

3. Ergebnisse

3.1 Kurzzusammenfassung

Hitze-Schock-Proteine werden in verschiedenen Geweben nach Proteasom-Inhibition im Rahmen einer Hitze-Schock-Antwort vermehrt exprimiert. Für Kardiomyozyten ist ein solcher Effekt bisher noch nicht im Einzelnen beschrieben worden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden deshalb erstmals neonatale Rattenkardiomyozyten mit einer Verdünnungsreihe des Proteasom-Inhibitors MG132 inkubiert und die Induktion der mRNA-Level von Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 und Hsp 90 mittels Real-Time PCR sowie die Expression der Hitze-Schock-Proteine in einer Zeitkinetik im Western Blot untersucht. Darüber hinaus wurde folgend auf die Hitze-Schock-Antwort das Überleben der Kardiomyozyten nach hyperthermem oder oxidativem Stress mittels eines Zellproliferationstests untersucht und quantifiziert.

3.2 Hitze-Schock-Proteine; Expression auf mRNA-Ebene

Um die mRNA-Expressionsrate von HSP in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Proteasom-Inhibition zu untersuchen, wurden diese mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 10 μM über 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden mittels RT-PCR die mRNA-Expressionslevel von Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 und Hsp 90 nach 1, 2 und 4 Stunden Nachinkubation untersucht und den Kontrollgruppen (DMSO, Kontrolle und Hitze-Schock) gegenübergestellt. Die mit Hitze-Schock behandelten Zellen dienten als Positivkontrolle.

3.3.1 Hsp 27

Die Abbildung 7 zeigt die mittels RT-PCR bestimmten unterschiedlichen mRNA-Expressionslevel für Hsp 27 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und der Dauer der Inkubation in der Zellkultur nach MG132-Stimulation. Die Abbildung verdeutlicht, daß nach Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen von 0,1 und 1 μM keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Level über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Stunden auftraten. Bei einer Konzentration von 10 μM hingegen zeigte sich ein deutlicher, maximal 2,9-facher Anstieg der Hsp 27 Genexpressionsraten nach 2 und 4-stündiger Inkubationszeit. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erreichte dieser Signifikanzniveau.

Die Behandlung der Zellen mit Hitze-Schock (0,5 h; 42°C) induzierte einen um den Faktor 5,3 signifikant höheren Anstieg der Hsp 27 mRNA-Level als die Kontrollgruppe.

mRNA-Expression von Hsp 27 nach Inkubation mit MG132 bzw. Hitze-Schock

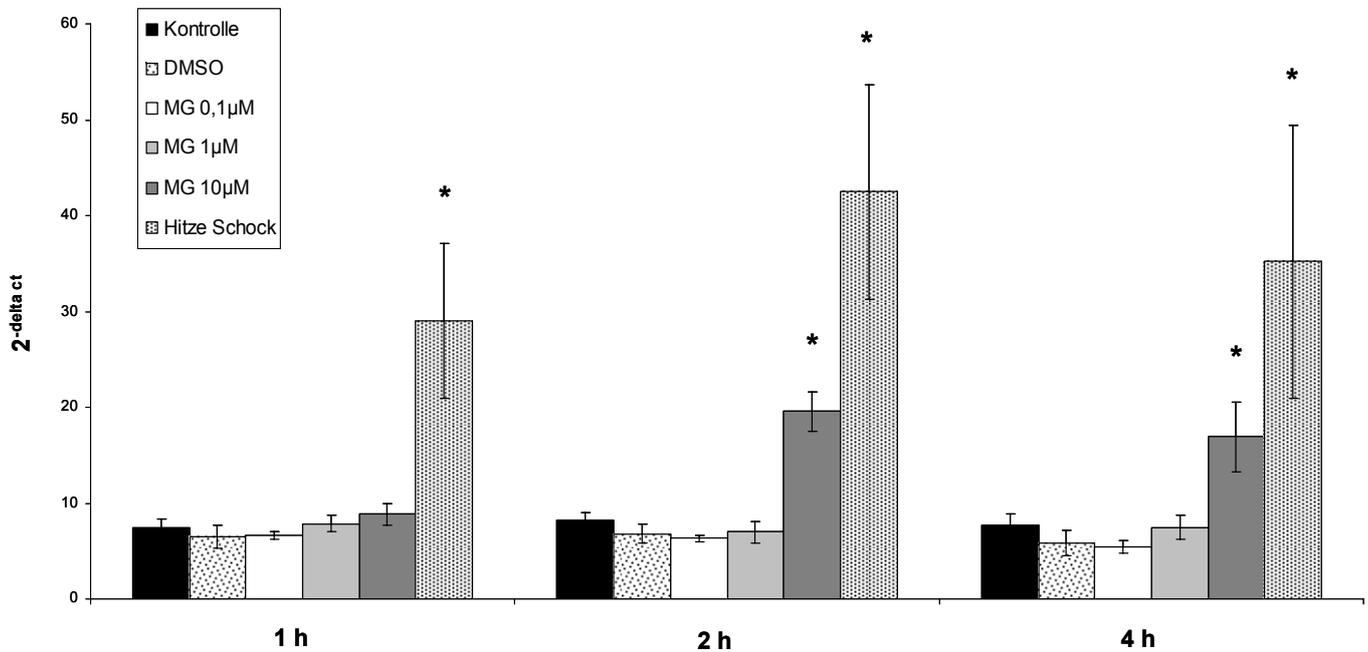


Abb. 7: Veränderungen in der mRNA-Expression von Hsp 27 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 (0,1 μM, 1 μM und 10 μM) über 60 Minuten und Nachinkubationszeiträumen von 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, DMSO und HS. Die Diagramme zeigen Mittelwerte ± SEM (n=4), *p < 0,05 versus Kontrolle/DMSO.

3.3.2 Hsp 60

Die Abbildung 8 zeigt die mittels RT-PCR untersuchten unterschiedlichen mRNA-Expressionslevel für Hsp 60 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und der Dauer der Inkubation in der Zellkultur nach MG132-Stimulation. Die Abbildung zeigt, daß nach Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Level über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Stunden auftraten. Ein maximaler Anstieg der mRNA-Expressionsrate um den Faktor 1,9 gegenüber der Kontrolle wurde für Hsp 60 nach einer Stimulation der Zellen mit 10 μM MG132 und 2 sowie 4 Stunden Nachinkubation beobachtet. Auch dies Steigerung war gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant.

Die Behandlung der Zellen mit HS (0,5 h; 42°C) induzierte einen maximalen Anstieg der Hsp 60 mRNA-Level um den Faktor 3,1 nach 2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.

