

## 4. Diskussion

### 4.1 Expression verschiedener HSP-Untereinheiten in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Proteasom-Inhibition

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Inhibition des Proteasoms mit MG132 eine Hitze-Schock-Antwort, vermittelt durch die gesteigerte Synthese von Hitze-Schock-mRNA sowie Hitze-Schock-Protein (HSP), erreicht werden kann. Dieses resultiert in einer Protektion neonataler Rattenkardiomyozyten gegenüber hyperthermem sowie oxidativem Stress. Die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) bedingt eine Akkumulation von geschädigten sowie intakten regulatorisch wirkenden Proteinen. Dieses löst im Sinne eines positiven feedback-Mechanismus eine Induktion von HSP-Genen und die vermehrte Expression von HSP aus [85, 89-91]. Bisher konnte eine Induktion von HSP's in Lungenfibroblasten [92], U937-Zellen [88], HepG2-Zellen [93], embryonalen Mäusefibroblasten [94] und in den Zellen des Pilzes *Saccharomyces Cerevisiae* [95] nach Proteasom-Inhibition nachgewiesen werden. Bush et al. konnten 1997 nach Proteasom-Inhibition durch MG132 eine vermehrte Synthese des Hitze-Schock-Proteins Hsp 72 in Nierenzellen von Kaninchen zeigen. Diese Zellen wiesen eine verbesserte Resistenz gegenüber letalem hyperthermen Stress auf [85]. In kardialen Myozyten ist eine Steigerung der HSP-Expression durch Proteasom-Inhibitoren (PI) vereinzelt beschrieben worden [62]. Ebenso gibt es Hinweise, daß das konstitutionelle Vorhandensein von HSP von Spezies zu Spezies unterschiedlich ist und die Möglichkeit einer exogenen Induktion differieren kann. Im Herzmuskel des Hasen beispielsweise werden HSP konstitutiv in vergleichbarem Maße wie im übrigen Gewebe exprimiert [96]. Spezies der adulten Maus hingegen zeigen kardial konstitutiv einen im Vergleich zum übrigen Gewebe reduzierten Gehalt an HSP [97]. Ein Hinweis auf kardioprotektive Effekte verschiedener HSP nach ischämischem Stress im transgenen Mausmodell konnte bereits 1999 beschrieben werden. Auch gibt es Hinweise auf einen positiven Effekt von HSP auf die Reduktion apoptotischer und nekrotischer Schädigungen am Herzmuskel nach oxidativem oder hyperthermischem Stress [98].

#### 4.1.1 Hitze-Schock-Faktoren (HSF); Rolle in der HSP-mRNA-Synthese

Der exakte Mechanismus über den PI eine vermehrte HSP-Expression induzieren ist noch nicht ausreichend bekannt. Einige Arbeiten geben jedoch Aufschluss darüber, daß PI über einen spezifischen Weg, der unter anderem einen Phosphorylierungsschritt beinhaltet, die Hitze-Schock-Faktoren Hsf 1 - 4 aktivieren [88, 93-95, 99, 100]. Awasthi et al. spezifiziert in einer neueren Publikation diesen Mechanismus mit einhergehend vermehrter HSP-Synthese auf die Faktoren 2 – 4. Hsf 1 ließ sich nach Inkubation von Augenlinsenepithel-Zellen mit 10 µM MG132 nicht vermehrt nachweisen [101].

Beschrieben wird, daß die Koaktivierung von Hsf 1 und Hsf 2 nach Hitze-Schock (HS) einen additiven Effekt auf das Expressionsmuster von Hsp 70 hat und eine wesentlich höhere Hsp 70-Genexpression hervorruft als z.B. eine isolierte Aktivierung von Hsf 1 [55]. Dieser Tatbestand könnte darauf hindeuten, daß Hsp 70 und die anderen Untereinheiten der HSP-Familie nach PI neben den bisher bekannten Transkriptionsfaktoren auch durch andere Einflüsse, wie eine direkte Einwirkung des PI etwa in der Promoterregion der HSP-Gene oder über einen bisher unbekanntem „Pathway“, induziert werden können. Lüss et al. beschreiben eine zumindest partiell durch Kinasen regulierte Expressionssteigerung von HSP. So konnte seine Arbeitsgruppe eine in Rattenkardiomyozyten durch MG132 induzierbare Aktivitätssteigerung einer ‚Mitogen-aktivierten Protein Kinase‘, p38 MAP, nachweisen. 10 µM MG132 bewirkten bereits nach 30 Minuten einen signifikanten Anstieg der p38 MAP-Aktivität. Konsekutiv ließ sich nach 2 Stunden eine sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant vermehrte Expression von Hsp 32 und Hsp 72 nachweisen [102]. Andere Autoren beschrieben bereits einen vergleichbaren Mechanismus in anderen Zellarten in deren Zusammenhang p38 MAP als ‚Stress-Kinase‘ bezeichnet wird [85, 88]. Als Regulatorprotein kommt in dieser Kaskade möglicherweise der SAPK2 (stress activated protein kinase 2) eine entscheidende Rolle zu. Diese scheint der p38 MAP nach PI-Stimulation vorgeschaltet zu sein und stellt somit ein weiteres Glied in der Hitze-Schock-Response-Kette dar [103]. Lüss et al. untermauerten die Relevanz von p38 MAP in der Hitze-Schock-Antwort, indem sie die Kardiomyozyten vor MG132-Stimulation mit dem p38 MAP Kinase-Inhibitor

