte Reihenfolge von Zwischenstadien sondern vielmehr über eine stochastische Konformationsuche stattzufinden [1-4]. Hierbei ist neben der genetischen Determination das Erreichen der Niedrigsten-Energie-Struktur über ein ‚trial and error‘-System entscheidend, welches seit seiner Beschreibung im Jahre 1994 als ‚new view‘ der Protein-Faltung bezeichnet wird [5].

Nach der zellulären ribosomalen Proteinsynthese gibt es unterschiedliche Mechanismen, die zur Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur beitragen: (a) den co-translationalen Weg, bei dem der Faltungsprozess bereits bei noch bestehendem Kontakt der Polypeptidkette mit dem Ribosom beginnt, (b) zunächst die Trennung vom Ribosom mit Initiierung der Faltung im Zytosol oder (c) erst nach erfolgter Membrantranslokation in speziellen Zellkompartimenten wie den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum [6, 7].

Inkomplett oder fehlerhaft gefaltete Proteine führen zu gestörten Interaktionen mit anderen Molekülen und somit zu z.B. unphysiologischen Stoffwechselabläufen [8]. Lebende Systeme haben daraus resultierend eine Vielzahl von Kontroll- und Reparaturmechanismen entwickelt, um reibungslose Abläufe innerhalb ihrer funktionellen Einheiten zu gewährleisten. Als z.B. Faltungshilfen dienen die sogenannten Chaperone (chaperone [engl.] = Anstandsdame), die maßgeblich durch die Hitze-Schock-Proteine repräsentiert werden. Im weiteren gibt es zelluläre Qualitätskontrollsysteme wie den Ubiquitin-Proteasom-Komplex, der den Abbau missgefalteter oder denaturierter Eiweiße vermittelt. Dieser Vorgang ist in schematischer Form in **Abb. 1** illustriert und wird folgend im Detail dargelegt werden.

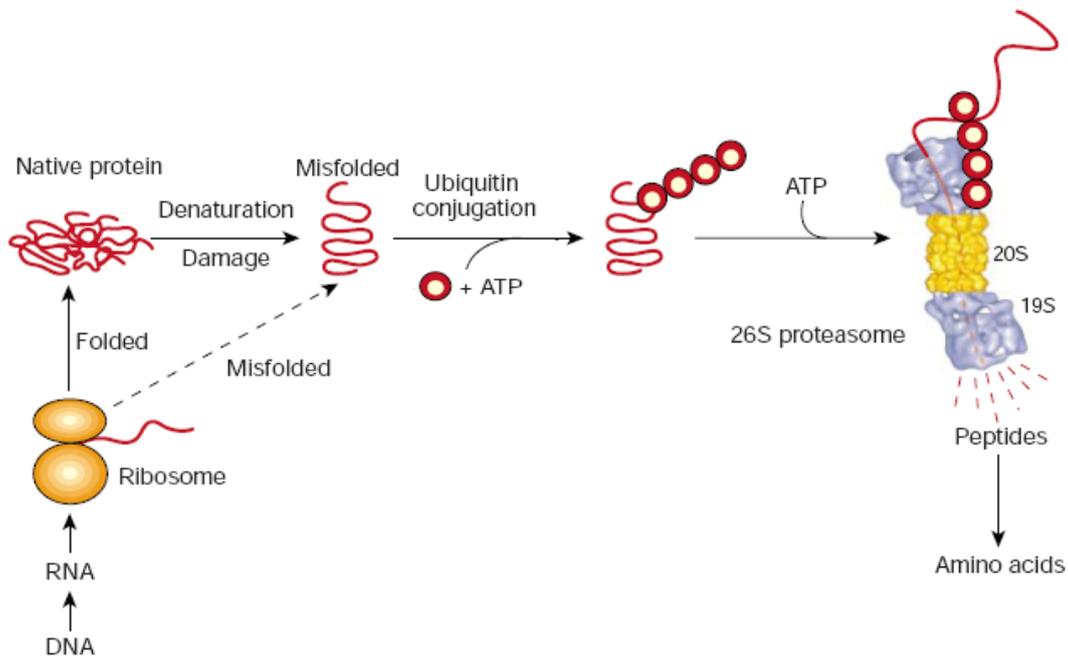


Abb. 1: Abbau missgefalteter Proteine.

Nicht korrekt gefaltete oder denaturierte Proteine werden im Zytoplasma polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Abbildung modifiziert nach [9]).

1.2 Der Ubiquitin-Proteasom-Komplex

Ein allgemeines Charakteristikum denaturierter Proteine ist die Eigenschaft zu aggregieren und auszufallen. Ursächlich hierfür sind die beim Abbau entstehenden hydrophoben Domänen, die in gegenseitige Wechselwirkung zu einander treten und eine Akkumulation von Peptidbruchstücken begünstigen. Ebenso kann es bei gesteigerter Produktion missgefalteter Proteine zu einer Überlastung der degradativen Zellkapazität kommen. Entsprechend führt dieses zur Bildung von Polypeptidaggregaten, die sich in eukaryoten wie auch bakteriellen Zellen granulaartig darstellen können und als ‚Inklusionen‘ bezeichnet werden [10, 11].