mRNA-Expression von Hsp 60 nach Inkubation mit MG132 bzw. Hitze-Schock

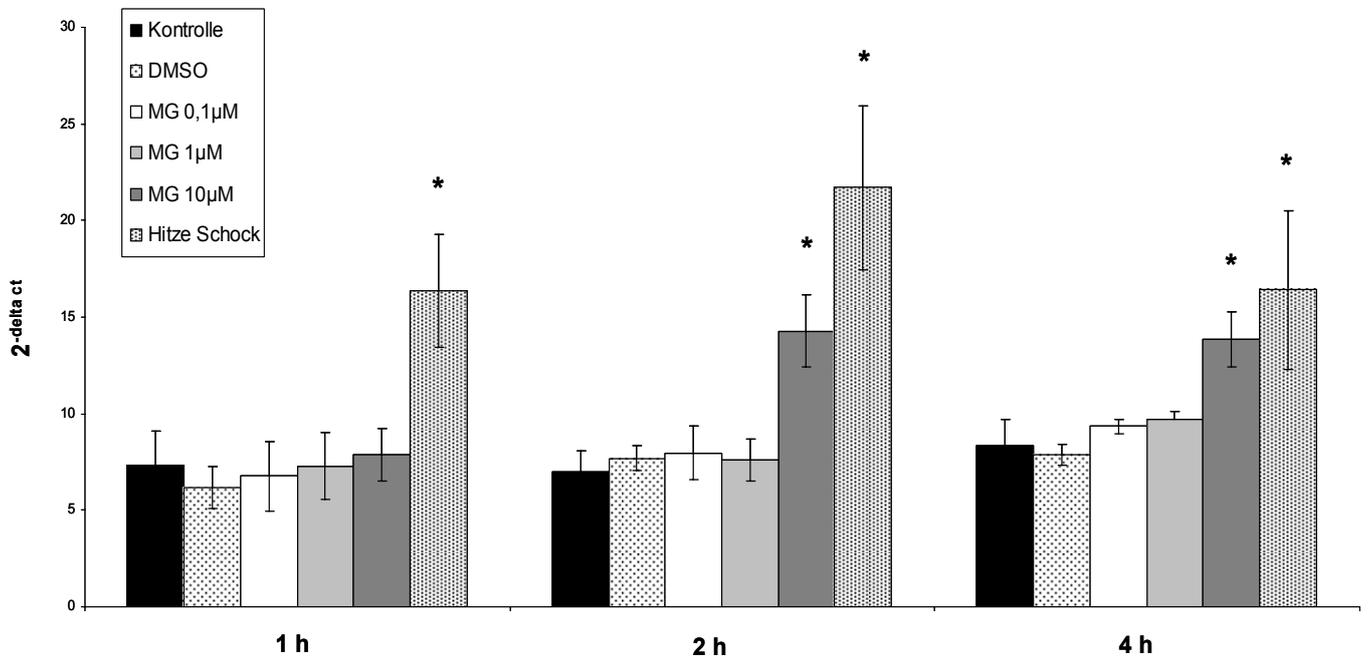


Abb. 8: Veränderungen in der mRNA-Expression von Hsp 60 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 (0,1 µM, 1 µM und 10 µM) über 60 Minuten und Nachinkubationszeiträumen von 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, DMSO und HS. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm SEM (n=4), *p < 0,05 versus Kontrolle/DMSO.

3.3.3 Hsp 70

Die Abbildung 9 zeigt die mittels RT-PCR bestimmten unterschiedlichen mRNA-Expressionslevel für Hsp 70 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und der Dauer der Nachinkubation in der Zellkultur nach MG132-Stimulation. Die Abbildung zeigt, daß nach Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen 0,1 und 1 μM keine sichtbaren Veränderungen der mRNA-Level über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Stunden auftraten. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expressionsrate gegenüber der Kontrolle wurde für Hsp 70 jedoch nach Proteasom-Inhibition mit 10 μM MG132 sowohl nach 1, 2 und 4 Stunden beobachtet. Damit zeigte sich beim Hsp 70 der weitaus größte Anstieg der Expressionsrate innerhalb der verschiedenen Hitze-Schockproteine, maximal um den Faktor 18. Innerhalb der PI-Inkubationsgruppe ließ sich, entsprechend der anderen HSP-Gruppen, ebenso eine Tendenz hinsichtlich einer ansteigenden mRNA-Expression bei steigender Konzentration beschreiben. Diese fiel hier deutlicher aus, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

Die Behandlung der Zellen mit HS (0,5 h; 42°C) induzierte einen signifikant höheren Anstieg der Hsp 70 mRNA-Level als die einzelnen MG132 Konzentrationen. Ein maximaler Anstieg der Hsp 70 mRNA-Level wurde nach 2 Stunden um den Faktor 84 beobachtet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Abbildung 9 die Ordinate in einer logarithmisierten Skalierung dargestellt.

mRNA-Expression von Hsp 70 nach Inkubation mit MG132 bzw. Hitze-Schock

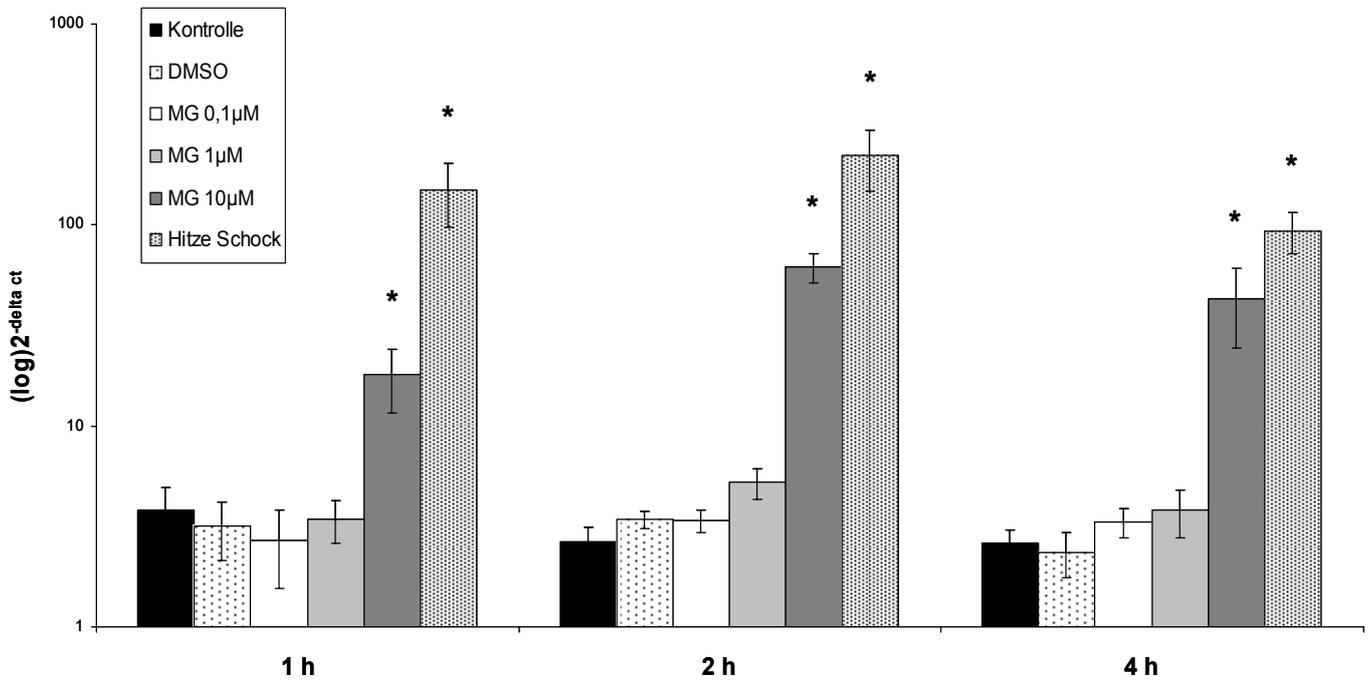


Abb. 9: Veränderungen in der mRNA-Expression von Hsp 70 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 (0,1 µM, 1 µM und 10 µM) über 60 Minuten und Nachinkubationszeiträumen von 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, DMSO und HS. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm SEM (n=4), *p < 0,01 versus Kontrolle/DMSO.

