

Aus dem CharitéCentrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Gert Baumann

Habilitationsschrift

**Molekulare Grundlagen der protektiven Effekte von  
Proteasominhibitoren im kardiovaskulären System**

zur Erlangung der venia legendi für das  
Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Henryk Dreger  
geboren am 27.01.1978 in Berlin

Eingereicht: Januar 2013  
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Felix  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi

---

<b>Inhalt</b>	
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	4
1.2. Proteasominhibitoren	6
2. Ergebnisse	9
2.1. Partielle Proteasominhibition hemmt Wachstumssignalwege und unterdrückt die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie	9
2.2. Kardioprotektion im oxidativen Stressmodell	17
2.3. Partielle Proteasominhibition aktiviert den Nrf2-Signalweg und schützt Kardiomyozyten vor oxidativem Stress durch Induktion antioxidativer Enzyme	25
2.4. Partielle Proteasominhibition schützt Nrf2-abhängig verschiedene kardiovaskuläre Zelltypen vor oxidativem Stress	34
2.5. Partielle Proteasominhibition führt durch mRNA-Induktion und -Stabilisierung zu einer humanspezifischen Induktion der Glutathionperoxidase 3	44
2.6. Langzeiteffekte von Proteasominhibitoren: die Histonmethyltransferase Ezh2 als möglicher Link zum Epigenom	55
3. Diskussion	66
3.1. Zelltyp- und dosisabhängige Effekte von Proteasominhibitoren	66
3.2. Langzeiteffekte von Proteasominhibitoren – ein Link zum Epigenom?	70
3.3. Fazit und Ausblick	73
4. Zusammenfassung	75
5. Literaturverzeichnis	77
6. Danksagung	89
7. Eidesstattliche Erklärung	90

### Abkürzungsverzeichnis

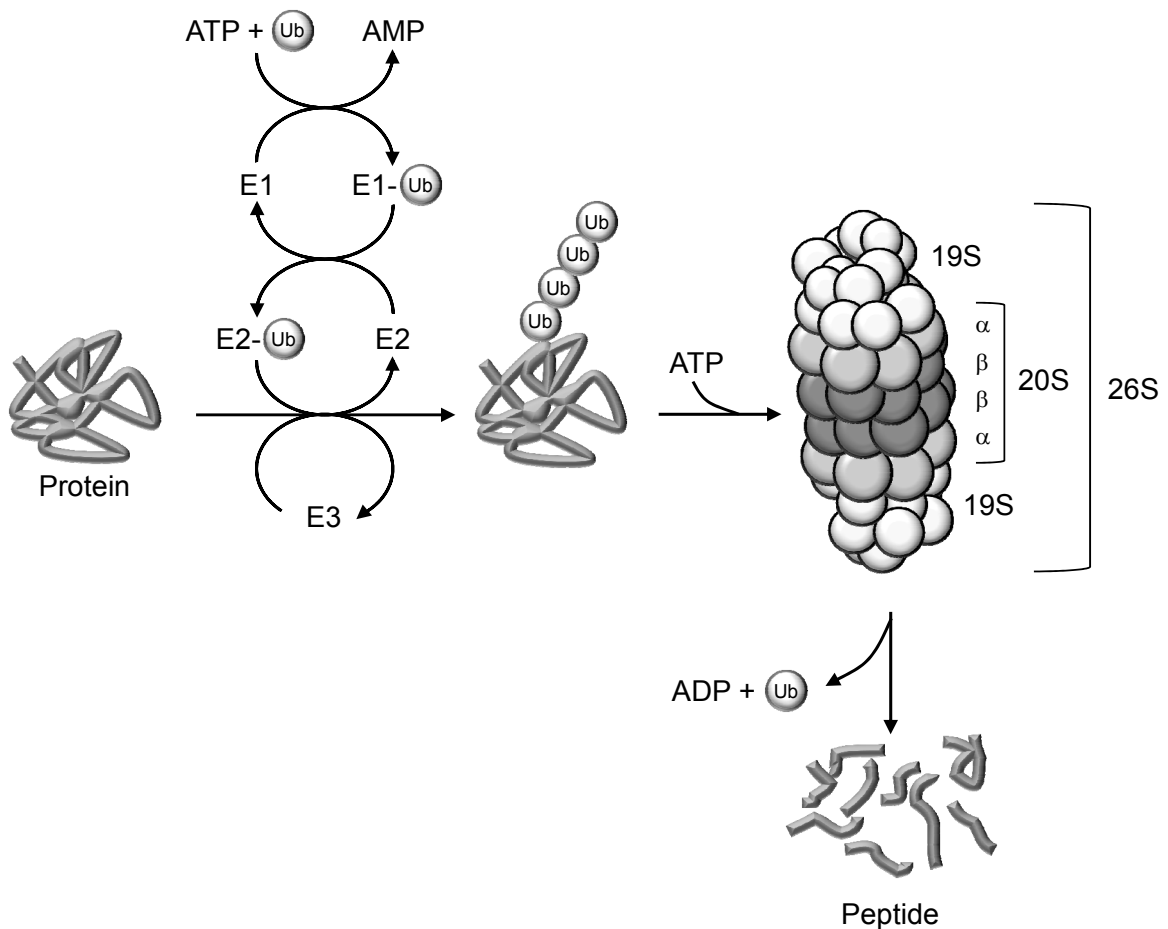
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ARE	antioxidant response element
ATP	Adenosintriphosphat
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin carrier protein
E3	Ubiquitin-Ligase
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Ezh2	Enhancer of zeste homolog 2
GPx3	Glutathionperoxidase 3
H3K27me3	Trimethylierung von Lysin 27 im Histon 3
HO1	Hämoxygenase 1
HUVEC	humane Nabelschnurvenenendothelzellen
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL $\beta$	Interleukin $\beta$
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KEAP1	Kelch like-ECH-associated protein 1
LDL	“low density“-Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PcG	Polycomb group
PRC2	Polycomb repressive complex 2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD1	Superoxiddismutase 1
TF3	Theaflavin-3,3'-digallat
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslated region

### 1. Einleitung

Kennzeichen der belebten Natur ist – neben Fortpflanzung, Wachstum und Selbstorganisation – das Vorhandensein von Stoffwechsel. Insbesondere der Proteinstoffwechsel ist von zentraler Bedeutung, denn erst die gezielte Synthese von Struktur- und Signalproteinen sowie von Enzymen erlaubt es Zellen, extrazelluläre Signale zu verarbeiten, sich auf ändernde Umweltbedingungen einzustellen sowie aufgenommene Nährstoffe weiter zu verarbeiten. Doch Stoffwechsel impliziert nicht nur den gezielten Aufbau benötigter Proteine. Kaum weniger wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten Zellfunktion ist der kontrollierte Abbau fehlgefalteter, degenerierter oder nicht mehr benötigter Proteine. Diese Aufgabe übernimmt in eukaryontischen Zellen das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).

#### 1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das UPS ist als essentieller Bestandteil des zellulären Proteinstoffwechsels verantwortlich für den regulierten Abbau defekter und überschüssiger Proteine [1,2]. Die für die Proteolyse zuständige katalytische Einheit ist das 20S Proteasom – eine zylindrische, spiegelsymmetrische, ca. 750 kDa schwere und 12 x 17 nm große Multipetidase, die aus je zwei identischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen aufgebaut ist [3-5]. Das katalytische Zentrum des Proteasoms formen die aus je sieben Untereinheiten ( $\beta$ 1- $\beta$ 7) bestehenden  $\beta$ -Ringe. Enzymatisch aktiv sind lediglich die Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 beider  $\beta$ -Ringe, welche mithilfe ihrer nukleophilen, N-terminalen Threonin-Reste Peptidbindungen hydrolysieren können [6]. Dabei zeigen die drei Untereinheiten eine unterschiedliche Affinität für verschiedene Aminosäuresequenzen:  $\beta$ 1 spaltet Peptidbindungen bevorzugt nach sauren Aminosäuren („caspase-like“-Aktivität),  $\beta$ 2 nach basischen Aminosäuren („trypsin-like“-Aktivität) und  $\beta$ 5 nach hydrophoben Aminosäuren („chymotrypsin-like“-Aktivität) [7-9]. Die beiden endständigen  $\alpha$ -Ringe hingegen formen den Eingang zur katalytischen Kammer, wobei die N-Termini ihrer jeweils sieben Untereinheiten ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 7) erst durch eine Konformationsänderung nach Bindung eines Aktivators (z.B. 19S oder 11S) den Eingang zur katalytischen Kammer freigeben [6,10,11]. Durch Bindung je eines 19S-Aktivatorkomplexes an beide  $\alpha$ -Ringe entsteht das physiologisch bedeutsame, hantelförmige, 2500 kDa große 26S-Proteasom (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Das Ubiquitin-Proteasom-System. Unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) stellen das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) sowie das Ubiquitin-carrier Protein (E2) Ubiquitin (Ub) der proteinspezifischen Ubiquitin-Ligase (E3) zur Verfügung. Die E3-Ligase katalysiert die kovalente Bindung des Ubiquitins an das abzubauenende Protein (bzw. an zuvor bereits gebundene Ubiquitinmoleküle). Das so markierte („ubiquitinierte“) Protein wird ATP-abhängig vom 26S-Proteasom abgebaut. Letzteres ist ein spiegelsymmetrisches Multimer und besteht aus einem 20S-Proteasom sowie zwei 19S-Aktivator-Komplexen. Das 20S-Proteasom trägt die katalytische Aktivität und besteht aus je zwei identischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen.