Der entscheidende und potenteste zelluläre Protein-Abbaumechanismus ist der über den Ubiquitin-Proteasom-Komplex. Kommt es, z.B. durch Exposition eines eukaryoten Organismus mit unphysiologisch hohen Temperaturen, zu einer Aggregation missgefalteter und bereits denaturierter Proteine, so triggert dieses die

ATP-abhängige Aktivierung des polypeptidischen Kofaktors Ubiquitin. Dieser, aufgebaut aus 76 Aminosäuren und 8,6 kDa groß, ist in allen eukaryotischen Zellen ubiquitär vorhanden und markiert über einen Energie verbrauchenden Konjugationsprozess die für den Abbau bestimmten Proteine. Nach initialer Aktivierung des Ubiquitins, über das Ubiquitin-aktivierende-Enzym (E1) an dessen C-terminalem Glycin-Ende, wird dieses zunächst an eines der 20 - 40 bereits bekannten Ubiquitin-Konjugations-Enzyme (E2) transferriert. Dieser hochselektive Vorgang wird durch hunderte von Ubiquitin-Ligasen (E3) gesteuert, welche ebenso spezifisch für dedizierte Proteinsubstrate sind. Im wesentlichen sind bis dato drei Klassen von E3-Ligasen klassifiziert: (1) HECT („homologues to E6-AP C terminus“), (2) RING („really interesting new gene“) und (3) „multi-subunit“ Komplexe wie der SCF („Skp1-Cullin-F-box“) -Komplex. Die Spezifität der einzelnen Ligasen ermöglicht über Bildung von Isopeptidbindungen eine kovalente Anlagerung des Ubiquitins an Aminogruppen von Lysinseitenketten des zu degradierenden Proteins und beeinflusst somit selektiv, abhängig vom „target“, den entsprechenden physiologischen oder pathophysiologischen Prozess [12, 13]. Ein Regulationsmechanismus, der im Fall einer myokardialen Hypertrophie entscheidend zu beeinflussen ist, wird durch die E3-Ligase MDM2 katalysiert. Durch die Ubiquitinierung des sarkomerischen Proteins T-cap (Telethonin) mit konsekutiv proteasomaler Degradation konnte ein verbessertes Zellüberleben bei Myokardhypertrophie *in vitro* gezeigt werden [14]. Ebenso wird MDM2 ein wesentlicher Einfluss auf das Zellwachstum durch die Proteasom-abhängige Degradation apoptotischer Proteine, wie z.B. p53, zugesprochen. Im Langendorff *ex vivo* Ischämie/Reperfusion-Modell konnte nach Inaktivierung von MDM2 eine vermehrte Apoptose mit verminderte funktioneller „Recovery“ beschrieben werden [15]. In diesen Prozess scheint ebenfalls die erst kürzlich beschriebene Co-Chaperone/Ubiquitin-Ligase, CHIP („Carboxy terminus of Hsp 70-Interacting Protein“), welche substratspezifisch den Katabolismus im Zusammenspiel mit Hsp 70 oder Hsp 90 katalysiert, involviert zu sein [16, 17]. Weitere Ubiquitin-Ligasen, die in katabolen Stoffwechselsituationen der Skelettmuskulatur induziert werden, sind Atrogin-1/MAFbx und MuRF-1. Bei, z.B. aufgrund von übermäßiger körperlicher Belastung, aktiviertem Ubiquitin-Proteasom-Komplex vermitteln diese Ligasen ein vermehrte Degradation von muskuloskelettalen Proteinen, insbesondere der Myofibrillen, und damit einhergehender Muskelatrophie [18, 19]. Nach

Substratubiquitinierung binden weitere Ubiquitinmoleküle an die an Position 48 gelegene Aminosäure Lysin (Lys⁴⁸) des bereits gebundenen Ubiquitins und es kommt zur Bildung einer an das Substrat gebundenen Ubiquitin-Kette. Neuere Ergebnisse zeigen, daß eine Mindestanzahl von 4 Ubiquitinmolekülen nötig ist um eine sichere Proteinmarkierung zu gewährleisten [20]. Dies ist eine der essentiellen Voraussetzungen für die folgende Degradation durch das 26S Proteasom [21, 22] (**Abb. 2**). Das Ubiquitinmolekül weist neben der bereits genannten noch 6 weitere Lysin-Seitenketten auf, von denen mindestens 4 (Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁹, Lys⁶³) als Bindungsstelle in der Polyubiquitinkette dienen können [23, 24]. Lys¹¹- und Lys²⁹-gekoppelte Polyubiquitinketten können ebenso Proteine für den proteasomalen Abbau markieren [25, 26]. Die Ubiquitinierung an den weiteren Lysin-Seitenketten signalisiert für nicht-proteolytische, reversible Ereignisse wie z.B. Proteinaktivität, subzelluläre Proteinlokalisierung oder Protein-Protein Interaktionen [27].

Wie der Name Ubiquitin suggerieren mag, besteht seine Funktion nicht nur im Degradationsprozess von Proteinen über das Proteasom. In zahlreichen Signal- und Stoffwechselkreisläufen wie dem Zellzyklus, der Endozytose, der mRNA-Transkription, der Antigenpräsentation sowie der Apoptose und der Immunantwort kommt ihm eine zentrale Rolle zu [28-32].