3.3.4 Hsp 90

Die Abbildung 10 zeigt die mittels RT-PCR bestimmten unterschiedlichen mRNA-Expressionslevel für Hsp 90 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und der Dauer der Nachinkubation in der Zellkultur nach MG132-Stimulation. Die Abbildung zeigt, daß nach Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen von 0,1 und 1 μM keine sichtbaren Veränderungen der mRNA-Level über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Stunden auftraten. Ein maximaler Anstieg der mRNA-Expressionsrate um den Faktor 1,8 gegenüber der DMSO-Kontrolle wurde für Hsp 90 nach 2 Stunden Nachinkubation beobachtet. Insgesamt konnte nach Einsatz von 10 μM MG132 eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Auffällig ist hier, daß, different zu den anderen HSP, mit Hitze-Schock lediglich nach 2 Stunden ein signifikant um den Faktor 1,6 vermehrte Induktion von mRNA erreicht werden konnte. Auch blieb dieses erstmalig dauerhaft unterhalb des Expressionslevels, welches mit 10 μM MG132 erreicht werden konnte.

mRNA-Expression von Hsp 90 nach Inkubation mit MG132 bzw. Hitze-Schock

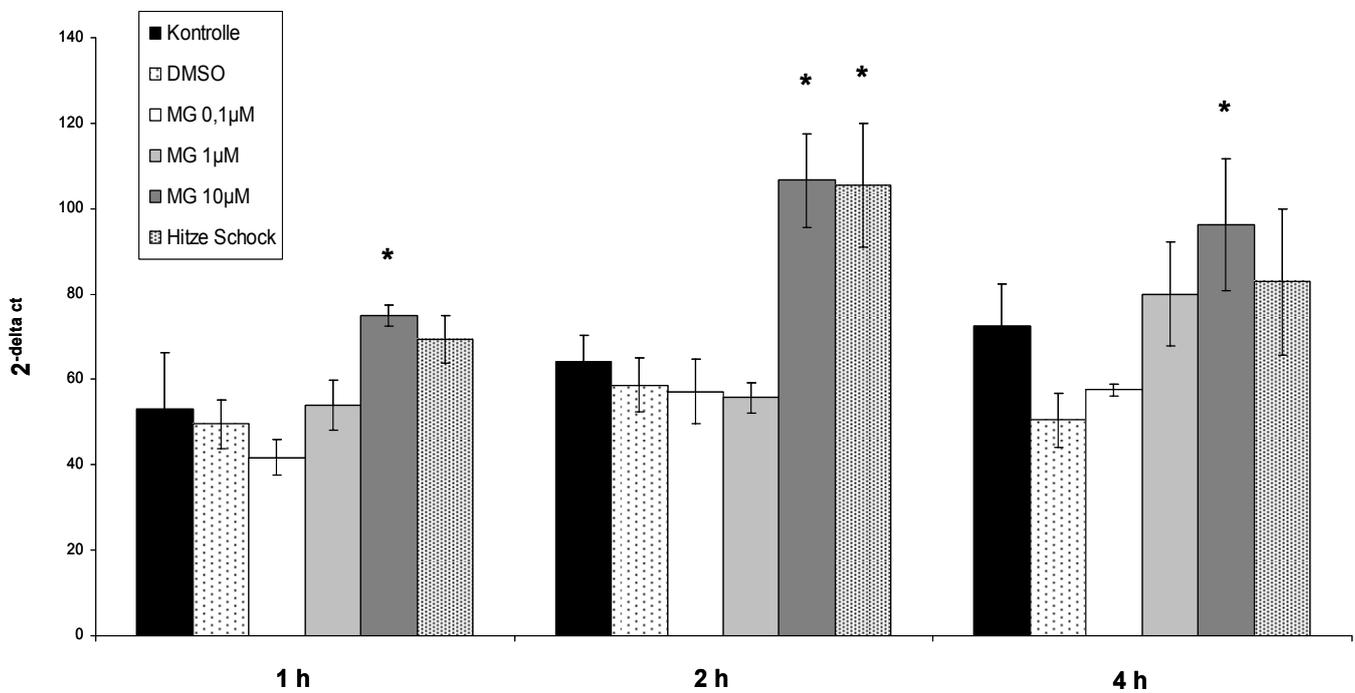


Abb. 10: Veränderungen in der mRNA-Expression von Hsp 90 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 (0,1 µM, 1 µM und 10 µM) über 60 Minuten und Nachinkubationszeiträumen von 1, 2 und 4 Stunden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, DMSO und HS. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm SEM (n=4), *p < 0,05 versus Kontrolle/DMSO.

3.4 Hitze-Schock-Protein; Expression auf Protein-Ebene

Um die Synthese der Hitze-Schockproteine in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Proteasom-Inhibition zu quantifizieren, wurden diese mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 der Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 10 μM über 60 Minuten inkubiert. Nach einer folgenden Inkubation von 1, 2 und 4 Stunden wurden die Protein-Expressionslevel von Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 und Hsp 90 mittels Western Blot untersucht und den Kontrollgruppen (DMSO, Kontrolle und Hitze-Schock) gegenübergestellt. Die mit Hitze-Schock behandelten Zellen dienten als Positivkontrolle.

Im folgenden werden repräsentative Blots der einzelnen Stimulationsreihen und HSP's dargestellt. Es erfolgte eine einheitliche Beladung der einzelnen Spuren mit 20 μg Proteinextrakt.

3.4.1 Hsp 27

Die Abbildung 11 zeigt repräsentativ den mittels Western Blot in 3 unabhängigen Experimenten determinierten Proteingehalt für Hsp 27 nach Inkubation mit dem spezifischen Proteasom-Inhibitor MG132 und einer Nachinkubation von 2 Stunden in der Zellkultur. Die Abbildung verdeutlicht, daß die Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 keinen nachweislichen Einfluss auf den zellulären HSP-Gehalt bedeutet. Das Ergebnis der PCR-Daten mit einer signifikant gesteigerten mRNA-Expression nach 2 h und 10 μ M MG132 bzw. die Tendenz mit steigender Konzentration des Proteasom-Inhibitors eine entsprechend vermehrte mRNA-Expression zu induzieren, konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden.

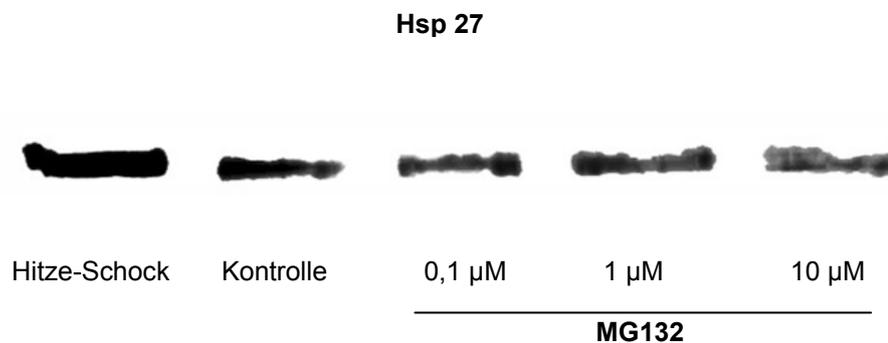


Abb. 11: Protein-Expression von Hsp 27 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 10 μ M über 60 Minuten und Nachinkubationszeitraum 2 Stunden im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und Hitze-Schock.

3.4.2 Hsp 60

Die Abbildung 12 zeigt repräsentativ den mittels Western Blot in 3 unabhängigen Experimenten determinierten Proteingehalt für Hsp 60 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und einer Nachinkubation von 2 Stunden in der Zellkultur. Die Abbildung verdeutlicht, daß die Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 keinen nachweislichen Einfluss auf den zellulären HSP-Gehalt bedeutet. Das Ergebnis der PCR-Daten mit einer signifikant gesteigerten mRNA-Expression nach 2 h und 10 μM MG132 bzw. die Tendenz mit steigender Konzentration des Proteasom-Inhibitors eine entsprechend vermehrte mRNA-Expression zu induzieren konnte, auf Proteinebene nicht erreicht werden.