SB20219 inkubierten. Der anschließende Western Blot zeigte eine signifikante Reduktion der Hsp 32- und Hsp 72-Expression im Vergleich zur alleinigen MG132-Kontrolle [102]. Auch hier zeigten andere Arbeitsgruppen entsprechende Mechanismen in anderen Zellarten sowie in Zusammenhang mit einer hyperthermisch initiierten Hitze-Schock-Protein-Antwort [104-106].

Darüber hinaus beschreiben einige Autoren, daß die HSF-Aktivität im Laufe einer Hitze-Schock-Antwort auch abnehmen kann [58, 59, 107]. Dieses beruht auf verschiedenen Mechanismen. Hsf 2 hat eine insgesamt kurze Halbwertszeit. Im weiteren haben im Verlauf einer Hitze-Schock-Antwort permanent ansteigende HSP-Spiegel einen negativen Effekt auf die HSF-DNA-Bindungs-Aktivität und können somit als eine Art Feedback-Mechanismus verstanden werden, der die Ausprägung der Hitze-Schock-Antwort reguliert. Es zeigte sich ebenfalls, daß sich eine Hsf 1-Phosphorylierung sowohl positiv als auch negativ auf seine DNA-Bindungswahrscheinlichkeit auswirken kann [107-109]. Satyal et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, daß eine übermäßige Expression des „Nuclear-Hitze-Schock-Faktor-Binding-Protein-1 (HSBP1) die Hsf 1-Aktivierung blockiert [110]. HSBP1 interagiert mit dem aktiven, homotrimerisierten Hsf 1 während des Hitze-Schock und verhindert auf diese Weise die DNA-Bindung. Letztendlich muß jedoch gesagt werden, daß der gesamte Regulationsablauf die HSF betreffend nicht vollständig verstanden ist und insbesondere die Aufklärung der Interaktion der einzelnen HSF noch weiterer Untersuchungen bedarf.

#### 4.1.2 Einfluss der Proteasomhemmung auf die HSP-mRNA und -Protein Expression

Bei Betrachtung der mRNA-Expressionsraten der HSP nach Proteasom-Inhibition wird deutlich, daß in allen hier untersuchten HSP-Untereinheiten eine gesteigerte Expression gegenüber der unbehandelten sowie der DMSO-Kontrolle zu beobachten ist. Insgesamt ließ sich in der mRNA-Synthese der neonatalen Rattenkardiomyozyten sowohl eine Abhängigkeit von Dosis des PI sowie ein Bezug zur Dauer der Nachinkubation nach Stimulation aufweisen. Maximale mRNA-Expressionen zeigten sich für alle HSP's nach 10 µM MG132 und einer Nachinkubationszeit von zwei Stunden. Eine weitere Dosissteigerung oder Verlängerung des Zeitintervalls brachte keine Verbesserung hinsichtlich einer vermehrten Synthese.

Das kleine Hsp 27 ließ sich in der RT-PCR nach Proteasom-Inhibition signifikant erhöht detektieren. Der parallel durchgeführte Western Blot zeigte diesbezüglich jedoch keinen vermehrten Proteinnachweis. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für Hsp 60 und Hsp 90. Auch hier ließ sich in der mRNA eine signifikante Steigerung der Expression verzeichnen, eine Antwort auf Protein-Ebene blieb jedoch jeweils aus.

Anders verhielt es sich mit den Expressionsleveln für Hsp 70. Hier konnte eine deutlich gesteigerte Synthese der mRNA nach einer Inkubation mit 10 µM MG132 innerhalb von 2 h unter Erreichen des Signifikanzniveaus beobachtet werden. Im Western Blot zeigte sich in der entsprechenden Stimulationsgruppe bereits eine angedeutet stärkere Proteinbande gegenüber den Kontrollgruppen. Evident kräftiger konnte das Signal nach 4 h Nachinkubation detektiert werden, so daß im Fall des Hsp 70 die sichere Korrelation von Antwort auf mRNA-Ebene mit folgend vermehrter Hitze-Schock-Protein Synthese nach Einsatz eines Proteasom-Inhibitors gelang. Diese Diversität in den Expressionsmustern der HSP deuten auf eine unterschiedlich starke Aktivierung der verschiedenen HSP-Untereinheiten hin und lassen vermuten, daß die Hitze-Schock-Proteine einer differentiellen Regulation ihrer Expression nach Inhibition des Proteasoms mittels MG132 unterliegen.