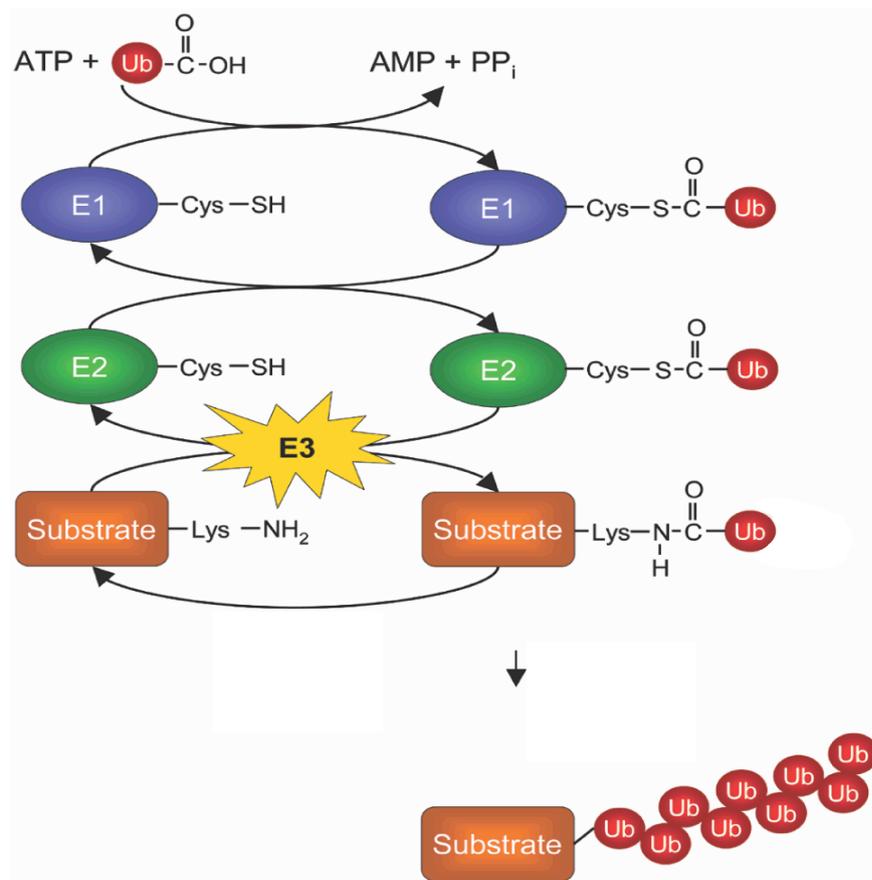


Abb. 2: Ubiquitin (Ub) wird kovalent über einen 3-Schritt-Enzym-Mechanismus, E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und E3 (Ubiquitin Ligase), an das Substrat-Protein gebunden. Die Ankopplung mehrerer Ubiquitine über E3 resultiert in der Bildung einer Polyubiquitinkette und markiert das Protein für das 26S Proteasom (Abbildung modifiziert nach [33]).

Eine Vielzahl der E2 und E3 sind, ebenso wie die bereits diskutierten molekularen Chaperone, an der Hitze-Schock-Antwort der Zelle beteiligt und führen im Zusammenspiel zu der für das Zellüberleben essentiellen Steigerung der degradativen Kapazität [34, 35].

Wohingegen z.B. Bakterien einer toxischen Proteinaggregation durch zahlreiche spezifische Proteasen entgegenwirken, hat die Evolution eukaryoten Zellen einen ubiquitär im Zytosol wie auch im Zellkern vorhandenen zentralen, nicht lysosomalen, proteolytischen Enzymkomplex bereitet. Der Abbau polyubiquitiniertes Proteine erfolgt über das 26S Proteasom [36].

Das 26S Proteasom ist aufgebaut aus einer zentralen 20S Einheit, welche das katalytische Zentrum bildet, flankiert von zwei 19S großen Regulatorkomplexen, verantwortlich für die Substraterkennung sowie den Transport der Proteinkette in das Kernpartikel.

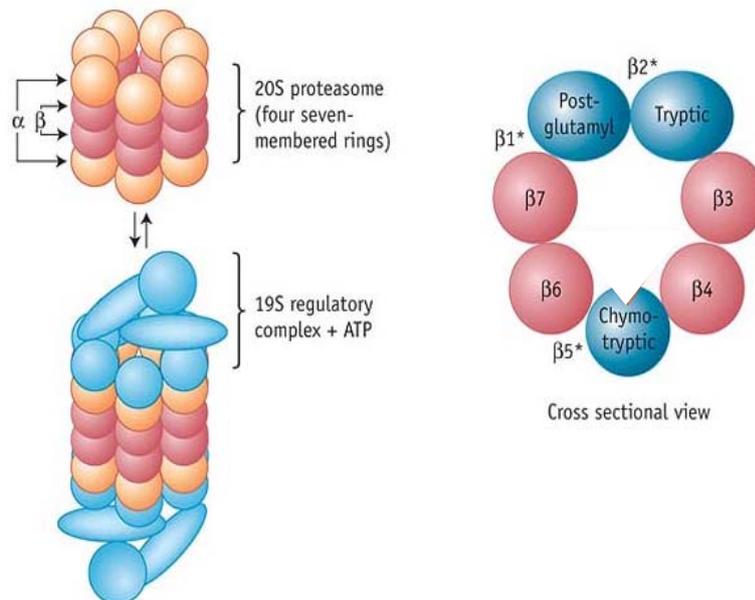


Abb. 3: Das 26S Proteasom besteht aus einer katalytischen 20S Einheit, die aus je 2 x 7 α - und β -Untereinheiten aufgebaut ist, eingerahmt von zwei ATP-abhängigen 19S Regulatorkomplexen (Abbildung modifiziert nach [37]).