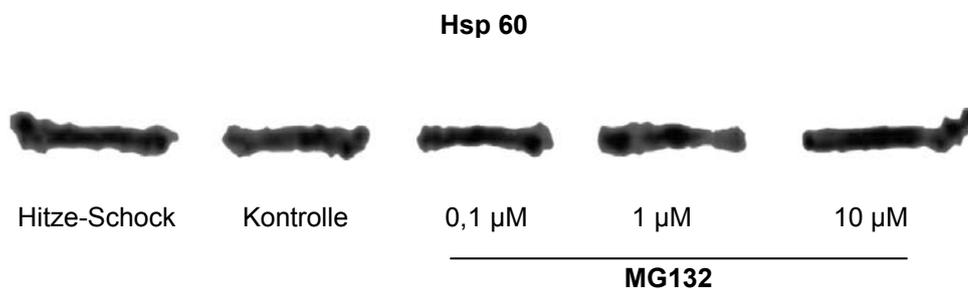


Abb. 12: Protein-Expression von Hsp 60 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 10 μM über 60 Minuten und Nachinkubationszeitraum von 2 Stunden im Vergleich mit der DMSO- Kontrolle und Hitze-Schock.

3.4.3 Hsp 90

Die Abbildung 13 zeigt repräsentativ den mittels Western Blot in 3 unabhängigen Experimenten determinierten Proteingehalt für Hsp 90 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 von 10 μM und einer Dauer der Inkubation von 2 Stunden in der Zellkultur. Die Abbildung verdeutlicht, daß die Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 keinen nachweislichen Einfluss auf den zellulären HSP-Gehalt bedeutet. Auch hier konnten die Ergebnisse der mRNA-Daten auf Proteinebene nicht verifiziert werden.



Abb. 13: Protein-Expression von Hsp 90 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 10 μM über 60 Minuten und Nachinkubationszeitraum von 2 Stunden im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und Hitze-Schock.

3.4.4 Hsp 70

Die Abbildungen 14A-C zeigen repräsentativ den mittels Western Blot in je 3 unabhängigen Experimenten determinierten Proteingehalt für Hsp 70 in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Proteasom-Inhibitors MG132 und der Dauer der Inkubation in der Zellkultur nach MG132-Stimulation. Die Abbildung zeigt, daß der Einfluss des Proteasom-Inhibitors MG132 auf den zellulären HSP-Gehalt der neonatalen Rattenkardiomyozyten in Abhängigkeit zur Dauer der Nachinkubation steht. Deutlich zeigte sich der Zusammenhang in dem Nachinkubationszeitraum von 4 Stunden. Eine Abhängigkeit von Proteingehalt und Proteasom-Inhibitor-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ließ sich schon bei niedriger Konzentration von 0,1 μM und 1 μM MG132 mit einer Tendenz zur gesteigerten Proteinsynthese erkennen. Evident wurde dieses bei der hohen MG132 Konzentration von 10 μM , welches sich, analog zu den PCR-Daten, durch die kräftige Proteinbande im Western Blot widerspiegelt. In den früheren Zeiträumen von einer oder zwei Stunden blieb eine signifikante Antwort auf Proteinebene aus.

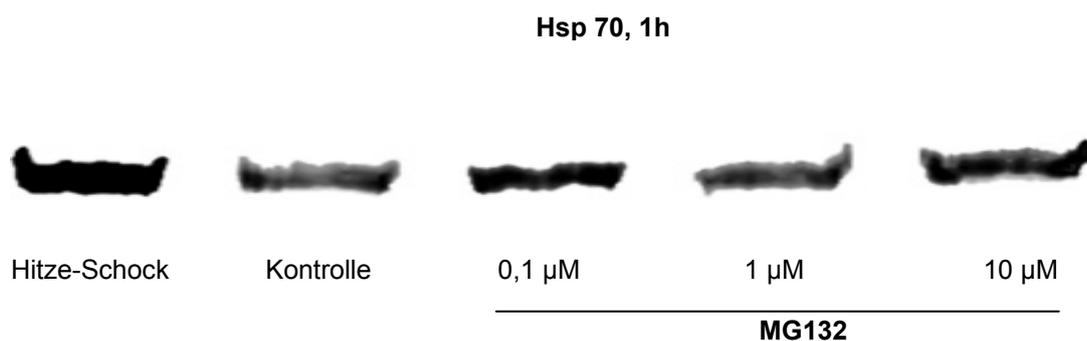


Abb. 14A: Protein-Expression von Hsp 70 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 über 60 Minuten und Nachinkubationszeitraum von 1 Stunde im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und Hitze-Schock.

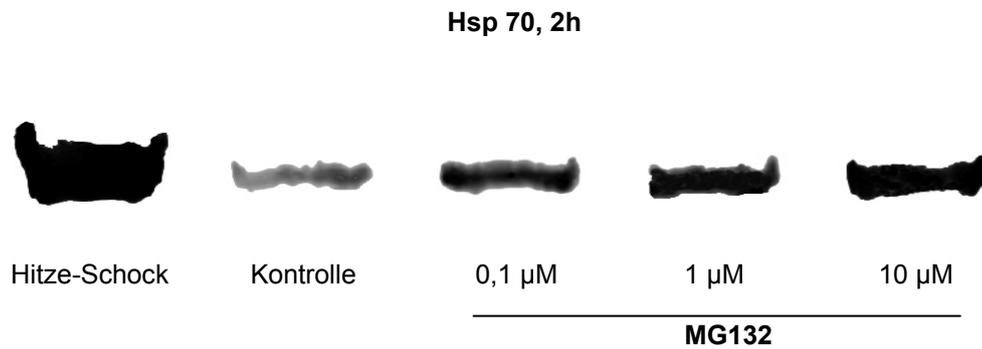


Abb. 14B: Protein-Expression von Hsp 70 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 über 60 Minuten und Nachinkubationszeitraum von 2 Stunden im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und Hitze-Schock.

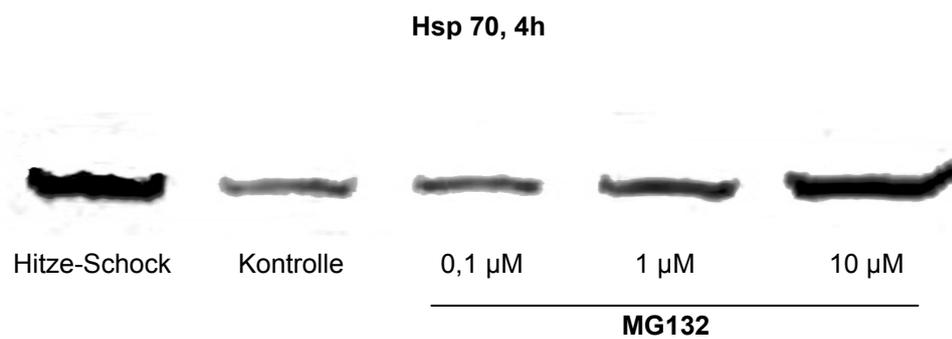


Abb. 14C: Protein-Expression von Hsp 70 in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit MG132 über 60 Minuten und Nachinkubationszeiträumen von 4 Stunden im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und Hitze-Schock.

3.5 XTT-Zellproliferationstest

3.5.1 Optimierung der Zellzahl

Nach Induktion einer vermehrten intrazellulären Expression von Hsp 70, stellte sich die Frage, ob dieses einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben hat. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden nach zuvor beschriebener Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten des Proteasom-Inhibitors MG132 einem letalen Stress in Form von Hitze (46°C für 2 Stunden) oder dem zytotoxischen Agens H₂O₂ ausgesetzt. Das Überleben der Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Test bestimmt. Dieser Test mißt die metabolische Aktivität von Zellen. Ein Verlust der metabolischen Aktivität bedeutet eine Verminderung des Zellüberlebens. Zur Validierung des XTT-Test und zur Ermittlung der optimalen Zellzahl pro Well, die eine XTT-Aktivität im gut messbaren Bereich zeigt, wurde initial eine Zellverdünnungsreihe untersucht. Hierbei wurde ein Signal im oberen Konzentrationsbereich favorisiert, um einerseits eine sichere Detektion zu gewährleisten, eine „Überladung“ des Spektrometers mit Signal jedoch zu verhindern und im weiteren eine Messbarkeit kleinerer Konzentrationsunterschiede zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Zur Etablierung einer Negativ-Kontrolle wurden neonataler Rattenkardiomyozyten nach oben beschriebenem Schema dem Zellgift Staurosporin (10 µM, 30 min., s. 3.5.2) ausgesetzt. Ein Optimum an Signalintensität und Signaldifferenz zeigt Abbildung 15 bei einer Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well. Zwischen Kontrolle und letalem Stress wurde ohne Stimulation durchschnittlich ein Unterschied im Überleben um den Faktor 2 erreicht.