Vergleichendes zeigten Awasthi et al. 2005 in der mRNA- und Proteinantwort nach Inkubation von epithelialen Augenlinienszellen mit MG132. Zusammenfassend konnte eine vermehrte Expression der mRNA kleiner HSP wie  $\alpha$ B-crystallin und Hsp 27 beschrieben werden, ohne wesentliche Veränderung zeigten sich Hsp 70 und Hsp 90. Im Western Blot ließ sich jedoch eine gesteigerte Proteinsynthese für Hsp 27, 70 und 90 detektieren. [101, 111-113].

Als möglich ursächlich für die zuvor genannten und auch in unseren Ergebnissen nachweisbaren Unterschiede in mRNA- und Protein-Expression von Zellen nach Proteasom-Inhibition werden posttranslationale Modifikationen durch andere Proteasen wie z.B. Calpain diskutiert [101, 114]. Calpain kommt in einer Mehrzahl der Zellen im Zytosol in zwei Typen, dem Calpain I und II, vor. Nachgewiesen wurde bisher, nach Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ , ein Einfluss auf die Degradation von alpha-Crystallinen. Im Mausmodell zeigte sich eine Calpain-Aktivierung nach akutem Myokardinfarkt mit im weiteren verminderter Expression zytoskelettaler Elemente wie Sakroglykane und Dystrophin. Die Autoren sahen darin eine Begünstigung der Entstehung post-ischämischer Kardiomyopathien und dem chronischen Herzversagen [115].

Weitere kleine HSP wie das konstitutionell in Zytoplasma und Zellkern vorhandene  $\alpha$ A-Crystallin zeigten sowohl auf RNA-Ebene wie auch im Protein eine verminderte Expression nach Proteasom-Inhibitor-Inkubation.  $\alpha$ A-Crystallin werden ebenfalls sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen zugesprochen. Als Hauptfunktion wird jedoch in erster Linie die antiapoptotische Komponente diskutiert. Auch hier scheinen die Zusammenhänge der intrazellulären Induktion also multifaktoriell bedingt zu sein und vermutlich einer gegenseitigen Abhängigkeit und Kontrolle zu unterliegen [116-118].

Eine ebenfalls differentielle Regulation von HSP-Untereinheiten nach MG132-Behandlung von Rattenkardiomyozyten wurde wie bereits erwähnt 2002 durch Lüss et al. demonstriert. Hier wurden zwar in Abhängigkeit von Zeit der Einwirkung (0 - 6 h) und Konzentration des Proteasom-Inhibitors MG132 (10  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$ ) eine einheitliche Hochregulierung der mRNA-Level der HSP-Untereinheiten 32, 60 und

72 nach 2 Stunden beschrieben; eine Veränderung der HSP-Konzentrationen konnte jedoch nur für Hsp 32 und Hsp 72 nachgewiesen werden, wohingegen die Hsp 60 Protein-Konzentration unverändert blieb. Für HSP 72 zeigte sich nach 6 Stunden eine um das 15-fache gesteigerte Synthese, vergleichend im Hitze-Schock eine Steigerung um den Faktor 25 [102]. In unserer Versuchsdurchführung ließen sich für Hsp 70 eine vergleichbare Steigerung um den Faktor 18, nach Hitze-Schock bis um den Faktor 90 detektieren. Auch Kawazoe et al. konnten 1998 zeigen, daß durch die Inhibition des Proteasoms in Hühnererythroblasten mittels MG132 Hsp 70 in besonderem Maße induziert wurde. Die Untereinheiten Hsp 25, Hsp 40 und Hsp 90 hingegen waren wesentlich schwächer exprimiert [99]. Andere Autoren beschreiben, daß Hsp 70 nach pharmakologischer Stimulation oder durch verschiedene Stressformen wie z.B. Hypoxie und Oxidation induziert werden kann und dies allein bereits zytoprotektive Effekte hervorruft [98, 119-123].

#### 4.1.3 HSP-vermittelte zytoprotektive Effekte von Proteasom-Inhibitoren

In den unter 4.1.2 aufgeführten Ergebnissen sowie in der Literatur existieren seit langer Zeit überzeugende experimentelle Daten, die belegen, daß verschiedene Stimuli, unter ihnen auch Proteasom-Inhibition, eine gesteigerte HSP-Synthese in Zellen induzieren können und dieses, aufgrund der Chaperon-Funktion der HSP, mit einem verbesserten Schutz gegenüber nachfolgendem Stress assoziiert ist. Eine indirektere zellschützende Funktion kommen Hitze-Schock-Proteinen über eine unterstützende Wirkung auf das Zytoskelett und der Zellintegrität zu. Laing et al. konnten nachweisen, daß HSP einer hypertherm bedingten Degradation von Connexin 43 in gap junctions entgegenwirkt. Über die Hemmung proteolytischer Vorgänge konnte eine Stabilisierung der Zellen hervorgerufen werden und somit eine Protektion gegenüber Hitze-Stress erreicht werden [124, 125].