Der 20S katalytische Kern wiederum besteht aus achtundzwanzig 21-32 kDa großen, ringförmig angeordneten α - und β -Untereinheiten, die in der Anordnung α - β - β - α , einen Zylinder formieren. Die inneren zwei β -Ringe tragen die, der zentralen Kavität zugewandten, proteolytischen Einheiten. Zu diesen zählen im Einzelnen mindestens fünf Proteaseaktivitäten von, am Carboxylende sauren (Peptidylglutamylpeptidhydrolase, PGPH), basischen („Trypsin-like“), hydrophoben („Chymotrypsin-like“), kleinen neutralen („Small-neutral-Amino-Acid-Preferring“, SNAAP) und verzweigt-kettigen („Branched-Chain-Amino-Acid-Preferring“, BrAAP) Aminosäuren. Dies ermöglicht eine Vielzahl der Peptidverbindungen zu spalten [13, 38]. Die BrAAP-Aktivität ist in vitro die Hauptaktivität zum Abbau myofibrillärer Proteine [39].

Die die jeweils äußere Begrenzung der 20S Einheit bildenden α -Ringe formieren im Grunde genommen das Tor zur proteolytischen Aktivität, welches, wenn inaktiv geschlossen, ATPase-assoziiert durch die 19S Regulatorkomplexe kontrolliert wird. Die verhältnismäßig enge Öffnung ermöglicht es lediglich ungefalteten Proteinen zu passieren. Er besteht aus ca. 20 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 112 kDa, unter ihnen ein Ring von 6 ATPasen, denen die Funktion zukommt die zum Abbau erkannten Proteine durch Entfaltung weiter aufzubereiten, das Öffnen der α -Ringe zu katalysieren und somit die Translokation in die 20S Einheit zu ermöglichen. Insgesamt ist dem 19S Abschnitt also die Aufgabe zuteil, regulativ die Funktion des 26S Gesamtkomplexes zu steuern. Die genaue Lokalisation der initialen Bindungsstelle des Ubiquitins in der 19S Einheit ist bis heute nicht gelungen [40, 41].

1.3 Die Hitze-Schock-Antwort

1.3.1 Hitze-Schock-Proteine; das System der Molekularen Chaperone

Eine tragende Rolle in der Konformationskontrolle und den möglicherweise daraus resultierenden Reparatur- und Degradationsprozessen von Proteinen wird den molekularen Chaperonen zugesprochen. Diese sind in allen Arten von Zellen und Zellkompartimenten vorhanden und greifen somit an den verschiedenen o.g. Lokalisationen der Proteinfaltung kontrollierend ein. Hierbei ist häufig eine Co-Funktion, ein Zusammenarbeiten verschiedener Chaperone zu beobachten. Weiterhin hat das intrazelluläre Milieu einen wesentlichen Einfluss auf die Proteinsynthese und auf die Stabilität der einzelnen Eiweiße und Eiweißkomplexe. Eine Auswahl der ubiquitär auftretenden Schwankungen der intrazellulären Bedingungen und Verhältnisse sind in **Tab. 1** aufgeführt.

Im weiteren kann ein Abbau des nativen Proteins in seine Aminosäuren im Rahmen des Alterungsprozesses sowie durch Einwirken extrazellulärer Noxen bedingt sein. Exemplarisch hierfür seien der oxidative Stress und die Entzündungsreaktion, resultierend in einem übermäßigen Vorkommen freier Radikale, genannt. Weiterhin sind chemische Zellgifte sowie die thermische Belastung der Zelle durch Hitze-Schock (heat shock) Initiatoren der Proteindenaturierung. Untersuchungen haben gezeigt, daß bis zu 30% der neu synthetisierten Proteine in eukaryoten Zellen einer Degradation innerhalb von Minuten posttranslational unterliegen [42].

Intrazelluläre Kondition	Konsequenz
Temperatur ($\geq 37^\circ\text{C}$)	Denaturierung
viele reaktive Moleküle	Oxidation, Deamidation, Nitrosylation
Enzyme	z.B. Proteasen, Kinasen
nicht-isomolare Salzkonzentrationen	Multimerdissoziation
viele Fettsäuren	Wirkung als Detergenzien
viele ungefaltete Proteine	begünstigen weitere Missfaltungen

Tab. 1: Möglichkeiten der Proteinschädigung durch Veränderungen des intrazellulären Milieus (Tabelle modifiziert nach [9]).

Eine wesentliche Gruppe innerhalb der molekularen Chaperone stellt die Familie der Hitze-Schock-Proteine (HSP) dar. Die Identifizierung dieser Polypeptide gelang bereits vor mehr als 40 Jahren durch Ritossa et al. [43]. Aufgrund der häufigen Assoziation eines vermehrten Protein-Nachweis nach vorangegangener Exposition von hohen Temperaturen etablierte sich die Bezeichnung als Hitze-Schock-Proteine.