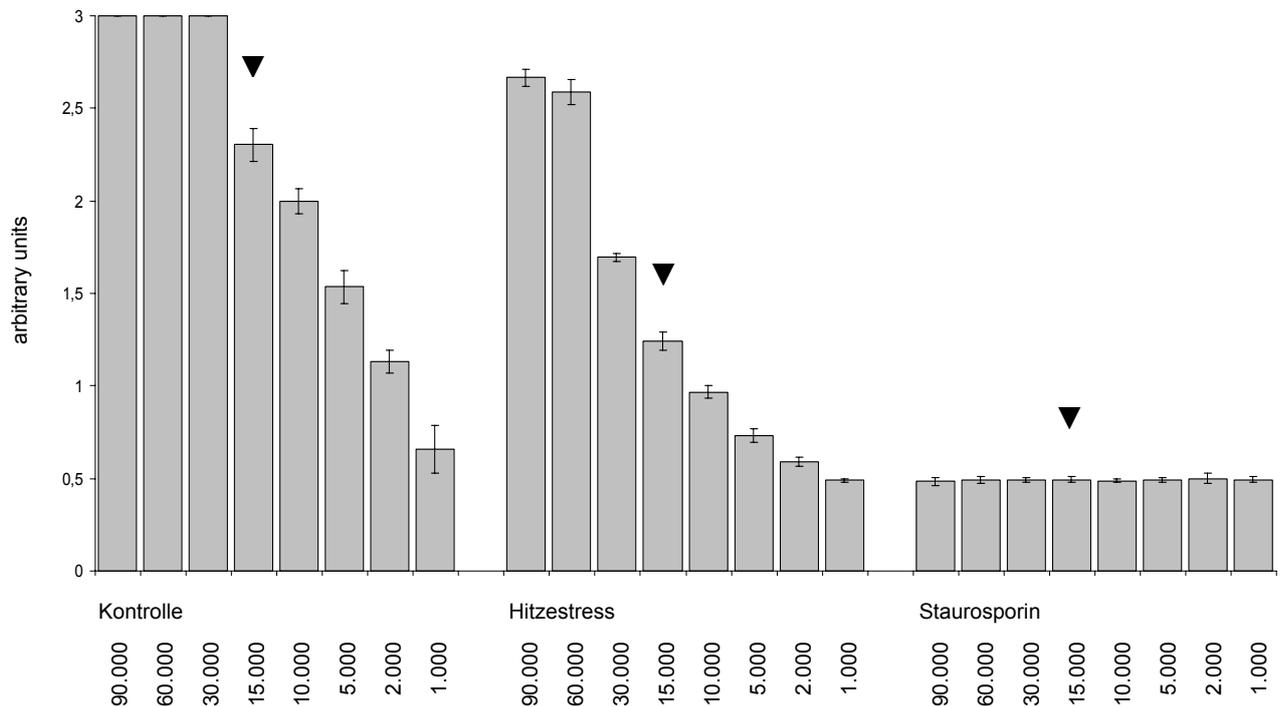


Abb. 15: Metabolische Aktivität neonataler Rattenkardiomyozyten unterschiedlich ausplattierter Dichte bei fehlendem Stimulus oder Stress (Kontrolle), nach 2 Stunden Hitzestress bei 46°C oder dem zytotoxischen Agens Staurosporin (10 µM über 30 Minuten). Ein optimaler Detektionsbereich für alle Gruppen wurde bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/ Well bestimmt (▼). Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm SEM (n=3).

3.5.2 Optimierung der Zellschädigung durch unterschiedliche Zellgifte

Um ein sicheres Abtöten der Zellen zu erreichen und somit ebenfalls eine Testvalidierung zu erhalten, erfolgte zunächst eine Testung verschiedener Zellgifte in unterschiedlichen Konzentrationen bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well. Hierzu wurden Staurosporin, H_2O_2 sowie TritonX eingesetzt. Staurosporin erreicht seinen zellschädigenden Effekt über die Inhibition von Proteinkinasen (in erster Linie Proteinkinase A und G) und wirkt somit proapoptotisch. Wasserstoffperoxid als sogenannte ‚reaktive Sauerstoffspezies‘ setzt Zellen einem potentiell letalem oxidativen Stress aus während TritonX zu einer Permeabilisierung der Zellmembran und nachfolgend zu einer Lyse der Zelle führt.

Es konnte gezeigt werden, daß alle zytotoxischen Substanzen zu einem Zelluntergang führten, der sich mittels XTT-Test detektieren ließ. Die unbehandelte Kontrollgruppe ($1,5 \times 10^4$ Zellen) wies vergleichbar mit der Zellverdünnungsreihe in Abbildung 15 eine Signalintensität im Bereich 2,3 auf. Dieses wurde als weitere Reliabilität des XTT-Testes gewertet. In den folgenden Experimenten wurde als sicher zellulär-letal Stress Staurosporin $10 \mu\text{M}$ über 30 Minuten eingesetzt.

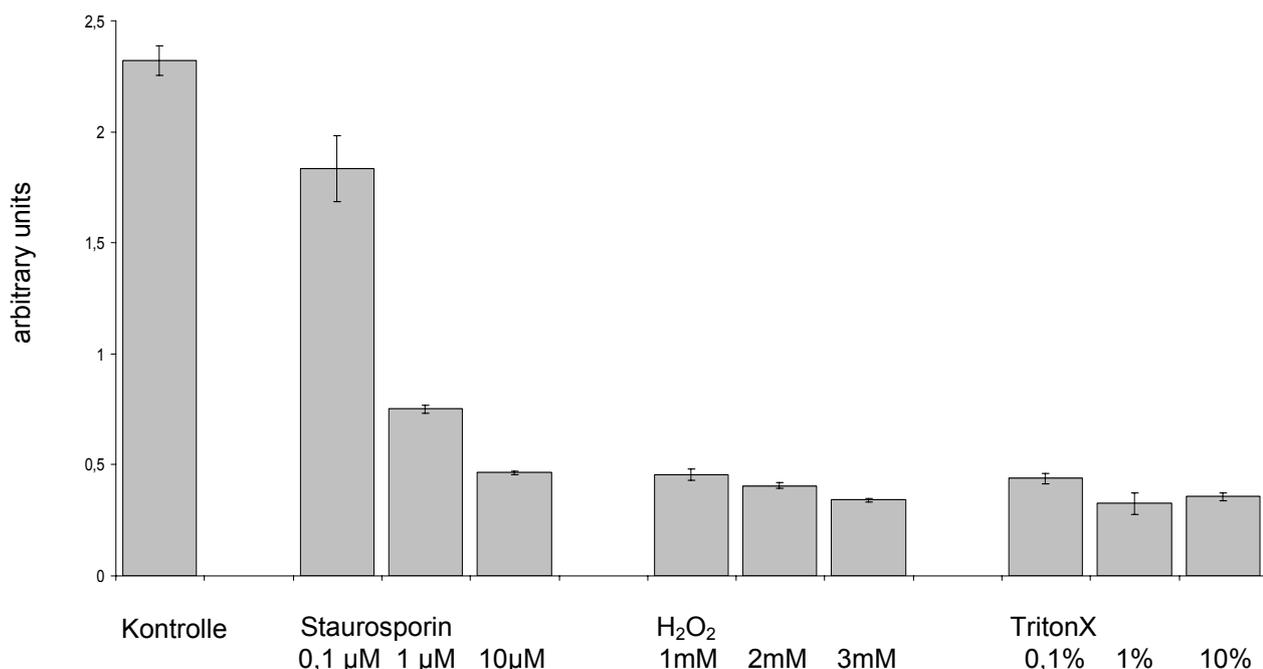


Abb. 16: Zellproliferation im XTT-Test nach Inkubation mit verschiedenen Zellgiften in unterschiedlichen Konzentrationen. Mittelwert \pm SEM (n=3).