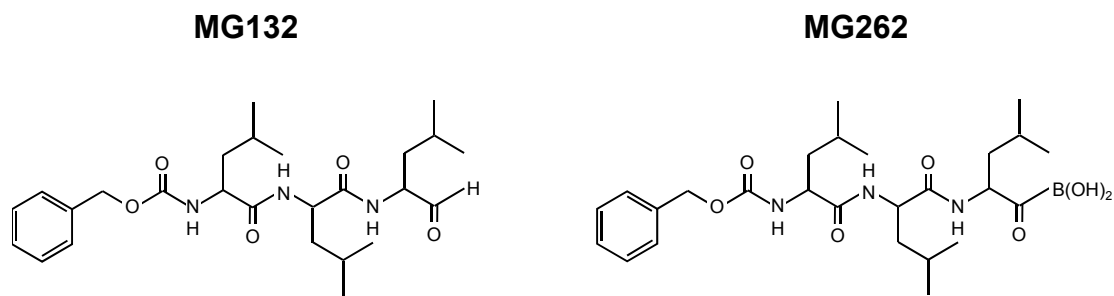
Entscheidend für den regulierten Proteinabbau ist jedoch, dass das Proteasom nahezu ausschließlich Proteine abbaut, die zuvor mit einer Kette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen – einem hochkonservierten, 8 kDa großen Polypeptid – markiert wurden [5]. Dieser Ubiquitinierung genannte Prozess wird gewährleistet durch eine dreistufige Enzymkaskade. Zunächst erfolgt ein Aktivierungsschritt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das anschließend Ubiquitin auf das „carrier protein“ E2 überträgt. Letzteres stellt Ubiquitin einer E3 Ubiquitin-Ligase

zur Verfügung, welche proteinspezifisch ist und Ubiquitin kovalent mit dem abzubauenen Protein verbindet (Abbildung 1) [12]. Anschließend werden weitere Ubiquitinmoleküle mit dem bereits proteingebundenen Ubiquitin kettenförmig verbunden [13]. So markierte Proteine können nun vom 19S-Aktivator-Komplex des 26S-Proteasoms erkannt werden. Der 19S-Aktivator-Komplex selbst besteht aus 19 Untereinheiten, wobei neun Untereinheiten die „lid“-Struktur bilden, welche ubiquitinierte Proteine bindet und deubiquitiniert. Die übrigen zehn Untereinheiten bilden die „base“, welche die abzubauenen Proteine ATP-abhängig entfaltet sowie durch Bindung am  $\alpha$ -Ring diesen öffnet und so das Protein den katalytischen Untereinheiten des 20S-Proteasoms zuführt [14-19]. Der zweite wichtige, gut charakterisierte Aktivator des 20S-Proteasoms, der 11S-Komplex (auch PA28 genannt), enthält keine ATPase-Aktivität, kann daher keine Proteine entfalten und dem Proteasom somit nur Peptide zur Degradation zuführen [20].

Während bis dato nur wenige E1/E2-Enzyme bekannt sind, wurde in den letzten Jahren eine große Zahl von E3-Ligasen identifiziert, wobei letztere verantwortlich zeichnen für die hohe Spezifität des proteasomalen Proteinabbaus [21]. Die somit aufwändig regulierte Protein-Ubiquitinierung verhindert nicht nur den ungeplanten Abbau intakter, weiterhin benötigter Proteine sondern erlaubt auch eine aktive Rolle des UPS in diversen zellulären Regulationsprozessen. So konnten zahlreiche Arbeiten in den letzten Jahren demonstrieren, dass das UPS an der Regulation von Entwicklungs- und Entzündungsprozessen [22,23], Zellzyklus und Apoptose [24,25], Transkription und Signalwegen [26-29], Proteinumsatz und -qualitätskontrolle [30], Immunantwort und Antigenpräsentation [31] sowie der Antwort auf oxidativen Stress [32] aktiv beteiligt ist.

### 1.2. Proteasominhibitoren

Von großer Bedeutung für das Verständnis von der Regulation des UPS war die Entwicklung spezifischer Proteasominhibitoren [7]. Vorrangig zum Einsatz kommen dabei Inhibitoren der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten, wie das Peptid-Aldehyd MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, Abbildung 2), das eine instabile Hemiactalbindung mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten eingeht [7]. Potenter, selektiver und in ihrer Wirkung länger anhaltend sind Peptidboronate wie MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)<sub>2</sub>, Abbildung 2) oder Bortezomib [7,33].



**Abbildung 2:** Struktur der häufig eingesetzten Proteasominhibitoren MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO) und MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)<sub>2</sub>).

Bereits früh erkannte man durch *in vitro*-Versuche mit Proteasominhibitoren, dass Zellen ohne ein funktionierendes UPS nicht überlebensfähig sind [2]. Während dies einerseits die essentielle Bedeutung des UPS für den Zellstoffwechsel unterstrich, suggerierte andererseits die Induktion von Apoptose ein therapeutisches Potential von Proteasominhibitoren [25]. Als erste Anwendung dieses neuen Therapieprinzips wurde der Proteasominhibitor Bortezomib 2003 von der amerikanischen Food and Drug Administration für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen [34].

Darüber hinaus ist das UPS durch den gezielten Abbau von Mediatorproteinen an der Regulation zahlreicher Signalwege beteiligt. Wichtigstes Beispiel für dieses Regulationsprinzip ist der NFκB-Signalweg, der eine zentrale Rolle in Entzündungsprozessen spielt. Zum einen entsteht erst durch die limitierte Proteolyse eines 105 kDa großen Vorläufer-Proteins die p50-Untereinheit von NFκB [35]. Zum anderen ist der Abbau des NFκB-Inhibitors IκB durch das UPS der entscheidende Schritt für die Aktivierung des NFκB-Signalwegs [36]. Die letztgenannte Arbeit von Palombella *et al.* wurde seit ihrem Erscheinen 1994 mehr als 1600-mal zitiert, was das Interesse einer Vielzahl von Arbeitsgruppen am antiproliferativen und antiinflammatorischen Potential der Proteasominhibitoren unterstreicht.

Für den kardiovaskulären Bereich konnte unser Labor 2002 zeigen, dass lokale Applikation eines Proteasominhibitors die Restenose-Rate nach einer Angioplastie im Tierversuch reduziert [37]. Nachdem unsere Arbeitsgruppe in dieser Studie durch den lokalen Einsatz eines hochdosierten Proteasominhibitors gezielt die antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekte einer potenten Hemmung des UPS ausnutzten, lag der Schwerpunkt unseres Forschungsinteresses in den ver-

gangenen Jahren auf den Effekten einer niedrig-dosierten, nicht-toxischen Proteasominhibition in kardiovaskulären Zellen. Ausgangspunkt hierfür war die systematische Analyse der differentiellen Effekte einer hoch-dosierten, toxischen und einer niedrig-dosierten, nicht-toxischen Proteasomhemmung in Endothelzellen. Dabei zeigte sich, dass niedrige Dosen der Proteasominhibitoren MG132 und MG262 vor allem die „chymotrypsin-like“-Aktivität des Proteasoms inhibierten und die übrigen katalytischen Untereinheiten eine hohe Restaktivität zeigten. Im Gegensatz dazu hemmten die hohen Dosen der Proteasominhibitoren alle katalytischen Aktivitäten des Proteasoms in hohem Maß. Dies korrelierte mit einer unterschiedlichen Änderung der Genexpression in „whole genome microarrays“. Interessanterweise führte die niedrig-dosierte Inhibition zu einer Induktion mehrerer antioxidativer Enzyme und einer konsekutiven Protektion der Zellen vor Wasserstoffperoxid-induziertem oxidativen Stress. Zugleich fand sich eine Hochregulation mehrerer an der Endothelfunktion beteiligter Gene (z.B. der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase [eNOS]) nach niedrig-dosierter Proteasomhemmung, was mit einer Verbesserung der Endothelfunktion in isolierten Aortenringen korrelierte [38]. Aufbauend auf den Vorarbeiten unseres Labors, die vorwiegend die Wirkung einer Proteasomhemmung im kardiovaskulären System beschrieben [37-41], war das Ziel der vorliegenden Habilitationsarbeit, die molekularen Mechanismen, die den protektiven Effekten einer partiellen Proteasomhemmung zugrunde liegen, in verschiedenen kardiovaskulären Zelltypen im Detail zu untersuchen.



## 2. Ergebnisse

### 2.1. Partielle Proteasominhibition hemmt Wachstumssignalwege und unterdrückt die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie

Silke Meiners\*, **Henryk Dreger\***, Mandy Fechner, Sven Bieler, Wim Rother, Christoph Günther, Gert Baumann, Verena Stangl, Karl Stangl. Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *Hypertension*. 2008;51(2):302-8.