HSP sind ubiquitär in pro- sowie eukaryotischen Zellen konstitutiv vorhanden, werden aber nach oben genannten Stresssituationen neu synthetisiert. Sie stellen per Definitionem eine eigene Klasse von Proteinen dar, die wie bereits beschrieben, durch ihre Funktion als Chaperon Einfluss auf die korrekte Synthese anderer Proteine haben; sie kontrollieren Korrekturarbeiten aber auch den Abbau geschädigter Eiweiße. Aufgrund der Notwendigkeit der Membran-Translokation neu synthetisierter Proteine kommt den HSP auch hier eine wesentliche Rolle zu. Durch ihre Fähigkeit Eiweißmoleküle kurzzeitig in einen un- oder semigefalteten Zustand zu versetzen, gewähren sie diesen Elektroneutralität und ermöglichen ihnen somit das Passieren lipophiler Membranen. Diese Funktionen sind in nahezu allen zellulären Kompartimenten und Organellen möglich. Einer statischen Fixierung oder einem Einbau in zelluläre Strukturen unterliegen HSP jedoch nicht [44].

Eine Übersicht eukaryotischer HSP-Familien und deren zelluläre Lokalisation soll **Tab. 2** gewähren.

Familie	Name/ Mitglieder	Intrazelluläre Lokalisation	Charakteristika
Hsp 10	Hsp 10	Mitochondrium	konstitutiv vorhanden, triggert Lösung von Substrat in Verbindung mit Hsp 60
small HSP	α A-Crystallin	Zytoplasma/ Nukleus	konstitutiv vorhanden, unter Stress phosphoryliert Überexpression schützt gegen Hitze-Schock durch Hypoxie induzierbar
	α B-Crystallin	Zytoplasma/ Perinukleus,	
	Hsp 27	Stress: nukleäre Translokation	
	Hsp 32	Zytoplasma	
Hsp 40	Hsp 40	Zytoplasma/ Nukleus, Stress: nukleäre Translokation	konstitutiv vorhanden, Proteinfaltung mit Hsp 70 und Hsc 70
	Hsp 47	ER	konstitutiv vorhanden, bindet und transportiert Kollagen vom ER zum Golgi-Apparat
Hsp 60	Grp 58	ER	konstitutiv vorhanden
	Hsp 60	Mitochondrium	konstitutiv vorhanden, mitochondrialer Proteinimport mit Hsp 70, ATP-Hydrolyse und Substrat-Lösung (Hsp 10 stimuliert)
	TriC	Zytosol	Proteinfaltung (Chaperonin)
Hsp 70	Hsc 70	Zytoplasma/ Peroxisomen/ Nukleus, unter Stress und Mitose: nukleäre Translokation	konstitutiv vorhanden, leicht induzierbar, Transport von Proteinen
	Hsp 70	Zytoplasma/ Nukleus Stress: nukleäre Translokation Mitochondrium	Stressprotein, konstitutiv nicht vorhanden, bindet Protein unter Stress
	Hsp 75	ER	
	Grp 78	Zytoplasma/ Kernmembran	konstitutiv vorhanden hohe Konzentration in Drüsenzellen
	Mortalin	ER	
Hsp 90	Hsp 90- α	Zytoplasma/ Nukleus Stress: nukleäre Translokation	hohe intrazelluläre Konz. Nach Stress, bindet und transportiert Steroidrezeptoren und Proteinkinasen Skelettmuskel, bindet Kalzium
	Hsp 90- β		
	Grp 94	ER	
Hsp 110	Hsp 94	renale Medulla	induzierbar durch Hitze und osmotischen Stress
	Hsp 104	Zytoplasma	
	Hsp 110	Zytoplasma/ Nukleus Stress: nukleäre Translokation	
	Grp 170	ER	

Tab. 2: Übersicht der HSP-Familien und ihrer Untereinheiten (modifiziert nach [45]).

In eukaryotischen Zellen unterscheidet man im wesentlichen zwei Gruppen von HSP. Die eine, vorrangig im Mitochondrium lokalisierte, besteht aus Hsp 60 und Hsp 10, in Bakterien dem Tandem-Chaperonin GroEL/ GroES entsprechend. Die andere und weitaus größere Gruppe umfasst die TCP₁ (T-Complex-Polypeptid 1)- Subfamilie. Diese HSP sind v.a. im Zytosol lokalisiert und fungieren, neben den bereits beschriebenen Funktionen im Rahmen der Proteinsynthese und des Proteinabbaus, als Stabilisatoren der zellulären Mikrofilamente, der Aktin-Tubulin-Komplexe.

Eine weitere Einteilung der HSP gelingt über ihr Molekulargewicht. Hsp 90, mit 90 kDa ein im oberen Drittel anzusiedelnder Vertreter der zytosolischen HSP, weist hier weiterhin die konstitutiv höchste Konzentration auf. Hsp 90 bindet an intrazelluläre Proteinkinasen, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Über einen bisher noch nicht vollends geklärten Mechanismus besteht eine Interaktion mit Aktin-Filamenten des Zytosols, über die der Transport membranös oder submembranös gelegener Steroidrezeptoren in den Zellkern erbracht wird [46]. Auch wird heute Hsp 90 als ein wesentlicher Bestandteil glukokortikoider Rezeptoren betrachtet. Hsp 90 beinhaltet bezüglich der Rezeptoraktivität eine Rolle als zentrales Steuerelement und gewährleistet deren Funktionalität [47, 48].