3.5.3 Zellüberleben nach Hitze-Schock

Zur Validierung eines möglichen protektiven Effektes der Stimulation kardialer Zellen mit Proteasom-Inhibitor wurden die Myozyten nach oben beschriebenem Protokoll mit MG132 inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität der Zellen durch den XTT-Test bestimmt.

Initial wurden die Zellen entsprechend der PCR- und Western Blot-Versuche wie in Abb. 17 inkubiert und anschliessend einem Hitze-Stress von 46°C über 2 Stunden ausgesetzt. Folgend wurde die Vitalität im XTT-Test gemessen. Abbildung 18 zeigt eine repräsentative Übersichtsgraphik der erhobenen Parameter. Auch in diesem Versuchsdurchlauf kann die Zellaktivität, entsprechend der beschriebenen Vorversuche (Abb. 15), in der unstimulierten Kontrollgruppe mit einem Wert um 1,3, der Staurosporin-Gruppe bei ca. 0,5 bestimmt werden. Dieses verdeutlicht abermals die hohe Zuverlässigkeit der angewendeten Methodik.

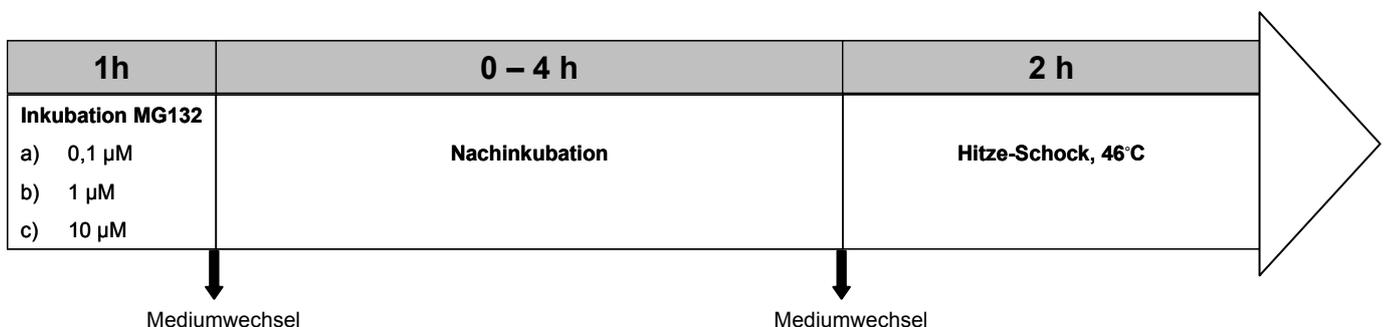


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der einzelnen Inkubationsschritte vor XTT-Test.

Insgesamt lässt sich sagen, daß eine längere Nachinkubation der Zellen nach Stimulation mit MG132 einen Vorteil im Überleben zu beinhalten scheint. Innerhalb der einzelnen Inkubationszeiträume scheint ebenfalls eine positive Korrelation von Proteasom-Inhibitor-Dosis und Zellüberleben zu bestehen. Insbesondere die Zellen, die mit 0,1 µM und 1 µM MG132 inkubiert wurden zeigen ein deutlich besseres „outcome“ (bis Faktor 1,4) im Vergleich zur spezifischen DMSO-Kontrolle sowie zur allgemeinen, unbehandelten Gruppe. Bei weiterer Erhöhung des Inhibitors auf 10 µM

konnte keine zusätzliche Verbesserung im Überleben detektiert werden. Auch ließ sich eine statistische Signifikanz nicht ermitteln.

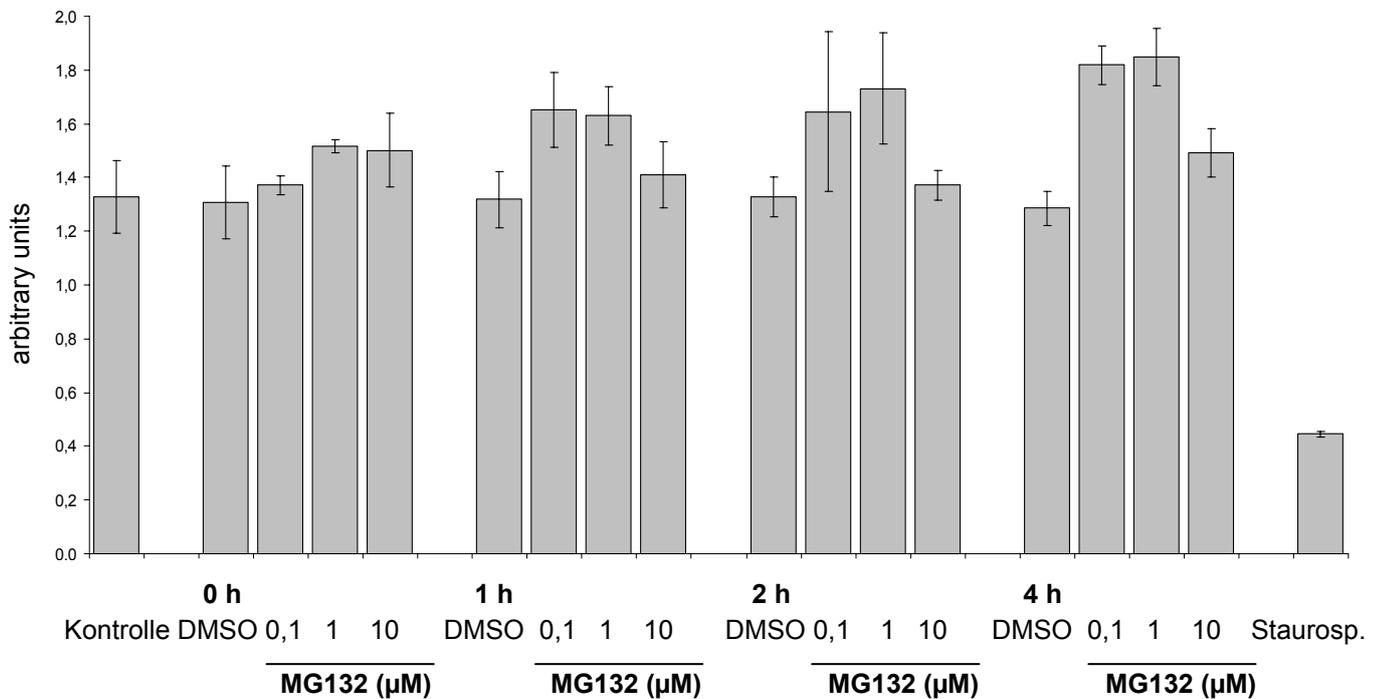


Abb. 18: Übersicht über das Zellüberleben nach 2 h Hitze-Schock der gesamten Stimulationsgruppe mit unterschiedlichen Konzentrationen MG132 und verschiedenen Nachinkubationszeiträumen. Mittelwert \pm SEM (n=3).