\*) geteilte Erstautorenschaft

Da das UPS wie oben dargelegt an der Regulation einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist und das Wachstum proliferierender Zellen unterdrückt [25], interessierte uns in diesem Projekt, inwieweit eine nicht-toxische Proteasomhemmung die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie beeinflusst. In der Tat konnte eine Behandlung mit Bortezomib im Tierversuch das Ausmaß der kardialen Hypertrophie in Dahl-Salz-sensitiven Ratten signifikant verringern. Interessanterweise unterdrückten *in vitro* bereits 50 nmol/l MG132 die Entstehung einer pharmakologisch induzierten Hypertrophie kardialer Myozyten – unabhängig vom gewählten Stimulus (getestet wurden Isoproterenol, Endothelin-1, Interleukin-1 $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$  und Trijodthyronin). Als zugrunde liegenden Mechanismus identifizierten wir eine Herunterregulation zentraler Signalwege (NF $\kappa$ B, Akt, Calcineurin und ERK1/2).

## **2.2. Kardioprotektion im oxidativen Stressmodell**

**Henryk Dreger**, Mario Lorenz, Alexandra Kehrer, Gert Baumann, Karl Stangl, Verena Stangl. Characteristics of catechin- and theaflavin-mediated cardioprotection. *Experimental Biology and Medicine*. 2008; 233(4):427-33.

Wie in der Einleitung beschrieben gaben unsere Vorarbeiten erste Hinweise für eine Proteasominhibitor-vermittelte Protektion vor oxidativem Stress in vaskulären Zellen. Da oxidativer Stress auch bei myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden eine wichtige Rolle spielt, interessierte uns die Frage, ob sich die in Endothelzellen beobachtete Protektion auch in Kardiomyozyten nachweisen lässt. Dazu etablierten wir zunächst ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-basiertes, oxidatives Stressmodell in neonatalen Kardiomyozyten. Da die Grundlagen der protektiven Eigenschaften von Teepolyphenolen einen zweiten Schwerpunkt unseres Labors bilden [42], verwendeten wir unser Stressmodell zunächst für Versuche mit den Polyphenolen Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und Theaflavin-3,3'-digallat (TF3). Dabei zeigte sich, dass Kardiomyozyten durch beide Teepolyphenole effektiv vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermitteltem, oxidativen Stress geschützt werden. Dieser Effekt ist unabhängig von der Aktivierung der Signalwege Akt, ERK1/2 und p38. Auch eine Neusynthese antioxidativer Enzyme spielt hierbei keine wesentliche Rolle. Vielmehr scheint der protektive, aber nur kurz anhaltende Effekt der Polyphenole auf ihren direkten antioxidativen, d.h. radikalfangenden Eigenschaften zu beruhen.

### 2.3. Partielle Proteasominhibition aktiviert den Nrf2-Signalweg und schützt Kardiomyozyten vor oxidativem Stress durch Induktion antioxidativer Enzyme

**Henryk Dreger**, Kera Westphal, Andrea Weller, Gert Baumann, Verena Stangl, Silke Meiners, Karl Stangl. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovascular Research*. 2009;83(2):354-61.

Nach Etablierung eines oxidativen Stressmodells in Kardiomyozyten (siehe 2.2.), untersuchten wir im Folgenden, ob analog zu unseren Beobachtungen in Endothelzellen [38] eine partielle Proteasomhemmung auch Kardiomyozyten durch Induktion antioxidativer Enzyme vor oxidativem Stress schützt und welche Mechanismen für diesen Effekt verantwortlich zeichnen.

In der Tat induzierte eine niedrig-dosierte Proteasomhemmung auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten die antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase 1 (SOD1), Katalase und Hämoxxygenase 1 (HO1), was mit einem verbesserten Zellüberleben nach Wasserstoffperoxid-induziertem oxidativen Stress assoziiert war. Als verantwortlichen Mechanismus identifizierten wir eine Proteasominhibitor-vermittelte Stabilisierung des unter physiologischen Bedingungen rasch vom UPS abgebauten, antioxidativen Transkriptionsfaktors Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2). Die auch nach niedrig-dosierter Proteasomhemmung bereits nachweisbare Akkumulation von Nrf2 war in Reporter-genversuchen verbunden mit einer deutlichen transkriptionellen Aktivierung der untersuchten antioxidativen Enzyme. In Versuchen mit Kardiomyozyten aus Nrf2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten sich nach partieller Proteasomhemmung weder eine Induktion antioxidativer Enzyme noch ein verbessertes Zellüberleben im oxidativen Stressmodell, was die essentielle Rolle von Nrf2 in der Proteasominhibitor-vermittelten Zytoprotektion vor oxidativem Stress bestätigte.

#### **2.4. Partielle Proteasominhibition schützt Nrf2-abhängig verschiedene kardiovaskuläre Zelltypen vor oxidativem Stress**

**Henryk Dreger\***, Kera Westphal\*, Nicola Wilck, Gert Baumann, Verena Stangl, Karl Stangl, Silke Meiners. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovascular Research*. 2010;85(2):395-403.

\*) geteilte Erstautorenschaft

In Ergänzung zu der unter 2.3. vorgestellten Arbeit untersuchten wir in weiteren kardiovaskulären Zelltypen die antioxidativ-protektiven Eigenschaften von Proteasominhibitoren sowie die zugrunde liegenden Mechanismen. Auch in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC), humanen arteriellen Endothelzellen sowie humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen ließ sich eine Induktion antioxidativer Enzyme nachweisen, die von einer Zytoprotektion vor Wasserstoffperoxid-induziertem oxidativen Stress begleitet war. Als zugrunde liegenden Mechanismus identifizierten wir mittels Reportergen-, „nuclear run-on-“ sowie Bandshift-Assays die transkriptionelle Aktivierung antioxidativer Enzyme durch Bindung des stabilisierten Transkriptionsfaktors Nrf2 an „antioxidant response elements“ (ARE) in deren Promoter. Die essentielle Rolle von Nrf2 konnte durch Experimente mit arteriellen Endothelzellen sowie glatten Gefäßmuskelzellen aus Nrf2<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt werden.

## 2.5. Partielle Proteasominhibition führt durch mRNA-Induktion und -Stabilisierung zu einer humanspezifischen Induktion der Glutathionperoxidase 3

Kera Westphal, Verena Stangl, Michael Fähling, **Henryk Dreger**, Andrea Weller, Gert Baumann, Karl Stangl, Silke Meiners. Human-specific induction of glutathione peroxidase-3 by proteasome inhibition in cardiovascular cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009 Dec 1;47(11):1652-60.

Interessanterweise zeigte sich im Rahmen unserer Versuche zu den in 2.3. und 2.4. vorgestellten Projekten, dass partielle Proteasominhibition die mRNA-Expression der Glutathionperoxidase 3 (GPx3) in humanen Endothelzellen um mehr als Faktor 100 erhöht – und damit deutlich stärker als in Endothelzellen aus anderen Spezies. In einem Folgeprojekt konnten wir diese Beobachtung zunächst für andere Zelltypen bestätigen: in humanen venösen und arteriellen Endothelzellen sowie in glatten Gefäßmuskelzellen induzierte partielle Proteasomhemmung die GPx3-mRNA-Expression um Faktor 20 bis 110. In kardiovaskulären Zellen aus dem Rind und aus Ratten fand sich dagegen keine relevante GPx3-Induktion. Als Mechanismus für diese ausgeprägte mRNA-Induktion in humanen Zellen identifizierten wir eine Kombination aus transkriptioneller Aktivierung und mRNA-Stabilisierung nach Proteasomhemmung. Versuche mit dem RNA-Polymerase II-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin sowie „nuclear run on-assays“ zeigten zunächst, dass die bereits kurz nach Inhibition einsetzende, deutliche Zunahme der GPx3-mRNA überwiegend unabhängig von einer *de novo*-mRNA-Synthese erfolgt. Wir analysierten daher die 3' „untranslated region“ (UTR) der GPx3-mRNA mittels „UV-crosslinking assays“ und identifizierten die Bindung mehrerer 32-47 kDa großer *trans*-Faktoren als mögliche Ursache der Proteasominhibitor-induzierten GPx3-mRNA-Stabilisierung. Luciferase-Reporter-Gen-Versuche mit dem Wildtyp-GPx3-Promoter wiederum bestätigten eine zusätzliche transkriptionelle Aktivierung des Promoters nach Proteasominhibition. Experimente mit trunkierten bzw. modifizierten GPx3-Promotern identifizierten ein vorbeschriebenes, potentiell „antioxidant response element“ (ARE) als essentiell für die Vermittlung der transkriptionellen Aktivierung des Promoters nach Proteasomhemmung. Eine Bindung von *trans*-Faktoren an die potentiellen ARE der Promoter der GPx3 und der HO1 konnte mit Bandshift-Assays nach Proteasomhemmung bestätigt werden. Interessanterweise bestätig-

ten Supershift-Assays jedoch nur eine Bindung von Nrf2 an das ARE aus dem HO1-Promoter. Das als ARE beschriebene *cis*-Element im GPx3-Promoter, das tatsächlich nur eine geringe Übereinstimmung mit der ARE-Konsensus-Sequenz aufweist, ist nach unseren Ergebnissen Bindungsstelle eines anderen, bis dato nicht identifizierten *trans*-Faktors.