Die in seinen wesentlichen Funktionen am umfangreichsten erforschte HSP-Untereinheit ist das Hsp 70. Alle Mitglieder der Hsp 70-Familie besitzen zwei charakteristische Domänen: Eine ATPase Domäne am N-Terminus und eine divergierende C-terminale Domäne, welche kurze hydrophobe Peptide als Substrat binden kann. Getrennt sind die beiden Domänen durch eine Protease-sensible Sequenz. Eine wesentliche Funktion des Hsp 70 ist die energieabhängige Proteintranslokation durch intrazelluläre Membranen. Eine Affinitätssteigerung von Substrat und der Hsp 70-Bindedomäne kann durch das Co-Chaperon Hsp 40 erreicht werden [49].

Hsc 70 ist ein konstitutiv vorhandenes Mitglied der Hsp 70-Familie, in seiner Aminosäure-Sequenz besteht eine 85%-ige Homologie zu Hsp 70 [50]. Hsc 70 kann bis zu 1% aller zytoplasmatischen Proteine ausmachen [51]. Im Gegensatz zu Hsp 70 ist es jedoch durch Stressbelastung nur gering induzierbar. Seine wesentliche

Funktion besteht in Zusammenarbeit mit Hsp 40 im Proteinfaltungs- und Transportprozess.

Die Gruppe der kleinen Hitze-Schock-Proteine umfasst Hsp 27, α A-Crystallin, α B-Crystallin und Hsp 32. Ihnen kommt vorrangig die Aufgabe der Zytoskelettstabilisierung zu. Hsp 27, aktiviert durch Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPK), gilt als potenter Inhibitor der Polymerisation von Aktinfilamenten bei oxidativem Stress sowie bei vermehrter Anwesenheit von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren. Für α A-Crystallin ist ein protektiver Mechanismus für die Filamente Aktin und Desmin unter azidotischen Bedingungen beschrieben. α B-Crystallin verhindert die Aggregation der Aktinfilamente indem es an die Z-Linien der Sarkomere bindet [52].

Neben den oben genannten zytosolischen Aktivitäten ist die Chaperon-Funktion der HSP, wie bereits angedeutet, auch in Zellorganellen beschrieben. Durch Hsc 70 über die mitochondriale Membran transportierte Polypeptidketten, werden im Erlangen ihrer weiteren 3-dimensionalen Konformation durch Hsp 60 und Hsp 10 unterstützt. In Lysosomen ist Hsc 70 ebenfalls durch seine Membran translozierende Funktion am Proteinkatabolismus beteiligt. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) werden vor allem Glukose-Regulierte-Stress-Proteine (Grp) nach Hypoxie, Ischämie und Hypoglykämie vermehrt exprimiert. Grp 170, Grp 94 und Grp 74/BiP haben in Zusammenarbeit mit den zytosolischen Chaperonen im Proteinstoffwechsel des ER insbesondere die Funktion der Qualitätsüberprüfung [53].

1.3.2 Hitze-Schock-Faktoren; Syntheseinduktion der HSP

Eine Vielzahl physikalischer und chemischer Stimuli resultieren in einer gesteigerten Synthese von HSP. Nicht alle Stimuli entfalten eine gleiche Wirkung auf die Intensität der HSP-Gen-Expression. Hitze-Schock beispielsweise ist ein um ein Vielfaches stärkerer Induktor der Hsp 70 Gen-Transkription als der ischämische Schock. Andererseits können sich die Effekte der Induktoren auch addieren, wenn sie in Kombination auf Gewebe oder Zellen einwirken. Gegenwärtig sind lediglich einzelne Regulatoren und Signaltransduktionswege der gesteigerten HSP-Expression bekannt. In Eukaryoten wird die Hitze-Schock-Antwort über Transkriptionsfaktoren, sogenannte Hitze-Schock-Faktoren (HSF) reguliert [54]. Bisher konnten vier verschiedene HSF identifiziert werden, wobei Hsf 1, Hsf 2 und Hsf 4 in humanem Gewebe nachweisbar sind, Hsf 3 tritt hingegen nur in Gewebe von Hühnern auf. Die genannten vier Faktoren werden von verschiedenen Stimuli mit unterschiedlicher Intensität aktiviert, weisen jedoch im Rahmen der Hitze-Schock-Antwort synergistische Effekte auf [55]. Ausgelöst durch verschiedene Stressbedingungen kommt es zu einer MAPK-getriggerten Hyperphosphorylierung der HSF und im weiteren zur Bildung eines etwa 700 kD großen Trimers. Intranukleär erfolgt die Anlagerung des Homotrimer an die HSP-kodierende Promotersequenz der DNA, dem sogenannten HSE (Hitze-Schock-Element) und konsekutiv die Synthese von HSP-kodierender mRNA (**Abb. 4**) [56, 57]. Ein negativer Rückkopplungsmechanismus terminiert die Proteinsynthese und verhindert somit eine Überladung der zellulären Kompartimente [58, 59], [60].