3.5.4 Hsp 70-Expression nach Zellstimulation mit H₂O₂

Im folgenden sollte die Frage beantwortet werden, ob eine vermehrte zelluläre Expression von Hsp 70 auch durch oxidativen Stress induziert werden kann. Zu diesem Zweck wurde den neonatalen Rattenkardiomyozyten der oxidative Stressor H₂O₂ in den Konzentrationen 100 µM, 250 µM und 500 µM für eine Stunde in das Zellmedium gegeben. Nach Mediumwechsel folgte eine Nachinkubationszeit von null bis vier Stunden und im Anschluß wurde in 3 unabhängigen Experimenten mittels Western Blot der Proteingehalt für Hsp 70 bestimmt. Abbildung 19 zeigt repräsentativ, daß kein spezifischer Zusammenhang zwischen Stressexposition durch H₂O₂ und zellulärer Hsp 70-Expression besteht.

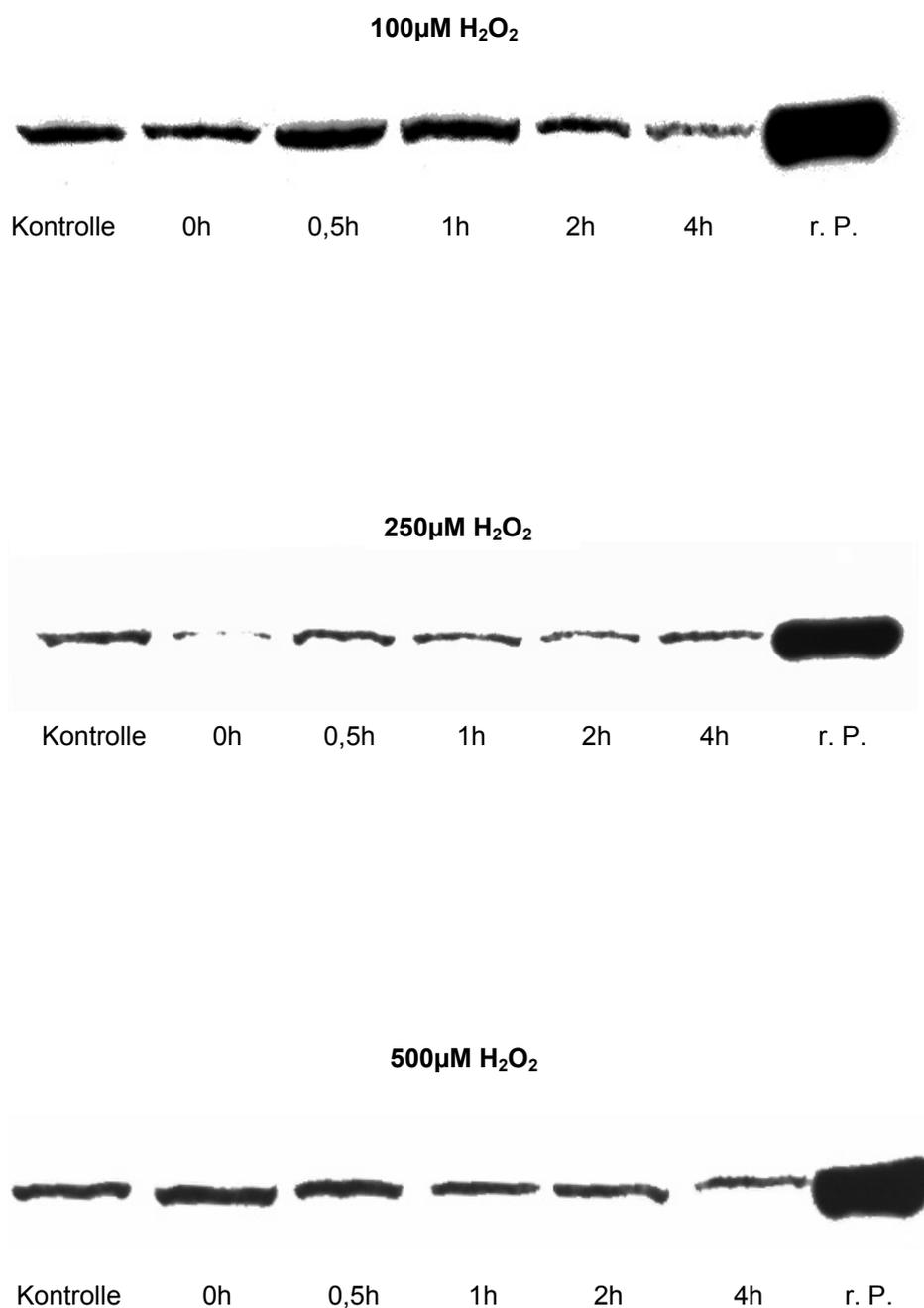


Abb. 19: Hsp 70-Expression im Western Blot nach Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten mit H_2O_2 für eine Stunde. Die Zeitpunkte in Stunden geben den Zeitraum der Nachinkubation an, r. P. entspricht dem reinen Hsp 70 als Positiv-Kontrolle.

3.5.5 Zellüberleben nach subletalem/ letalem Stress mit H₂O₂

Bisher konnte gezeigt werden, daß die Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten mit MG132 eine Induktion von Hsp 70 hervorrufen und diese in einem verbesserten Überleben nach letalem Hitzestress resultiert. Wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben und dargestellt vermag H₂O₂ durch Ausüben einer oxidativen Stresssituation keine gesteigerte Expression von Hsp 70 hervorzurufen. Im weiteren galt es jedoch zu untersuchen, ob der durch MG132 initiierte protektive Effekt gegenüber Hitze-Schock möglicherweise in einer HSP-unabhängigen Reaktion nach oxidativem Stress beobachtet werden kann.