Zusammenfassend bestätigten unsere Versuche die Rolle von Nrf2 in der Proteasominhibitor-vermittelten Induktion von antioxidativen Enzymen mit einem „klassischen“ ARE im Promoter wie HO1. Die humanspezifische Induktion von GPx3 nach Proteasominhibition hingegen beruht auf einer Nrf2-unabhängigen transkriptionellen Aktivierung sowie auf einer mRNA-Stabilisierung.

## 2.6. Langzeiteffekte von Proteasominhibitoren: die Histonmethyltransferase Ezh2 als möglicher Link zum Epigenom

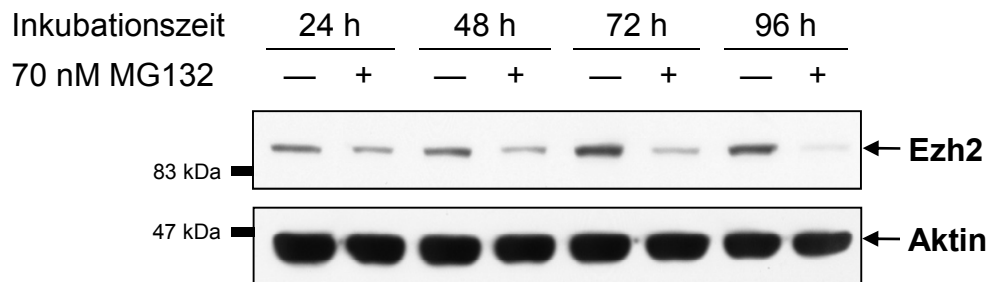
**Henryk Dreger**, Antje Ludwig, Andrea Weller, Verena Stangl, Gert Baumann, Silke Meiners, Karl Stangl. Epigenetic regulation of cell adhesion and communication by enhancer of zeste homolog 2 in human endothelial cells. *Hypertension*. 2012;60:1176-1183.

Einige der von uns beobachteten Effekte nach Proteasomhemmung persistierten deutlich länger, als die Halbwertszeit der eingesetzten Proteasominhibitoren erwarten ließ. So konnten wir in bovinen pulmonalarteriellen Endothelzellen noch zehn Tage nach einer einmaligen Behandlung mit MG132 eine erhöhte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) messen [43]. Eine mögliche Erklärung für derartige Langzeiteffekte sind epigenetische Modifikationen, z.B. DNA- oder Histon-Methylierungen, da diese die Expression betroffener Gene langfristig modulieren. Um dieser Hypothese nachzugehen, analysierten wir erneut retrospektiv unsere im Rahmen verschiedener Projekte erhobenen Genexpressions-Daten mit einem speziellen Fokus auf Regulatoren des Epigenoms. Dabei identifizierten wir eine relevante Zahl von Proteinen, die in der epigenetischen Regulation der Genexpression eine Rolle spielen und nach Inhibition des UPS differentiell exprimiert werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Expressionsänderung ausgewählter Gene der Epigenomregulation nach 24-stündiger Behandlung mit äquipotenten Dosen der Proteasominhibitoren MG132 (70 nmol/l) und MG262 (4 nmol/l) in HUVEC.

Gen	MG132	MG262
enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)	-5,9	-6,9
H4 histone family, member G (H4FG)	-3,3	-4,3
H2A histone family, member Z (H2AFZ)	-3,6	-3,6
H2A histone family, member X (H2AFX)	-2,4	-2,6
histone acetyltransferase 1 (HAT1)	-3,0	-3,3
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta (DNMT3B)	-2,4	-2,5
suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (SUV39H1)	-1,9	-1,5
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 (DNMT1)	-2,2	-2,4
H1 histone family, member X (H1FX)	-1,5	-2,1

Insbesondere die Histonmethyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) zeigte sich in allen Arrays nach Hemmung des UPS stabil herunterreguliert, was sich in weiteren Versuchen in HUVEC auch auf Proteinebene bestätigen ließ (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Protein-Expression der Histonmethyltransferase Ezh2 nach niedrig-dosierter Proteasomhemmung in HUVEC.

Ezh2 gehört zu den so genannten Polycomb group (PcG)-Proteinen und ist als katalytische Untereinheit des Polycomb repressive complex 2 (PRC2) verantwortlich für die Trimethylierung von Lysin 27 im Histon 3 (H3K27me3) [44]. Letztere bewirkt als so genannte repressive Histonmodifikation eine langfristige Verminderung der Expression von Genen, die diese Modifikation in Promoter-nahen Histonen aufweisen [45]. Gezielt untersucht wurde PRC2 in den letzten Jahren vorwiegend in Stammzellen, wo es für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz essentiell ist [44,46]. Im Rahmen der Zelldifferenzierung kommt es zu einer verminderten Aktivität des PRC2 und konsekutiv zu einer Aktivierung der Ezh2-Zielgene [46,47]. Insbesondere in der Kardiogenese, der Neurogenese, der Skelettmuskeldifferenzierung, der Adipogenese sowie bei der Differenzierung von epidermalen Progenitorzellen konnte eine Beteiligung von Ezh2 nachgewiesen werden [47-50]. Darüber hinaus ist eine hohe Expression von Ezh2 in Tumorzellen assoziiert mit einer schlechten Prognose [51]. Als eine Ursache dieser Beobachtung konnte kürzlich eine Ezh2-vermittelte Suppression von Vasoinhibin-1 und eine konsekutive Steigerung der Tumor-Angiogenese identifiziert werden [52].

Auf Basis unserer Vorversuche formulierten wir nun die Hypothese, dass eine (Re-)Expression der Zielgene von Ezh2 durch eine Herunterregulation der Histonmethyltransferase mögliche Langzeiteffekte einer einmaligen Proteasominhibition



erklären könnte. Da bis dato Informationen zur Funktion von Ezh2 in differenzierten Endothelzellen völlig fehlten, war erstes Ziel unseres neuen Versuchsprogramms die Identifikation der Zielgene von Ezh2 in Endothelzellen. Dazu kombinierten wir ChIP-on-chip- (d.h. Chromatin-Immunopräzipitation mit einem H3K27me3-spezifischen Antikörper gefolgt von einem „whole genome“-Promoter-Array) mit mRNA-Expressions-Arrays nach siRNA-vermitteltem knock down von Ezh2 und identifizierten 276 Ezh2-Zielgene in HUVEC. Eine bioinformatische Analyse der Ezh2-regulierten Gene erbrachte eine signifikante Häufung von Genen, die an Zellkommunikations- und -adhäsionsprozessen beteiligt sind. Eine funktionelle Relevanz dieser Beobachtung bestätigten Adhäsions-, Wundheilungs- und „tube formation“-Assays, die eine Beteiligung von Ezh2 an der Regulation von Angiogenese-Prozessen nahelegen.

### 3. Diskussion

#### 3.1. Zelltyp- und dosisabhängige Effekte von Proteasominhibitoren

Wie in der Einleitung umrissen, diente der Einsatz von Proteasominhibitoren zunächst der Aufklärung der Funktion des UPS in verschiedenen Zellarten, wobei durch den Einsatz hoher Dosen eine möglichst potente Hemmung des Proteasoms angestrebt wurde. Rasch zeigte sich dabei – durch die Induktion von Apoptose – ein therapeutisches Potential der Proteasominhibitoren für proliferative Erkrankungen. Als zugrunde liegende Mechanismen für die Auslösung des programmierten Zelltods wurden die Stabilisierung von p53 und bax, eine reduzierte Expression von Bcl-2 sowie eine Hochregulation und Aktivierung verschiedener Caspasen und der c-jun terminalen Kinase (JNK) identifiziert [53-56].