Martin et al. beschrieben 1997 einen zytoprotektiven Effekt der Familie der kleinen HSP in ischämischem Myokard [126]. Sie konnten nachweisen, daß die isolierte, selektive Expression von Hsp 25, Hsp 27 und  $\alpha$ B-Crystallin durch adenovirale Vektorentransfektion zu einem verbesserten Schutz gegen Ischämien in adulten Kardiomyozyten führt. Eine mit zunehmender Hsp 27-Expression steigende

Protektion gegenüber Hitze-Schock konnte bereits 1993 in mit Hsp 27-Plasmid transfizierten Mäusefibroblasten gezeigt werden [127].

Die exakten Mechanismen, die zum Schutz von Herzgewebe durch HSP führen, konnten auch in den erwähnten Studien nicht näher spezifiziert werden. Es gibt jedoch Hinweise, daß sowohl Hsp 27 als auch  $\alpha$ B-Crystallin mit Filamenten des Zytoskelettes interagieren und diese stabilisieren. Hsp 27 inhibiert die Polymerisation von Aktinfilamenten, wohingegen  $\alpha$ B-Crystallin in Höhe der I-Streifen der Myofibrillen an das Filament Desmin bindet und auf diese Weise dessen Aggregation unter ischämischen Bedingungen verhindert [52]. Eine weitere Studie zeigte, daß Hsp 27 ebenfalls den apoptotischen Zelltod durch Unterdrückung des apoptoseinduzierenden Zelloberflächenrezeptors Fas/APO-1 regulatorisch beeinflusst [128]. Weitere Studien konnten zeigen, daß HSP Zellen über verschiedene andere Mechanismen vor letalem Stress schützen können. Hsp 70 inhibiert die Apoptose in Stress exponierten Zellen über einen Kaspase vermittelten Mechanismus [129]. Kaspasen sind als Proenzym synthetisierte Cystein-Proteasen von denen bis dato 14 verschiedene identifiziert und isoliert werden konnten. Funktionen werden ihnen in apoptotischen (Kaspase 8, 9 und 10), katabolen (Kaspase 3, 6 und 7) und auch inflammatorischen (Kaspase 1 und 11) Prozessen zugeordnet [130, 131]. Über eine Aktivierung der Kaspasen erfolgt kaskadenartig die Induktion proapoptotischer Eiweiße und somit die Initiierung des Zelluntergangs. Eine direkte Verbindung der Cystein-Proteasen bei der Vermittlung des programmierten Zelltodes scheint ebenso zu IFN- $\gamma$  und Tumor Nekrose Faktoren [132-134] sowie über die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) zu bestehen [135, 136], welche bei Aktivierung die pro-apoptotische Kaskade initiiert. Nach Inhibition der JNK z.B. durch eine mutante Form des JNK-Aktivators SEK1 oder durch kurze Inkubation mit MG132 konnte jedoch über eine Hsp 72 vermittelte Reaktion eine Suppression der JNK erreicht und ein Zelluntergang verhindert werden [88]. Neben der Einleitung der Hitze-Schock-Antwort konnte ebenso in diesem Zusammenhang durch Proteasom-Inhibitoren nachgewiesen werden, daß MG132 eine direkt hemmende Wirkung auf die Kaspase-Aktivierung ausübt [132]. Die Proteasom-Inhibitoren beinhalten somit einen multifaktoriellen Einfluss in der Hitze-Schock-Antwort womit ihnen eine Steuerfunktion auf unterschiedlichen Regulierungsebenen zukommen kann.

#### 4.1.4 Protektion durch Proteasom-Inhibition bei subletalem Stress

Wie bereits beschrieben lassen sich im Myokard neonataler Rattenkardiomyozyten Hitze-Schock-Proteine nach Stimulation mit Proteasom-Inhibitoren induzieren. Die vermehrte Synthese von HSP ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion in geschädigten Zellen assoziiert [62, 98].