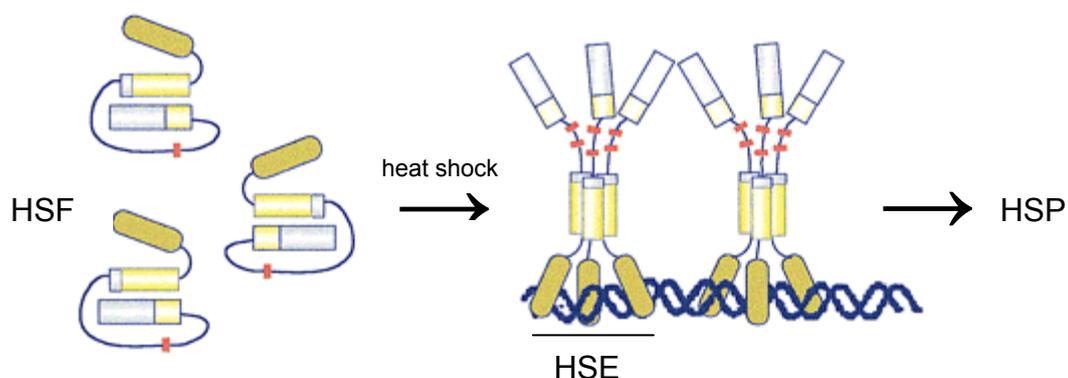


Abb. 4: Bildung des HSF-Trimer und Bindung an die HSE-Sequenz der DNA (modifiziert nach [61]).

1.3.3 Proteasom-Inhibition; multidisziplinäre Therapieansätze

Mit der Einführung der Proteasom-Inhibitoren (PI) 1994 konnten neue Wege zur Entdeckung und zum Verständnis der zahlreichen Proteasom-Funktionen beschritten werden. So konnte gezeigt werden, daß das Ubiquitin-Proteasom-System den Abbauprozess einer Vielzahl kurz- sowie langlebiger Proteine steuert und somit in wesentliche physiologische aber auch pathologische Regulationsmechanismen eingreift [62].

Wie bereits oben aufgeführt birgt das Proteasom mehrere Proteasefunktionen in sich, deren Aktivität jeweils selektiv durch verschiedene Klassen von PI inhibiert werden können. PI haben die Möglichkeit kovalent an die katalytische Einheit der Proteaseaktivität zu binden und gleichzeitig die Substratbindung durch eine Blockierung der funktionellen Einheit des Enzyms zu verhindern. Eine vollständige Inhibition aller einzelnen Proteasefunktionen ist in der Regel nicht notwendig, um eine signifikante Reduktion an Proteindegradation zu erreichen [63]. Die Hemmung der „Chymotrypsin-like“ Aktivität, welche durch PI der Gruppe der Peptid-Aldehyde, wie z.B. MG132, ALLN oder MG115, vorrangig vermittelt wird, bewirkt bereits eine deutliche Reduktion des zellulären Proteinabbaus [64]. Aldehydinhibitoren werden schnell zellulär internalisiert, haben hohe Dissoziationsraten und werden nach Beendigung der Inkubation schnell oxidiert, sind somit in ihrer Funktion reversibel und gut steuerbar. MG132 ist eines der potentesten und selektivsten Aldehyde und im Vergleich zu anderen PI bei geringen Kosten unkompliziert kommerziell verfügbar. Weitere Gruppen von PI, wie die Peptid-Boronate, Lactacystine oder die Nicht-Peptid-Inhibitoren, unterscheiden sich in ihrer funktionellen Potenz, ihrer Selektivität und Reversibilität [65].

Abhängig vom „target“ der PI lassen sich deren Untergruppen ebenfalls hinsichtlich ihres möglichen klinischen Einsatzes einteilen bzw. anbringen. Bezüglich ihrer anti-proliferativen bzw. pro-apoptischen Funktion können sie beispielsweise Einfluss auf die Progression des Zellzyklus nehmen. Dieser wird u.a. von der proteasomalen Degradation des Cyclins und von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen kontrolliert [66]. Der Abbau von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, E2F-1 und β -Catenin ist

essentiell für die Regulation von Zellwachstum und Gen-Expression [67]. Auch aktivierte Protein-Kinasen wie z.B. Src und PKC werden durch das Proteasom abgebaut [68, 69]. In Hinblick auf die Entstehung verschiedener Pathologien konnte schon frühzeitig gezeigt werden, daß der Ubiquitin-Proteasom „Pathway“ eine bedeutende Rolle im Abbau der Tumorsuppressor-Proteine p53 und p27 und somit in der Tumorgenese spielt [70]. Vielfältig werden mittlerweile PI im Rahmen klinischer Studien bei Tumorerkrankungen eingesetzt. Dieses geschieht primär vor dem Hintergrund, daß Tumorzellen gewöhnlich eine höhere Proliferationsrate und somit auch einen größeren Proteinumsatz als nicht-maligne Zellen haben. Proteasom-Inhibitoren kann eine anti-neoplastische bzw. potentiell protektive Funktion zugesprochen werden. Im Falle des Multiplen Myeloms (Plasmozytom) wird der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (PS-341, Velcade®) sogar mit Erfolg schon klinisch eingesetzt [71].