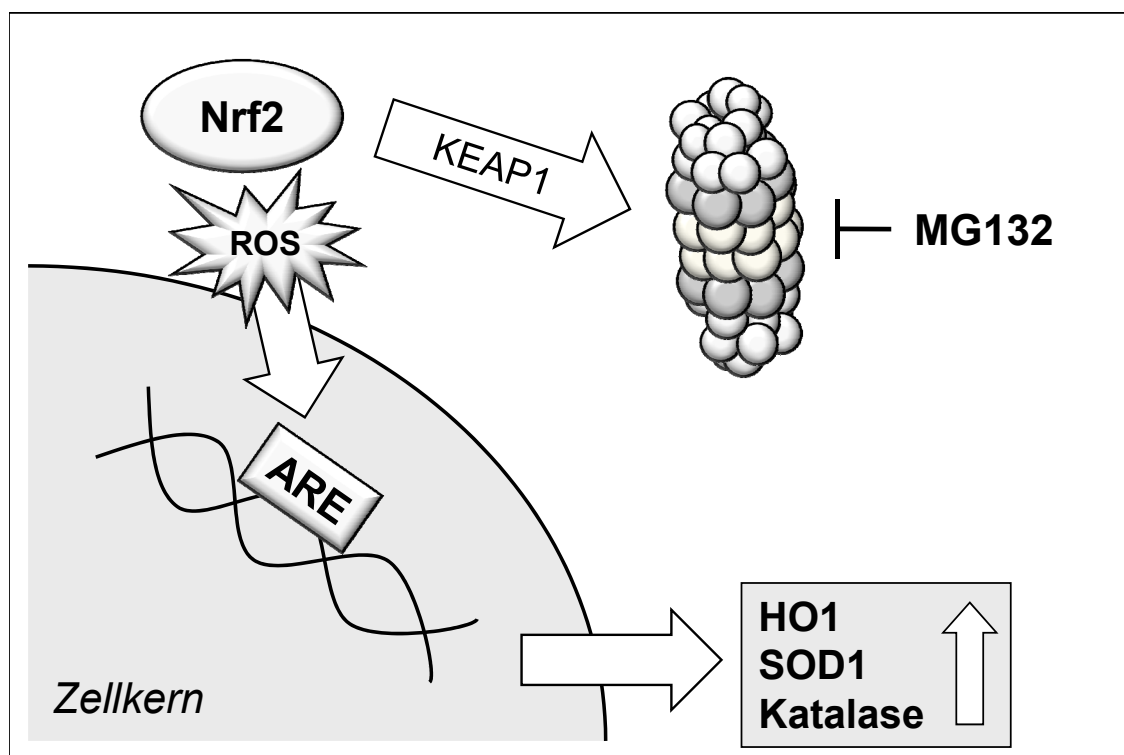
Ende der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts begannen erste Arbeitsgruppen, die differentiellen Effekte von niedrig- versus hochdosierter Proteasomhemmung zu untersuchen [57]. Dabei zeigte sich – im Gegensatz zu den proapoptotischen Effekten einer potenten Inhibition – ein Schutz vor Apoptose nach niedrig-dosierter Proteasomhemmung [56]. Doch dosisabhängige Unterschiede konnten nicht nur hinsichtlich der Apoptose gezeigt werden. So wird die Stickstoffmonoxid-Produktion nach LPS-Stimulation in primären Astrozyten durch niedrig-dosierte Proteasomhemmung induziert und durch eine potente Inhibition gehemmt [58]. Jenseits der dosisabhängigen Effekte fanden sich zudem zelltyp- und zellzyklusabhängige Unterschiede: während eine 25%ige Hemmung der „chymotrypsin-like“-Aktivität in Tumorzellen einen programmierten Zelltod induziert, wird selbst eine 70-80%ige Hemmung von Zellen verschiedener Gewebe wie Myokard, Blut, Leber und Milz gut toleriert [59,60]. Ferner zeigte sich, dass äquivalente Dosen in proliferierenden, aber nicht in ruhenden, postmitotischen Zellen eine Apoptose auslösen [56,61]. Diese Beobachtungen unterstrichen das therapeutische Potential der Proteasominhibitoren und führten letztlich zur Zulassung von Bortezomib bei Patienten mit Multiplem Myelom [34]. Neben den antiproliferativen Effekten wurde früh die antiinflammatorische Wirkung der Proteasominhibitoren erkannt. Inzwischen konnten zahlreiche Arbeitsgruppen einen möglichen therapeutischen Nutzen einer Proteasomhemmung in Modellen von akuten und chronischen Entzündungsprozessen, z.B. Pankreatitis [62] und Polyarthritits [63], aber

auch bei der Transplantatabstoßung [64,65] und dem Ischämie-Reperfusionsschaden [66-71] demonstrieren.

Auf Basis der Beobachtungen, dass Proteasominhibitoren in proliferierenden Zellen einen Zellteilungsstopp auslösen, formulierten wir als Ausgangspunkt des in 2.1. vorgestellten Projekts die Hypothese, dass auch in irreversibel postmitotischen Zellen wie Kardiomyozyten Proteasominhibitoren Wachstumssignalwege hemmen und so zu einer Verminderung des Zellwachstums führen könnten. In der Tat konnten wir *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass Proteasominhibitoren die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie unterdrücken. Als Ursache identifizierten wir die Hemmung mehrerer zentraler Signalwege, wie z.B. NF $\kappa$ B, Akt, ERK 1/2 und Calcineurin [72]. Ähnliche Ergebnisse konnten inzwischen von anderen Arbeitsgruppen publiziert werden [59,73,74].

Ausgangspunkt gleich mehrerer Projekte der vergangenen Jahre war die bereits in der Einleitung vorgestellte Arbeit unseres Labors, in der wir erstmals die Induktion eines antioxidativen Genprogramms mit Hochregulation mehrerer antioxidativer Enzyme in Endothelzellen zeigen konnten [38]. Diese Beobachtungen waren assoziiert mit einem verbesserten Zellüberleben nach oxidativem Stress und gaben Anstoß für eine Reihe weiterer Arbeiten, in denen wir den Mechanismus, über den Proteasominhibitoren zur Induktion antioxidativer Enzyme beitragen, in kardiovaskulären Zellen aufklärten. Dazu bestätigten wir die beobachtete Zytoprotektion vor oxidativem Stress zunächst in mehreren kardiovaskulären Zelltypen. Die zuvor beobachtete Induktion der antioxidativen Enzyme HO1, SOD1 und Katalase war dabei sowohl in Kardiomyozyten als auch in Endothel- und glatten Gefäßmuskeln nachweisbar und verbunden mit einem verbesserten Abbau der experimentell induzierten freien Radikale im oxidativen Stressmodell [75,76]. Die Induktion der zelleigenen, antioxidativen Abwehrmechanismen durch Proteasominhibitoren steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die wir in Versuchen mit Teepolyphenolen im gleichen oxidativen Stressmodell beobachten konnten. Auch Behandlung mit EGCG und TF3 schützte Kardiomyozyten vor oxidativem Stress – allerdings ausschließlich durch die direkten, radikalfangenden Eigenschaften der Polyphenole [42] und nicht durch Induktion antioxidativer Enzyme oder Aktivierung protektiver Signalkaskaden. Dementsprechend zeigte sich der verliehene Schutz nur kurz anhaltend – entsprechend der Halbwertszeit der Polyphenole im Kulturmedium [77].

Als zugrunde liegenden Mechanismus für die Proteasominhibitor-vermittelte Induktion antioxidativer Enzyme identifizierten wir den Nrf2-Signalweg, der eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress spielt. Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 im Zytosol gebunden durch das Inhibitorprotein Kelch like-ECH-associated protein 1 (KEAP1), was in einer raschen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation des Transkriptionsfaktors Nrf2 resultiert [78]. Supraphysiologische Konzentrationen freier Radikale dagegen bewirken eine Dissoziation von Nrf2 und KEAP1 sowie eine konsekutive Induktion antioxidativer Enzyme (Abbildung 4) [79].



**Abbildung 4:** Der Nrf2/KEAP1-Signalweg. Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 (vermittelt durch KEAP1) vom UPS abgebaut. Hohe Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen zu einer Stabilisierung von Nrf2 sowie zu einer Induktion antioxidativer Enzyme durch Bindung von Nrf2 an „antioxidant response elements“ (ARE). Einen vergleichbaren Effekt hat die Stabilisierung von Nrf2 durch partielle Proteasominhibition.

Da die Wirkung von Nrf2 unter physiologischen Bedingungen somit durch einen proteasomalen Abbau limitiert wird, ist dieser Signalweg in besonderem Maße von einem intakten UPS abhängig. Dementsprechend konnten wir zeigen, dass bereits eine partielle, nicht-toxische Hemmung des UPS zu einer Stabilisierung von Nrf2

und so zur Aktivierung des Signalwegs führt. Dass dies tatsächlich der entscheidende Mechanismus ist, bestätigten Experimente mit Zellen aus Nrf2<sup>-/-</sup>-Mäusen, in denen Proteasominhibitoren weder eine Induktion antioxidativer Enzyme noch eine Zytoprotektion vor oxidativem Stress bewirkten. Einen vergleichbaren Schutz vor oxidativem Stress konnte inzwischen durch verschiedene Arbeitsgruppen in neuronalen Zellen gezeigt werden [80-83].

Im Gegensatz zu den antioxidativen Enzymen SOD1, HO1 und Katalase zeigte sich die Induktion der Glutathionperoxidase 3 nur in humanen Zellen. Die rasch einsetzende und stark ausgeprägte GPx3-mRNA-Induktion nach Proteasomhemmung ist zudem unabhängig von Nrf2 und beruht auf einer Kombination aus transkriptioneller Aktivierung und mRNA-Stabilisierung [84].