Hsp 27- und Hsp 70-mRNA sowie das Hitze-Schock-Protein 70 sind auch in unseren Ergebnissen nach Proteasom-Inhibition in neonatalen Rattenkardiomyozyten vermehrt nachweisbar. Um einen kardioprotektiven Effekt dieser vermehrten Expression zu untersuchen wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Stimulation mit Proteasom-Inhibitor verschiedenen Formen letalem Stress ausgesetzt. Im anschliessend durchgeführten XTT-Test konnte ein durch Proteasom-Inhibitor vermittelter kardioprotektiver Effekt in neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. Anzumerken ist, daß mit dem XTT-Test Veränderungen im zellulären Metabolismus detektiert werden können. Eine Reduktion in der Zellaktivität läßt somit auf eine Verminderung der vitalen Zellen bzw. der Zellzahl rückschliessen. Eine Differenzierung zwischen Apoptose oder zellulärer Nekrose ist jedoch nicht möglich. Möglich verantwortliche bzw. involvierte Mechanismen für die Verbesserung der Zellvitalität nach Proteasom-Inhibition wurden zuvor bereits diskutiert. Auch Buzzard et al. spekulieren über eine gesteigerte HSP-Expression als einen Trigger für einen antiapoptotischen Effekt im Sinne eines kardioprotektiven Mechanismus [137]. Vor allem Hsp 70 verminderte in ihren Ergebnissen die Apoptoseaktivität, was an Mäusefibroblasten nach Exposition mit Apoptoseinduktoren wie Hitzestress, TNF- $\alpha$  und Ceramid nachgewiesen werden konnte [137]. Im weiteren suggerieren ihre aufgeführten Daten, daß ein Schutz gegenüber Hitze und Oxidation oder andere Stressoren wie z.B. Ischämie oder Hypoxie auch nach differentieller Induktion einzelner Mitglieder der unterschiedlichen HSP-Familien erzielt werden kann, was sich in unseren Ergebnissen bestätigt fand.

Die zellulären Abwehrmechanismen durch molekulare Chaperone gegen oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind bisher nur wenig untersucht worden. Unsere Ergebnisse zeigen, daß durch MG132-Stimulation ein zytoprotektiver Effekt gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erreicht werden kann. Entsprechend den Hitze-Stress-Daten zeigte eine Stimulation

der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  mit 2- und 4-stündiger Nachinkubation den besten Zellschutz und ein verbessertes Überleben gegenüber den Kontrollen. Auch hier lassen die weiter durchgeführten Versuche daraufhin deuten, daß ein HSP-vermittelter zytoprotektiver Mechanismus für den Zellschutz verantwortlich zu sein scheint. Wasserstoffperoxid selber hatte im Western Blot keinen direkten Einfluss auf die HSP-Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten. In Linsenepithelzellen von Mäusen ließ sich jedoch nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachten, daß eine um das 2-fache Hochregulation des kleinen HSP  $\alpha\text{B}$ -Crystallin, neben u.a. Glutathion Peroxidase und Ferritin, in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -resistenten Zellen nachzuweisen war. Eine 5-fach geringere Expression zeigte wiederum das Chaperon  $\alpha\text{A}$ -Crystallin. Weitere Arbeiten zeigen jedoch, daß  $\alpha\text{B}$ -Crystallin in vielen Zellreihen konstitutionell höher exprimiert wird als  $\alpha\text{A}$ -Crystallin [138, 139]. Insgesamt wird eine im Vergleich deutlich vermehrte Expression von  $\alpha\text{B}$ -Crystallin nach verschiedenen Stressoren wie Hitze oder Veränderung des zellulären osmotischen Gleichgewichts beschrieben [140-142]. Ein Einfluss der kleinen HSP auf die Zellvitalität nach Stressung durch Oxidantien konnte also schon mehrfach beschrieben werden. Unsere Daten zeigen zum ersten Mal, daß eine vermehrte intrazelluläre Expression von Hsp 70 ebenso eine verbesserte Resistenz gegenüber oxidativem Stress beinhaltet.

Powell et al. beschreiben neben anderen Arbeitsgruppen eine innerhalb der Proteasom-Einheit möglicherweise getrennte Funktion des 20S und des 26S Proteasoms in der post-ischämischen Regeneration des isolierten Rattenherzens. Eine entscheidendere Rolle scheint ihren Angaben nach der 20S-Untereinheit zuzukommen. Eine Ubiquitinierung sowie ATP scheinen hier, im Gegensatz zum 26S Proteasom, für die Degradation von Eiweißen nicht notwendig zu sein. Ein gesteigerter Nachweis an polyubiquitinierten Proteinen ließ sich ebenfalls als Indikator einer verminderten 26S-Aktivität nachweisen. Folgernd stellten sie die Frage, ob durch MG132 vorrangig eine Inhibierung der 20S-Untereinheit und somit die Vermittlung einer Zytoprotektion erfolgt. Letztendlich geklärt ist dieser Punkt bis dato noch nicht. Die sensible Balance zwischen MG132 vermitteltem protektiven Effekt und pro-apoptotischer Funktion scheint Proteasom-Inhibitor-Dosis abhängig zu sein [62, 143].