In das durch das Proteasom vermittelte Prozessieren des NF- κ B/I- κ B-Komplexes mit resultierender Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird ebenfalls versucht durch den gezielten Einsatz von PI therapeutisch einzugreifen [72, 73]. Die Hemmung der Aktivierung des NF- κ B spielt sowohl eine Rolle bei der Tumorthapie als auch bei der Therapie inflammatorischer Erkrankungen. Eine Inhibition von NF- κ B resultiert in zellulärer Apoptose, verminderter angiogenetischer Zytokinexpression und Inhibition stromaler Tumorzelladhäsion [74]. Zahlreiche Studien wurden hierzu bezüglich verschiedenster Tumorentitäten durchgeführt [75]. Ein ähnlicher Effekt wirkt auf die inflammatorische Antwort durch das Immunsystem sowie allgemein auf die Immunsurveillance. Auch hier wird der Inhibition des Proteasoms und damit konsekutiv verminderten Aktivierung von NF- κ B ein mögliche therapeutische Perspektive zugesprochen. Durch Einflussnahme der durch NF- κ B regulierten pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF α , IL-1 und IL-6 mittels des PI PS-341 konnte in einem rheumatoiden Arthritis-Tiermodell eine deutliche Reduktion des klinischen Fortschreitens, insbesondere im chronischen Erkrankungsstadium, beobachtet werden [76]. Im weiteren zeigten PI, z.T. in Kombination mit Kortikosteroiden, einen deutlichen klinischen „benefit“ im Tiermodell mit Asthma bronchiale und Multipler Sklerose [77-79].

Im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen stellt das Ubiquitin-Proteasom-System einen wesentlichen Faktor für die Genese sowie den Fortbestand multipler Pathologien dar. So spielen im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz mit einhergehender kardialer Kachexie und Muskelatrophie metabolische Dysfunktionen, Malnutrition, Malabsorption, Inflammation, neurohormonale Aktivierung sowie anabole und katabole Imbalance eine pathogenetische Rolle. Muskelbiopsien im kardial-kachektischen Tiermodell zeigten eine gesteigerte Rate an Protein-Degradation sowie eine erhöhte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes [80, 81]. In einem myokardialen Infarktmodell konnte sowohl im Nagetier als auch im Schwein eine Reduktion des auf ischämischen Intervall möglich entstehenden Reperfusionsschaden beobachtet werden. Auch hier ist die entzündliche Genese, moduliert durch NF- κ B, mit vermehrter Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen und folgender Leukozyten-Invasion pathogenetisch entscheidend. Durch intravenöse Gabe von PS-519 konnte sowohl die Zellinfiltration in das Infarktgewebe wie auch das Infarktvolumen und der Plasmaspiegel der Creatinin-Phosphokinase reduziert und die Herzfunktion verbessert werden [82, 83].

Durch Einsatz von Proteasom-Inhibitoren konnte weiterhin in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, daß durch Hemmung der zellulären Proteolyse nicht nur der pathologisch erhöhte Proteinabbau begrenzt werden kann, sondern im weiteren die Induktion einer vermehrten Synthese molekularer Chaperone, der Hitze-Schock-Proteine (HSP), provoziert wird [84, 85]. So konnte nach Inkubation mit PI unterschiedlicher Subspezifität in MDCK-Zellen eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression codierend für HSP beobachtet werden. Simultan kam es bei 70%-iger Inhibition der proteasomalen Proteindegradation bereits innerhalb von zwei Stunden zu einem signifikanten Anstieg der mRNA für Chaperone des Endoplasmatischen Retikulums, wie BiP, ERp72 und Grp94 [85]. Ein folgendes Aussetzen der Zellen subletaler Temperaturen zeigte ein deutlich besseres Überleben der Zellen nach Induktion einer Stress-Antwort durch PI gegenüber der Kontrollgruppe. Eine resultierende Thermotoleranz nach PI-Inkubation sowie verbesserte Resistenz gegenüber anderen Stressformen wie Ischämie oder Alkohol konnte ebenfalls in anderen Zelllinien wie z.B. Hefepilzen beobachtet werden [86]. Abhängig von der Dosis der PI sowie der Inkubationszeit kommt es ebenfalls in VSMC [87] sowie in

U937 lymphatischen Tumorzellen zu einer vermehrten Expression von HSP und damit einhergehender Suppression der pro-apoptotischen Stress-Kinase JNK. Folgend konnte auch hier ein verbessertes Überleben nach Hitze-Stress beobachtet werden [88].

1.4 Arbeitshypothese

Die direkte Induktion einer durch Hitze-Schock-Proteine vermittelten Stressantwort im kardio-vaskulären System soll im folgenden näher untersucht werden. Wie bereits aufgeführt, ist die Kausalität einer vermehrten Expression von zellulären Chaperonen, den HSP, nach Einsatz von Inhibitoren des Proteasom in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen worden. Diese Induktion korreliert mit einer Protektion gegenüber subletalen oder potentiell letalen Stressoren. Auch legen diese Ergebnisse im weiteren nahe, daß die Einleitung einer Hitze-Schock-Antwort durch Hemmung des Proteasoms mittels spezifischer Inhibitoren auch für Herzmuskelzellen zu erwarten ist. Neonatale Rattenkardiomyozyten sollen deshalb mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert werden und die Induktion einer Stressantwort in Form einer gesteigerten Synthese von Hitze-Schock-Proteinen untersucht werden. Weiterhin soll beantwortet werden, inwiefern dieses sich auf das Zellüberleben auswirkt und somit eine Protektion kardialen Gewebes gegenüber verschiedenen Stressformen erreicht werden kann.