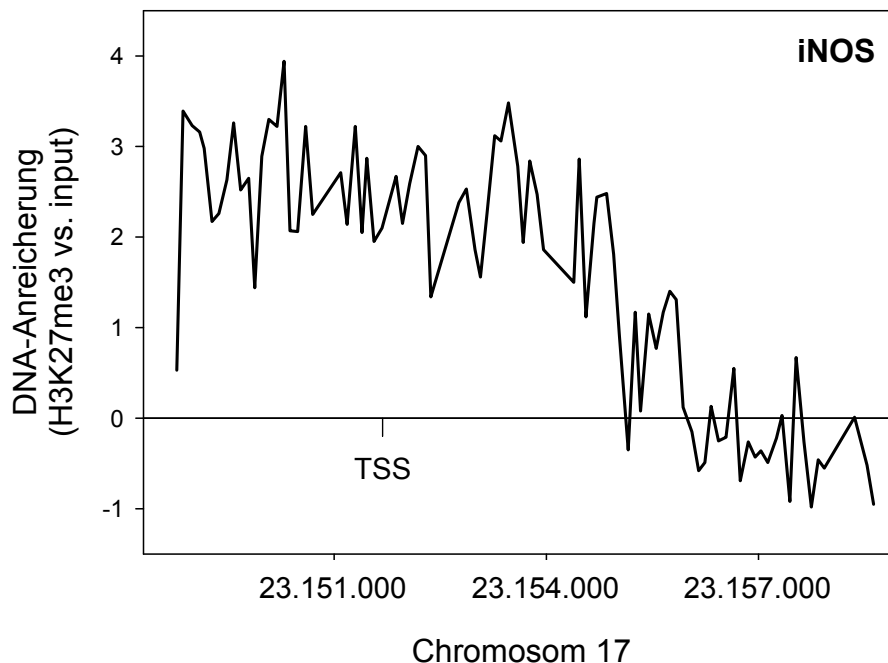
Dass der durch Proteasominhibition vermittelte Schutz vor oxidativem Stress auch *in vivo* ein therapeutisches Potential besitzt, konnten wir inzwischen mit einer weiteren Arbeit demonstrieren. Oxidativer Stress spielt auch im Rahmen der Atherogenese eine zentrale Rolle [85]. In einem Tiermodell mit „low density“-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR)-defizienten Mäusen untersuchten wir daher die Hypothese, dass eine partielle Proteasominhibition durch die Induktion antioxidativer Enzyme die Atherogenese günstig beeinflussen kann. In der Tat fand sich in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit einer niedrigen Dosis des Proteasominhibitors Bortezomib behandelt worden, eine geringere aortale Plaquelast als bei den Kontrolltieren. Neben antiinflammatorischen Effekten wie einer Reduktion von Interleukin 6 und einer verminderten Makrophageninfiltration konnten wir reduzierte Spiegel von Superoxidationen und oxidierten Lipiden im Serum sowie von oxidierten Proteinen in Aortenschnitten nachweisen. Microarrays zeigten zudem, dass die Änderungen der Genexpression in der Aorta, die durch die Atherosklerose-induzierende „western type“-Diät in den Versuchstieren ausgelöst werden, durch Behandlung mit dem Proteasominhibitor abgemildert wurden. Unsere Daten legen somit den Schluss nahe, dass eine niedrig-dosierte Proteasomhemmung tatsächlich antiatherogene Effekte zeigt [86].

### 3.2. Langzeiteffekte von Proteasominhibitoren – ein Link zum Epigenom?

Wie unter 2.6. bereits dargestellt, beobachtete unsere Arbeitsgruppe unter anderem in Endothelzellen nach einer Einmalgabe des reversiblen Proteasominhibitors MG132 über Tage anhaltende Effekte wie beispielsweise eine erhöhte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [43]. Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtung ist die Beeinflussung epigenetischer Modifikationen durch Hemmung des Proteasoms. Diese Hypothese wurde gestützt durch unsere Array-Daten, in denen sich nach Proteasominhibition eine signifikante Expressionsänderung mehrerer an epigenetischen Regulationsprozessen beteiligter Gene fand (Tabelle 1). Ein besonders interessanter Kandidat – die Histonmethyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) – zeigte reproduzierbar eine reduzierte Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abbildung 3) nach partieller Inhibition des Proteasoms in humanen Endothelzellen. Unser nächstes Projekt zielte daher darauf zu klären, ob die langfristig nach einmaliger Behandlung mit Proteasominhibitoren regulierten Gene zu den Zielgenen von Ezh2 gehören. Da zur Funktion von Ezh2 in differenzierten Endothelzellen bis dato keine Informationen vorlagen, identifizierten wir zunächst die Ezh2-Zielgene in HUVEC durch eine Kombination von mRNA-Expressions-Arrays nach Ezh2-knock down und ChIP-on-chip-Versuchen [87]. Etwa ein Viertel der durch diesen Ansatz identifizierten Ezh2-Zielgene wird auch nach Proteasominhibition differentiell exprimiert. Inwieweit Ezh2 an den Mechanismen, die der langfristigen Regulation von Genen nach Proteasominhibition zugrunde liegen, beteiligt ist, ist derzeit Gegenstand unseres Forschungsinteresses.

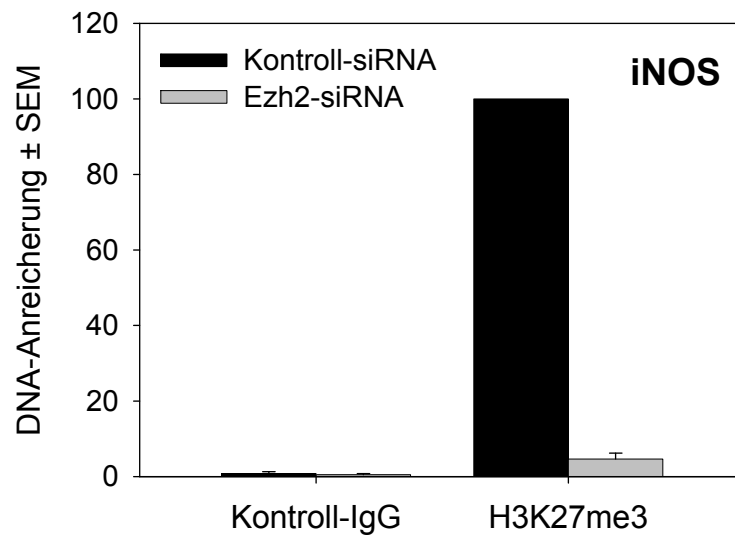
Doch auch über einen möglichen Link zwischen Proteasomhemmung und dem Epigenom hinaus weckten die von uns erstmals identifizierten Zielgene von Ezh2 unser Interesse. So suggerierte eine bioinformatische Analyse der Zielgene eine Rolle von Ezh2 in der Regulation von Angiogeneseprozessen, was wir inzwischen mit funktionellen Angiogenese-Tests bestätigen konnten [87]. Damit konnten wir erstmals eine regulatorische Rolle von Ezh2 in differenzierten Endothelzellen zeigen. Neben diesem funktionellen Aspekt sind unsere Daten von weiterem Interesse, da sie helfen, bisher unerklärte Phänomene zu verstehen. So wird die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die wir als Ezh2-Zielgen identifizieren konnten, in arteriosklerotischen Plaques in glatten Gefäßmuskelzellen sowie in Makrophagen exprimiert [88,89] während sie in humanen Endothelzellen, die den

gleichen parakrinen Faktoren ausgesetzt sind, nahezu nicht induzierbar ist [90]. Um eine mögliche Regulation von iNOS durch Ezh2 weiter zu bestätigen, führten wir inzwischen ChIP-PCR-Versuche mit DNA-Primern, die im Bereich der mit H3K27me3 assoziierten Genloci liegen (Abbildung 5), durch. Dabei fand sich im Vergleich zum unspezifischen Kontroll-Antikörper eine deutliche iNOS-DNA-Anreicherung durch den H3K27me3-spezifischen Antikörper. Dass diese Assoziation des iNOS-Promoters mit H3K27me3 tatsächlich durch Ezh2 vermittelt wird, bestätigten Versuche nach knock down von Ezh2, in denen die DNA-Anreicherung erheblich vermindert war (Abbildung 6).

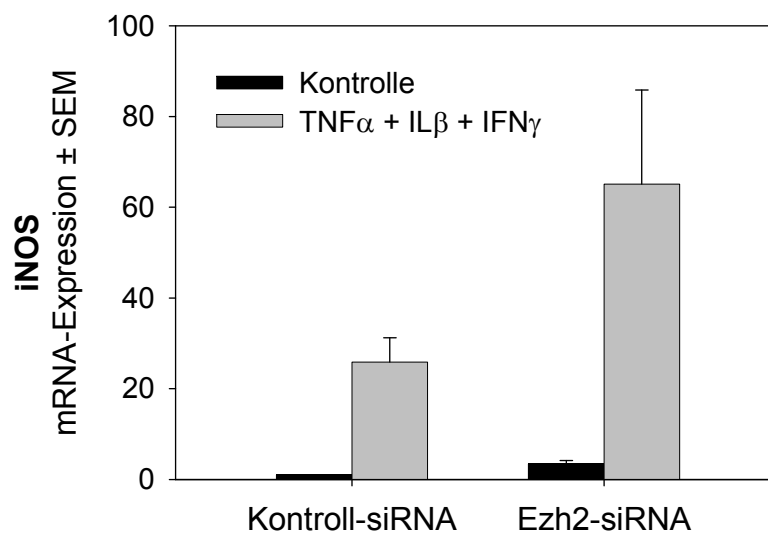


**Abbildung 5:** iNOS-DNA-Anreicherung in ChIP-on-chip-Versuchen mit einem H3K27me3-spezifischen Antikörper als Hinweis auf eine Assoziation des iNOS-Promoters mit der durch Ezh2-vermittelten epigenetischen Modifikation H3K27me3.