#### 4.1.5 Hitze-Schock-Protein unabhängige Mechanismen der Zytoprotektion nach Proteasom-Inhibition

Wie bereits beschrieben weisen PI sowohl zytoprotektive wie auch pro-apoptotische Mechanismen und Funktionen auf. Ein Erklärungsansatz ist der durch PI verminderte Abbau der Apoptoseinhibitoren p53, c-myc und eine verringerte NF- $\kappa$ B-Aktivierung [144, 145]. Einen ebenfalls proapoptotischer Effekt konnten Meiners et al. in glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenkarotiden nach lokaler Applikation von MG132 in unterschiedlichen Dosierungen (1  $\mu$ mol/l, 10  $\mu$ mol/l und 100  $\mu$ mol/l) demonstrieren, der mit Erhöhung der Konzentration des eingesetzten PIs zunahm [72]. Eine unterschiedliche Funktionalität in Abhängigkeit von der Konzentration wird ebenso in anderen Studien diskutiert. In niedrigen Konzentrationen verursachen PI eine verminderte Protein-Degradation und Lipid-Peroxidation, ohne Apoptose zu induzieren; in hohen Konzentrationen induzieren sie jedoch Apoptose begleitet von oxidativen DNA-Schäden, herabgesetzten Glutathion-Spiegeln und gesteigerter NO-Produktion [146]. Ähnliches beschreiben Powell et al. nach Beobachtung der post-ischämischen Erholung mit MG132 behandelte Rattenherzen. Auch hier ließ sich eine Verschlechterung der Funktionalität mit zunehmender Konzentration von MG132 nach ischämischem Intervall beobachten [62].

Es existieren somit zwei gegensätzliche Mechanismen, die dosisabhängig Zellen Apoptose durchlaufen lassen oder sie vor dem programmierten Zelltod bewahren. Letztendlich ist jedoch auch ein möglich direkt toxischer Effekt der PI als Auslöser für eine gesteigerte Apoptoseinduktion in Betracht zu ziehen [146]. Einige neuere Studien geben Hinweise darauf, daß Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) bei der Protektion von ischämisch gestressten Zellen involviert sind [147]. PI induzieren eine gesteigerte Synthese von MAPK. P38 MAPK scheint über einen bisher noch unbekanntes Mechanismus Hsf 1 und Hsf 2 zu hyperphosphorylieren, die ihrerseits eine Hitze-Schock-Antwort auslösen.

Lüss et al. konnten 2002 zeigen, daß die Inhibition des Proteasoms mittels MG132 einen protektiven Effekt auf neonatale Herzmuskelzellen der Ratte hat. Nach hyperthermer Exposition dieser Zellen beobachteten sie einen 45%-igen Abfall der LDH-Level im Vergleich zu der Kontrollgruppe, wenn diese zuvor mit dem PI MG132

(1  $\mu\text{M}$ ) behandelt worden war [102]. Der spezifische p38 MAPK-Inhibitor SB202190 minderte diesen protektiven Effekt, so daß p38 MAPK wenigstens in Teilen für einen zytoprotektiven Effekt nach Proteasom-Inhibition verantwortlich gemacht werden musste. Diese Ergebnisse berücksichtigend, kann auch in unserer Studie ein p38 MAPK-vermittelter Effekt nach Proteasom-Inhibition bei der Interpretation der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Neueren Erkenntnissen zufolge können PI, unter ihnen auch MG132, zytoprotektive Effekte auch über eine vermehrte Expression des Stress Response Proteins Hämoxigenase-1 (HO-1) induzieren [148]. HO-1 ist ein zelluläres Enzym, welches durch die Degradation des Häm die Hämkonzentrationen kontrolliert und die zelluläre Homöostase aufrechterhält. Erhöhte HO-1-Konzentrationen konnten bisher nach oxidativem Stress, Hyperthermie, Hypoxie, Hyperoxie, UV-Bestrahlung und Hitze-Stress beobachtet werden [148]. HO-1 wirkt zytoprotektiv gegen oxidativen Stress und inhibiert Apoptose, was sowohl in Zellkultursystemen als auch in *in vivo*-Studien gezeigt werden konnte [149-153]. Weiterhin konnte nach partieller Inhibition der Proteasomfunktion durch den Einsatz nicht-toxischer Konzentrationen von MG132 eine deutliche Hochregulation von anti-oxidativ wirkenden Enzymen in primären Endothelzellen beobachtet werden. Insbesondere zeigte sich nach Einsatz von MG132 und folgendem oxidativen Stress durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine vermehrte Aktivität der Glutathion Peroxidase 3 (GPx3), welche sowohl die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wie auch von Lipidperoxiden katalysiert. Hierdurch konnte das Auftreten freier Sauerstoff-Radikale signifikant verringert und eine Verbesserung der endothelialen Funktion beobachtet werden [154]. Ähnliches konnte in, bis dato nicht publizierten, Untersuchungen von Dreger et al. in neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit MG132 konnte eine intrazellulär gesteigerte Synthese der anti-oxidativen Enzyme Superoxid Dismutase 1 (SOD1), der Katalase sowie ebenfalls der GPx3 und HO-1 gezeigt werden. Dieses resultierte nach Exposition mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer verringerten Formation von freien Radikalen sowie, als Zeichen der Zytoprotektion, einem signifikant verminderten Freiwerden von  $\text{LDH}^*$ .