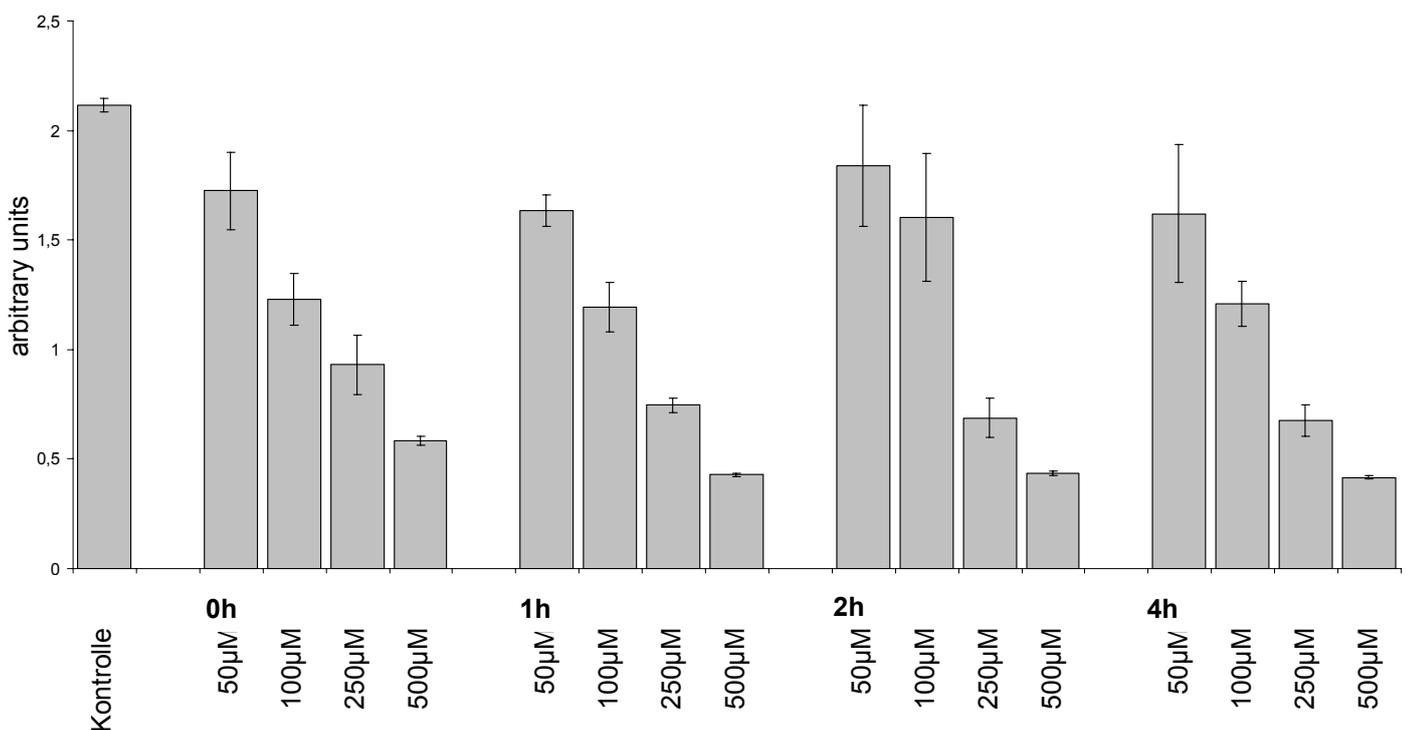


Abb. 20: Zellüberleben neonataler Rattenkardiomyozyten im XTT-Test nach Inkubation mit H₂O₂ unterschiedlicher Konzentrationen für 1 Stunde und variablen Nachinkubationszeiträumen. Mittelwert ± SEM (n=3).

Vor diesem Hintergrund wurden die neonatalen Myozyten nach oben beschriebenem Protokoll mit MG132 in einer Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM für eine Stunde inkubiert und nach einer Nachinkubationszeit von 0 h bis 4 h einem letalen Oxidationsstress durch H_2O_2 in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM , 250 μM und 500 μM ausgesetzt. Anschließend wurde die metabolische Aktivität innerhalb der Stimulationsreihen durch den XTT-Test bestimmt.

Abbildung 20 zeigt eine Übersichtsgaphik der erhobenen Parameter. Deutlich wird die gegenläufig korrelierende Abhängigkeit des Zellüberlebens mit Zunahme der H_2O_2 -Konzentration. Innerhalb der jeweiligen Konzentrationsgruppen ließ sich kein wesentlicher Unterschied in Vitalität nach zunehmender Nachinkubationszeit beschreiben. Im folgenden wurde als letaler Zellstress eine H_2O_2 -Konzentration von 250 μM gewählt. Hier zeigte sich eine weitestgehende Konstanz in Reduktion der Zellvitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe im Mittel um den Faktor 2,8.

Im Weiteren erfolgte die Stimulation neonataler Ratenkardiomyozyten mit MG132 (0,1, 1 und 10 μM , 1 h) mit folgender Nachinkubationszeit von 0 h bis 4 h. Ein letaler Oxidationsstress durch 250 μM H_2O_2 folgte und die Zellvitalität wurde durch den XTT-Test bestimmt. Abbildung 21 zeigt eine Übersichtsgraphik der erhobenen Parameter.

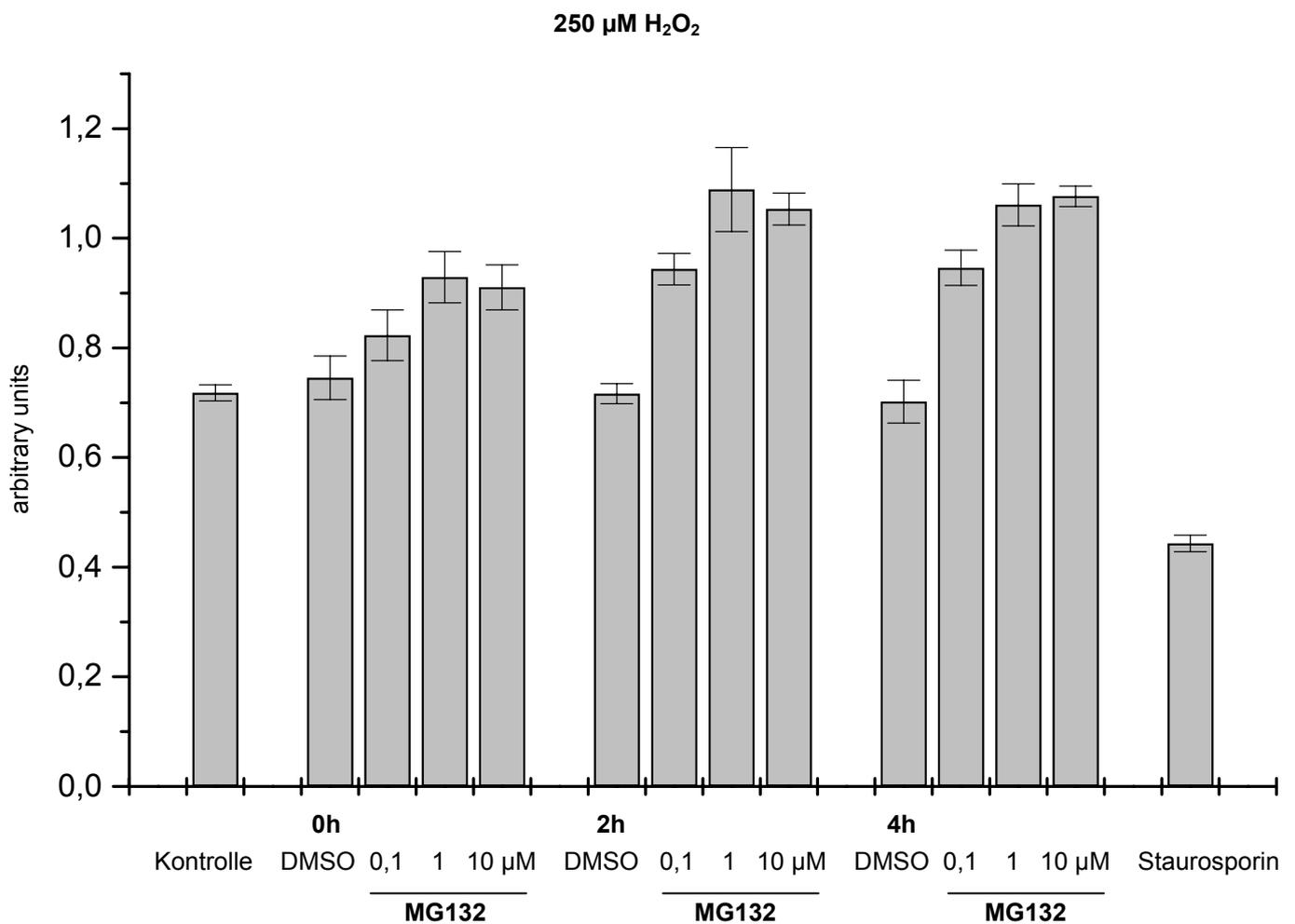


Abb. 21: Übersicht über das Zellüberleben neonataler Rattenkardiomyozyten im XTT-Test nach Inkubation mit 250 μM H_2O_2 für 1 Stunde und variablen Nachinkubationszeiträumen. Mittelwert \pm SEM (n=3).

Insgesamt lässt sich sagen, daß eine Nachinkubation der Zellen ≥ 2 h nach Stimulation mit MG132 einen Vorteil im Überleben bedeutet. Das beste Überleben zeigte die Gruppe 1 μ M MG132 mit Nachinkubation von 2 Stunden. Hier ergab sich ein vermehrte Zellvitalität um den Faktor 1,5. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht berechnet werden. Innerhalb der einzelnen Inkubationszeiträume scheint auch hier eine positive Korrelation von Proteasom-Inhibitor-Dosis und Zellüberleben zu bestehen. Insbesondere die Zellen, die mit 0,1 μ M und 1 μ M MG132 inkubiert wurden zeigen ein deutlich besseres „outcome“ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sowie zur allgemeinen unbehandelten Gruppe. Bei weiterer Erhöhung des Inhibitors auf 10 μ M konnte keine weitere Verbesserung im Überleben detektiert werden.