Eine funktionelle Relevanz der Ezh2-vermittelten epigenetischen Modifikation im iNOS-Promoter erbrachte die mRNA-Expressionsanalyse von iNOS nach Zytokin-Stimulation und knock down von Ezh2: während die iNOS-Expression nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA nur um etwa Faktor 25 anstieg, resultierte der knock down von Ezh2 in einer iNOS-Induktion um Faktor 65 nach Zytokin-Behandlung (Abbildung 7). Ein Manuskript zu diesen Ergebnissen ist derzeit in Vorbereitung.



**Abbildung 6:** ChIP-PCR-Versuche erbrachten eine deutliche iNOS-DNA-Anreicherung durch den H3K27me3-spezifischen Antikörper im Vergleich zum unspezifischen Kontroll-Antikörper als Nachweis einer Assoziation des iNOS-Promoters mit H3K27me3. Ein Verlust der DNA-Anreicherung nach knock down von Ezh2 bestätigte, dass die epigenetische Modifikation im iNOS-Promoter tatsächlich durch Ezh2 vermittelt wird.



**Abbildung 7:** iNOS-mRNA-Expression nach Transfektion mit Kontroll- bzw. Ezh2-siRNA sowie Behandlung mit Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin  $\beta$  (IL $\beta$ ) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).



Unsere Daten belegen erstmals, dass die bis dato nur in Stamm- und Tumorzellen untersuchte Histonmethyltransferase Ezh2 an der Regulation von Angiogeneseprozessen in Endothelzellen beteiligt ist. Da die Dysregulation der NO-Produktion eine Rolle in der endothelialen Dysfunktion spielt, haben unsere Ergebnisse zur iNOS-Regulation durch Ezh2 auch klinische Relevanz. So ist eine langfristige epigenetische Modulation der Induzierbarkeit von iNOS durch Umwelteinflüsse denkbar und derzeit Gegenstand weiterer Forschungsvorhaben. Gestützt werden diese Überlegungen durch Studien zum Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom, bei dem eine epigenetische Dysregulation mit Verlust von H3K27me3 zur Ausbildung einer akzelerierten Atherosklerose beiträgt [91,92]. Darüber hinaus belegen Zwillingsstudien, dass mit zunehmender epigenetischer Diskordanz sich auch Genexpression und Anamnese bei eineiigen Zwillingen verstärkt unterscheiden [93]. Zusammenfassend bildet die in 2.6. vorgestellte Arbeit zum einen die Basis für weitere Untersuchungen zur Verbindung des UPS mit dem Epigenom. Zum anderen ist sie Ausgangspunkt für Folgeprojekte zur epigenetischen Regulation der Endothelfunktion durch die Histonmethyltransferase Ezh2.

### **3.3. Fazit und Ausblick**

Zusammenfassend erweiterten unsere Arbeiten der vergangenen Jahre das Verständnis der zelltyp- und dosisabhängigen Effekte von Proteasominhibitoren im kardiovaskulären System. Während bis dato die zytoprotektiven Effekte der Proteasominhibitoren meist auf eine Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalwegs und auf eine Stabilisierung von Hitzeschockproteinen zurückgeführt wurden, konnten wir mit dem Nrf2/KEAP1-Signalweg einen neuen, zentralen Mechanismus für Proteasominhibitor-vermittelte zytoprotektive Effekte aufzeigen. In der Zusammenschau legen unsere Daten ein therapeutisches Potential der Proteasominhibitoren auch bei kardiovaskulären Erkrankungen nahe. Entsprechend ihrer dosis-, spezie- und zelltypabhängigen Effekte finden sich in der Literatur – bei anderen Tiermodellen und unter Einsatz anderer Inhibitoren – jedoch auch Hinweise für mögliche proatherogene Effekte von Proteasominhibitoren [94,95]. Zudem sprechen Beobachtungen zu kardiotoxischen Nebenwirkungen von Bortezomib bei Patienten mit multiplem Myelom für eine geringe therapeutische Breite der Proteasominhibitoren [96,97]. Die weitere Entwicklung der Proteasominhibitoren vom reinen „research tool“ hin zu potentiell therapeutisch einsetzbaren Substanzen bedarf also

noch weiterer Forschung und setzt letztlich die Entwicklung zell- und aktivitätsspezifischer Inhibitoren voraus [98]. Hoffnung machen dabei neue, aktivitätsspezifische Inhibitoren wie das Epoxyketon ONX-0912, das praktisch ausschließlich die „chymotrypsin-like“-Aktivität des Proteasoms hemmt und somit nur eine partielle Proteasominhibition bewirkt [99,100].

### 4. Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist als zentraler Proteinabbaumechanismus eukaryontischer Zellen verantwortlich für die Degradation defekter und nicht mehr benötigter Proteine. Zugleich ist es durch den regulierten Abbau von Mediatorproteinen an der Regulation zahlreicher Signalwege beteiligt. Entsprechend seiner essentiellen Bedeutung induziert eine potente Hemmung des UPS regelhaft eine Apoptose. Demgegenüber konnten wir in mehreren Arbeiten zeigen, dass eine partielle Hemmung des Proteasoms kardiovaskuläre Zellen vor oxidativem Stress schützt. Als zugrunde liegenden Mechanismus identifizierten wir eine Nrf2-vermittelte Induktion antioxidativer Enzyme in Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen sowie Endothelzellen. Diese nachhaltige Aktivierung der zelleigenen, antioxidativen Abwehrmechanismen steht im Kontrast zur Wirkung der von uns in einem parallelen Projekt untersuchten Polyphenole EGCG und TF3, die in unserem Stressmodell Kardiomyozyten durch ihre direkte antioxidative, d.h. radikalfangende Wirkung vor oxidativem Stress schützten. Das therapeutische Potential einer partiellen Proteasomhemmung unterstrichen Versuche in LDL-Rezeptordefizienten Mäusen, in denen eine Behandlung mit Proteasominhibitoren die Akkumulation oxidierter Lipide und Proteine im Serum und in der Aorta reduzierte, was mit einer verringerten Atherogenese assoziiert war. In einem weiteren Projekt konnten wir zeigen, dass die aus sich teilenden Zellen bekannte antiproliferative Wirkung von Proteasominhibitoren durch Hemmung zentraler Wachstumssignalwege auch in postmitotischen Zellen positive Effekte haben kann: sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte eine niedrig-dosierte Proteasomhemmung zur Verminderung einer kardialen Hypertrophie. Schwerpunkt unserer jüngsten Projekte ist die Aufklärung einer möglichen Verbindung zwischen dem UPS und epigenetischen Regulationsmechanismen. In diesem Zusammenhang konnten wir erstmals zeigen, dass partielle Proteasominhibition in einer verminderten Expression der Histonmethyltransferase Ezh2 resultiert. Da zur physiologischen Rolle von Ezh2 in differenzierten Zellen bis dato keine Informationen vorlagen, identifizierten wir kürzlich die Zielgene von Ezh2 in Endothelzellen und konnten zeigen, dass Ezh2 an der epigenetischen Regulation von Angiogenese-Prozessen beteiligt ist. Zusammenfassend suggerieren unsere Ergebnisse ein therapeutisches Potential für Proteasominhibitoren bei kardiovaskulären Erkrankungen, das derzeit jedoch

limitiert wird durch das Fehlen zelltypspezifischer Inhibitoren. Zugleich sind unsere Daten ein erster Hinweis auf eine mögliche Verbindung zwischen dem UPS und epigenetischen Regulationsmechanismen.

**5. Literaturverzeichnis**

1. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78:761-771.
2. Tanaka K: Molecular biology of proteasomes. *Mol Biol Rep*. 1995;21:21-26.
3. Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G: Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett*. 1988;241:239-245.
4. Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB: Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol*. 1993;229:14-19.
5. Zwickl P, Grziwa A, Puhler G, Dahlmann B, Lottspeich F, Baumeister W: Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry*. 1992;31:964-972.
6. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997;386:463-471.
7. Kisselev AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*. 2001;8:739-758.
8. Orłowski M: The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*. 1990;29:10289-10297.
9. Rivett AJ: The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol Chem*. 1989;264:12215-12219.

10. Pickart CM, Cohen RE: Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:177-187.
11. Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP: Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature.* 2000;408:115-120.
12. Glickman MH, Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82:373-428.
13. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S: A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 1999;96:635-644.
14. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M: The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol.* 1999;1:221-226.
15. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D: A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol.* 2000;7:1062-1067.
16. Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D: The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell.* 2001;7:1143-1152.
17. Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL: ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell.* 2005;20:687-698.

18. Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL: Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell*. 2007;27:731-744.
19. Strickland E, Hakala K, Thomas PJ, DeMartino GN: Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 2000;275:5565-5572.
20. Forster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP: The 1.9 A structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell*. 2005;18:589-599.
21. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL: Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. 2000;22:442-451.
22. Bowerman B, Kurz T: Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis. *Development*. 2006;133:773-784.
23. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke WH: Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med (Berl)*. 2003;81:235-245.
24. Jesenberger V, Jentsch S: Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:112-121.
25. Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest*. 2002;82:965-980.
26. Fuchs SY: The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling. *Cancer Biol Ther*. 2002;1:337-341.
27. Muratani M, Tansey WP: How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:192-201.
28. Wang T: The 26S proteasome system in the signaling pathways of TGF-beta superfamily. *Front Biosci*. 2003;8:d1109-d1127.