---

\* Dreger et al., eingereicht

Eine nicht-HSP vermittelte Zytoprotektion in NRC scheint nach oxidativem Stress durch  $H_2O_2$  ebenso mitochondrialen Proteinen, insbesondere dem mitochondrialen ATP-binding cassette Protein 1 (mABC1) zuzukommen. Der genaue Mechanismus ist auch hier noch nicht verstanden, jedoch scheint sich mABC1 stabilisierend auf das mitochondriale Membranpotential auszuwirken und somit einem Zelluntergang entgegenzuwirken. Die Autoren diskutieren den kardioprotektiven Effekt als möglich bedingt durch ein Eingreifen von mABC1 in die zelluläre Eisen-Homöostase sowie eine regulierende Funktion durch Begünstigung eines erhöhten Umsatz von oxidativ geschädigten Membranproteinen [155].

Insgesamt, unterstützt durch die hier aufgeführten eigenen Ergebnisse, ist ersichtlich, daß die Zytoprotektion kardialer sowie anderer Zellen ein multifaktoriell und sehr komplex geregelter Mechanismus ist. Sicherlich ist bis dato nur ein geringer Teil der zellulären Funktionsabläufe bekannt und entschlüsselt. Weitere Studien sind somit nötig, um die vielfältigen Abläufe der Kardioprotektion allgemein und insbesondere nach Proteasom-Inhibition weiter zu verstehen und zu beschreiben.

## 4.2 Proteasom-Inhibitoren als potentielle Therapeutika

Der Einsatz von PI findet seit mehreren Jahren zu einem überwiegenden Teil im Rahmen biomedizinischer und biotechnologischer Forschung statt. Hier ist insbesondere die Zellphysiologie zu nennen, die sich zum Ziel setzt, die verschiedenen Eigenschaften und Aufgaben des Proteasoms besser zu charakterisieren und seine Bedeutung in der Pathophysiologie bestimmter Krankheiten weiter verstehen zu können. Aber auch im Hinblick auf ihre therapeutische Wirkung und dem damit möglicherweise klinischen Einsatz rücken Proteasom-Inhibitoren immer weiter in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses.

### 4.2.1 Behandlung neoplastischer Erkrankungen

Die meiste Erfahrung liegt momentan mit dem PI PS-341 (Bortezomib) vor. In hämatologisch-onkologischen in vitro Studien sowie im Tiermodell zeigte er eine deutlich antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen, eine Hemmung der Neoangiogenese und einen Apoptose induzierenden Effekt. Dieses ließ sich spezifischer durch die Inhibierung von NF $\kappa$ B und die Stabilisierung der Tumorsuppressor-Proteine p53, p27, p21, Bax und I $\kappa$ B $\alpha$  erklären [156-160]. Weiterhin konnte eine Sensibilisierung auf Chemotherapeutika und Radiatio sowie das Erreichen der Reversibilität bei Chemoresistenz in vitro und im in vivo Xenograft Tumormodell erreicht werden [160]. Bortezomib ist der erste PI, der in klinischen Studien singularär oder in Kombinationstherapie eingesetzt wurde. Mittlerweile laufen mehrere Phase II- (SUMMIT, CREST) und Phase III-Studien (APEX), die einen signifikanten Vorteil im Überleben bei Patienten mit Plasmozytom zeigen [161-164]. In den USA ist PS-341 bereits für die Behandlung des therapierefraktären Multiplen Myeloms zugelassen [165, 166]. Vielversprechende Ergebnisse ließen sich ebenso für PS-341 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubicin, Melphalan, Prednisolon oder Thalidomid beschreiben [167-169]. Ansätze gibt es weiterhin im Einsatz zur Induktionstherapie vor Stammzell-Transplantation und es zeigten sich gute Erfolge mit beherrschbarer Toxizität beim Mantelzell- und anderen Lymphomen, der Leukämie sowie bei soliden Tumoren wie z.B. dem NSCLC, beim Pankreaskarzinom oder beim kolorektalen Karzinom [170-172].

Beim klinischen Einsatz von PI ist die Abschätzung und Kenntnis von unerwünschten Wirkungen für das sichere Patienten-Management unerlässlich. Bortezomib zeigte im Rahmen der aufgeführten Studien zwar häufiger Nebenwirkungen, diese konnten jedoch in allen Fällen als beherrschbar eingestuft werden. Hierzu gehörten mit bis zu 49%-iger Prävalenz Thrombozytopenien sowie zu geringeren Anteilen periphere Neuropathien oder gastrointestinale Beschwerden. [173]. Trotz der vielversprechenden Resultate weist Bortezomib nur eine eingeschränkte therapeutische Breite auf. Ähnliches ließ sich bereits für PI insgesamt in in vitro-Untersuchungen beobachten. Umso mehr wird ersichtlich, welcher intensiven Forschung es weiterhin bedarf, um die Wirkmechanismen von PI zu verstehen damit diese sicher und therapeutisch sinnvoll oder sogar prophylaktisch eingesetzt werden können.

#### 4.2.2 Behandlung inflammatorischer Erkrankungen

In Tiermodell-Studien mit Asthma bronchiale führte der Einsatz von PI über ihre anti-inflammatorische Wirkung zu protektiven Effekten [174]. Ebenso scheinen PI zur Behandlung von HIV-Infektionen herangezogen werden zu können, nachdem sich zeigte, daß sie die Freilassung von HI-Viren aus infizierten Zellen und deren Reifung blockierten [42, 175].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz kommt PI in der Immunsuppression bei z.B. autoimmun bedingten Erkrankungen oder aber in der Vorbereitung und Nachsorge nach Organtransplantationen zu. Als Beispiel ist hier der im Serum stabile und spezifisch die zentralen Proteasom-Aktivitäten inhibierende PS-519 zu nennen. Im Scid-hu Mausmodell zeigte sich die Möglichkeit einer effektiven Behandlung der Psoriasis [176]. Auch gelang unter Einsatz des PI in einem fokal zerebralen ischämischen Rattenmodell eine deutliche Reduktion des Infarktareals und der ischämisch bedingten Leukozyteninfiltration [177, 178]. Die einzeitige Behandlung von Schweinen mit PS-519 vor interventionell induzierter myokardialer Ischämie konnte eine deutliche Reduktion von Infarktparametern im Blutserum sowie eine Verminderung des Infarktareals und eine verbesserte kardiale Funktionalität nach Reperfusion zeigen. Ursächlich wurde hierfür die durch den PI vermittelte Reduktion

der proteasomalen Degradation von I $\kappa$ B und damit verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welcher eine entscheidende Rolle in der Ausprägung des Reperfusion-Schadens spielt, gemacht [83].

#### 4.2.3 Möglicher Einsatz von Proteasom-Inhibitoren in der Kardiologie

Einen interessanten Ausblick im Hinblick auf eine potentiell therapeutische Indikation würde die Charakterisierung eines pharmakologischen Präparats bieten, welches die Fähigkeit besitzt, über eine gesteigerte HSP-Expression kardioprotektive Effekte zu erzeugen ohne ungewünschte zelluläre Abwehrmechanismen zu aktivieren. Ein möglicherweise geeignetes Feld für den Einsatz solcher pharmakologischer Präparate bietet die interventionelle Kardiologie. In Deutschland werden jährlich über 100.000 Herzkatheteruntersuchungen pro Jahr durchgeführt, darunter gut ein Drittel mit Interventionen. Eine gefürchtete Komplikation nach Perkutaner Transluminaler Coronarer Angioplastie (PTCA) ist die Restenose des Gefäßes. Durch verbesserte Kathetermaterialien und neue Pharmazeutika, die effektiv die Thrombozytenaggregation hemmen, ist es gelungen, die Komplikationsrate in den ersten Tagen nach Intervention gering zu halten. Eine interessante therapeutische Indikation scheint sich aus einer experimentellen Studie zu ergeben, die Meiners et al. im Februar 2002 publizierten [72]. In dieser Arbeit konnte die Restenoserate in Carotiden der Ratte durch die lokale Applikation von MG132 kurz vor der Katheterintervention signifikant gesenkt werden. Meiners et al. erklärten diesen Effekt mit der starken antiproliferativen sowie antiinflammatorischen Wirkung über die Blockade der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der proapoptotischen Wirkung durch die Inhibition des Proteasoms mittels MG132. Durch Steigerung der Konzentration des PIs konnte sogar eine weitere Steigerung dieses Effektes beobachtet werden. Der PI scheint auf diese Weise einer Formation der Neointima, die als pathomorphologisches Korrelat einen erneuten Gefäßverschluss hervorruft, entgegenzuwirken. Unterstützend können hier ebenfalls die Ergebnisse von Stangl et al. aus 2004 angebracht werden. Sie konnten zeigen, daß MG132 einen wesentlichen Einfluss auf die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) hat. Unter Proteasom-inhibition konnte eine gesteigerte Aktivität der eNOS in Endothelzellen boviner Pulmonalarterien sowie in aortalen Abschnitten von Ratten

beobachten. Der PI bewirkte eine verbesserte zelluläre Homöostase und endotheliale Funktion, welches in der Therapie sowie Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung ist [179]. Auch die in unserer Arbeit vorgestellten Daten zeigen einen interessanten Ausblick für den Einsatz von PI etwa bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder chronisch ischämischer Herzkrankheit. Hier könnten sie durch die Induktion von HSP auf molekularer Ebene oxidativem Stress und ischämischem Zellschaden entgegenwirken.

Wie bereits besprochen ist die große Problematik des Einsatzes von PI beim Menschen bzw. Patienten, insbesondere bei prophylaktischem Ansatz, limitiert durch die zur Zeit noch bestehenden gravierenden toxischen Nebenwirkungen. Hier besteht noch erheblicher Forschungsbedarf und ein Zugewinn an Kenntnis über die Risiken und Grenzen des Einsatzes der PI um den breiten klinischen Einsatz dieser pluripotenten Substanzen zu ermöglichen.