29. Wojcikiewicz RJ: Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:35-41.
30. Goldberg AL: Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003;426:895-899.
31. Kloetzel PM, Ossendorp F: Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:76-81.
32. Kriegenburg F, Poulsen EG, Koch A, Kruger E, Hartmann-Petersen R: Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:2265-2299.
33. Adams J, Kauffman M: Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* 2004;22:304-311.
34. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R: Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist.* 2003;8:508-513.
35. Fan CM, Maniatis T: Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature.* 1991;354:395-398.
36. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 1994;78:773-785.
37. Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K: Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation.* 2002;105:483-489.
38. Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K: Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:2232-2241.



39. Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, Kruger E: Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem.* 2003;278:21517-21525.
40. Meiners S, Hocher B, Weller A, Laule M, Stangl V, Guenther C, Godes M, Mrozikiewicz A, Baumann G, Stangl K: Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension.* 2004;44:471-477.
41. Meiners S: Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome System as Potential Therapeutic Agents for Cardiovascular Diseases. *Habilitationsschrift.* Charité - Universitätsmedizin Berlin. 2008.
42. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M: Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2007;73:348-358.
43. Stangl V, Lorenz M, Meiners S, Ludwig A, Bartsch C, Moobed M, Vietzke A, Kinkel HT, Baumann G, Stangl K: Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 2004;18:272-279.
44. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G: Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell.* 2007;128:735-745.
45. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y: Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002;298:1039-1043.
46. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K et al.: Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 2006;125:301-313.

47. Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, Stokes N, Su IH, Hannon G, Tarakhovsky A, Fuchs E: Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell*. 2009;136:1122-1135.
48. He A, Ma Q, Cao J, von GA, Zhou P, Xie H, Zhang B, Hsing M, Christodoulou D, Cahan P et al.: Polycomb Repressive Complex 2 Regulates Normal Development of the Mouse Heart. *Circ Res*. 2012;110:406-415.
49. Caretti G, Di PM, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V: The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*. 2004;18:2627-2638.
50. Wang L, Jin Q, Lee JE, Su IH, Ge K: Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:7317-7322.
51. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP et al.: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002;419:624-629.
52. Lu C, Han HD, Mangala LS, li-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, rmaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A et al.: Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell*. 2010;18:185-197.
53. Drexler HC: Programmed cell death and the proteasome. *Apoptosis*. 1998;3:1-7.
54. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N et al.: Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*. 2003;101:1530-1534.

55. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP et al.: Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14374-14379.
56. Wojcik C: Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol Life Sci*. 1999;56:908-917.
57. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY: Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:6373-6379.
58. Stasiulek M, Gavriljuk V, Sharp A, Horvath P, Selmaj K, Feinstein DL: Inhibitory and stimulatory effects of lactacystin on expression of nitric oxide synthase type 2 in brain glial cells. The role of Ikappa B-beta. *J Biol Chem*. 2000;275:24847-24856.
59. Hedhli N, Lizano P, Hong C, Fritzky LF, Dhar SK, Liu H, Tian Y, Gao S, Madura K, Vatner SF et al.: Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1385-H1393.
60. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neubergh D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J et al.: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res*. 2002;62:4996-5000.
61. Drexler HC: Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:855-860.
62. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Rakonczay Z, Jr., Jarmay K, Szalontai T, Varga I, Kaszaki J, Boros I et al.: The proteasome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:1142-1151.

63. Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, Wolf RE, Huang J, Brand S, Elliott PJ et al.: Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15671-15676.
64. Wu Y, Han B, Luo H, Shi G, Wu J: Dipeptide boronic acid, a novel proteasome inhibitor, prevents islet-allograft rejection. *Transplantation*. 2004;78:360-366.
65. Luo H, Wu Y, Qi S, Wan X, Chen H, Wu J: A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection. *Transplantation*. 2001;72:196-202.
66. Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC: Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1686-1693.
67. Williams AJ, Dave JR, Tortella FC: Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochem Int*. 2006;49:106-112.
68. Zhang L, Zhang ZG, Liu X, Hozeska A, Stagliano N, Riordan W, Lu M, Chopp M: Treatment of embolic stroke in rats with bortezomib and recombinant human tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2006;95:166-173.
69. Berti R, Williams AJ, Velarde LC, Moffett JR, Elliott PJ, Adams J, Yao C, Dave JR, Tortella FC: Effect of the proteasome inhibitor MLN519 on the expression of inflammatory molecules following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the rat. *Neurotox Res*. 2003;5:505-514.
70. Williams AJ, Hale SL, Moffett JR, Dave JR, Elliott PJ, Adams J, Tortella FC: Delayed treatment with MLN519 reduces infarction and associated neurologic deficit caused by focal ischemic brain injury in rats via

- antiinflammatory mechanisms involving nuclear factor-kappaB activation, gliosis, and leukocyte infiltration. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:75-87.
71. Williams AJ, Myers TM, Cohn SI, Sharrow KM, Lu XC, Tortella FC: Recovery from ischemic brain injury in the rat following a 10 h delayed injection with MLN519. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;81:182-189.
72. Meiners S, Dreger H, Fechner M, Bieler S, Rother W, Gunther C, Baumann G, Stangl V, Stangl K: Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *Hypertension.* 2008;51:302-308.
73. Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, Hong C, Hittinger L, Ghaleh B, Sadoshima J et al.: Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation.* 2006;114:1821-1828.
74. Stansfield WE, Tang RH, Moss NC, Baldwin AS, Willis MS, Selzman CH: Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H645-H650.
75. Dreger H, Westphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S, Stangl K: Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2009;83:354-361.
76. Dreger H, Westphal K, Wilck N, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Meiners S: Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res.* 2010;85:395-403.
77. Dreger H, Lorenz M, Kehrer A, Baumann G, Stangl K, Stangl V: Characteristics of catechin- and theaflavin-mediated cardioprotection. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233:427-433.

78. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD: Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278:21592-21600.
79. Jaiswal AK: Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-1207.
80. Chen J, Regan RF: Increasing expression of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition protects astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Curr Neurovasc Res.* 2005;2:189-196.
81. Goldbaum O, Vollmer G, Richter-Landsberg C: Proteasome inhibition by MG-132 induces apoptotic cell death and mitochondrial dysfunction in cultured rat brain oligodendrocytes but not in astrocytes. *Glia.* 2006;53:891-901.
82. Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A: Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2007;282:4364-4372.
83. Yew EH, Cheung NS, Choy MS, Qi RZ, Lee AY, Peng ZF, Melendez AJ, Manikandan J, Koay ES, Chiu LL et al.: Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: a microarray analysis. *J Neurochem.* 2005;94:943-956.
84. Westphal K, Stangl V, Fahling M, Dreger H, Weller A, Baumann G, Stangl K, Meiners S: Human-specific induction of glutathione peroxidase-3 by proteasome inhibition in cardiovascular cells. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1652-1660.
85. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;18:655-673.

86. Wilck N, Fechner M, Dreger H, Hewing B, Arias A, Meiners S, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Ludwig A: Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1418-1426.
87. Dreger H, Ludwig A, Weller A, Stangl V, Baumann G, Meiners S, Stangl K: Epigenetic regulation of cell adhesion and communication by enhancer of zeste homolog 2 in human endothelial cells. *Hypertension.* 2012;60:1176-1183.
88. Perrotta I, Brunelli E, Sciangula A, Zuccala V, Donato G, Tripepi S, Martinelli GL, Cassese M: Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression in human atherogenesis: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Cardiovasc Pathol.* 2009;18:361-368.
89. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2479-2488.
90. Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA: Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol.* 2005;175:3846-3861.
91. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B et al.: Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med.* 2008;358:592-604.
92. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS et al.: Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:8703-8708.

93. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J et al.: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:10604-10609.
94. Herrmann J, Saguner AM, Versari D, Peterson TE, Chade A, Olson M, Lerman LO, Lerman A: Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circ Res*. 2007;101:865-874.
95. Versari D, Herrmann J, Gossl M, Mannheim D, Sattler K, Meyer FB, Lerman LO, Lerman A: Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2132-2139.
96. Hacıhanefioğlu A, Tarkun P, Gonullu E: Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *Int J Hematol*. 2008;88:219-222.
97. Voortman J, Giaccone G: Severe reversible cardiac failure after bortezomib treatment combined with chemotherapy in a non-small cell lung cancer patient: a case report. *BMC Cancer*. 2006;6:129.
98. Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K: Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med Res Rev*. 2008;28:309-327.
99. Zhou HJ, Aujay MA, Bennett MK, Dajee M, Demo SD, Fang Y, Ho MN, Jiang J, Kirk CJ, Laidig GJ et al.: Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047). *J Med Chem*. 2009;52:3028-3038.
100. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS: Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol*. 2012;19:99-115.



### 6. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann, Direktor der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie am Campus Mitte der Charité, möchte ich für seine großzügige Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung in den zurückliegenden Jahren danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl für ihre hervorragende Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit.

Für ihre stete Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Silke Meiners sowie den Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors – allen voran Frau Andrea Weller und Dr. rer. nat. Antje Ludwig – bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Melzer danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen meiner klinischen Forschungsschwerpunkte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Anne, für ihre fortwährende Unterstützung danken.

## **7. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, Januar 2013

Dr. Henryk Dreger